

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DO *Treponema pallidum* PARA O IMUNODIAGNÓSTICO DA SÍFILIS

ÂNGELO ANTÔNIO OLIVEIRA SILVA

Salvador - Bahia

2020

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DO *Treponema
pallidum* PARA O IMUNODIAGNÓSTICO DA SÍFILIS**

ÂNGELO ANTÔNIO OLIVEIRA SILVA

Orientador: Prof. Dr. Fred Luciano Neves Santos

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do grau de Mestre.

Salvador - Bahia

2020

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S586a Silva, Ângelo Antônio Oliveira.
Avaliação e validação de proteínas recombinantes do *Treponema pallidum* para o imunodiagnóstico da sífilis. / Ângelo Antônio Oliveira Silva. - 2020.
141 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Fred Luciano Neves Santos, Laboratório Avançado de Saúde Pública.

Dissertação (Mestrado de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2020.

1. Sífilis. 2. Imunodiagnóstico. 3. Testes sorológicos. 3. Antígenos Recombinantes. I. Título.

CDU 616-002.6

" AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DO *TREPONEMA PALLIDUM*
PARA O IMUNODIAGNÓSTICO DA SÍFILIS."

ÂNGELO ANTONIO OLIVEIRA SILVA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 12 de fevereiro de 2020.

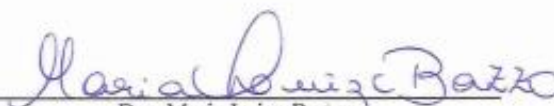
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Soraia Machado Cordeiro
Professora
UFBA



Dra. Isadora Cristina de Siqueira
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ



Dra. Maria Luiza Bazzo
Professora associada
UFSC

FONTES DE FINANCIAMENTO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código
de Treinamento 001

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB)

Instituto Gonçalo Moniz/Fiocruz (IGM)

AGRADECIMENTOS

Dentre todo o processo de obtenção de um título de mestre, redigir a dissertação é uma das partes mais desafiadoras. Chegar até aqui foi um caminho árduo, de dificuldades e desafios, mas com perseverança. Não há palavras que possam definir por completo o sentimento de gratidão à cada um daqueles que de alguma forma contribuíram para a concretização deste objetivo. Também é imensurável e indescritível todo o conhecimento adquirido ao longo da minha carreira profissional e as novas relações de amizades obtidas nessa trajetória.

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder o dom da inteligência e a condição de sempre buscar mais e mais o conhecimento daquilo que pode mudar o mundo: a ciência. Através disto, me desafio todos os dias a lutar por ela como forma de melhorar a saúde pública. Com a ajuda Dele, encerro mais um ciclo para o início de outras oportunidades maiores. A minha família, expresse meu sentimento de eterna gratidão pelo apoio que foi essencial durante toda a minha trajetória até aqui. Depois de realizar um tão sonhado objetivo de me tornar biomédico, vejo hoje que junto a eles concluo mais uma etapa daquilo que sempre almejei. Aos meus pais, irmãos, sobrinhos, tias, tios, primos dedico não só este trabalho, mas todo o esforço inerente a ajuda que cada um me concedeu, mesmo que de maneira indireta.

Não poderia jamais deixar de agradecer imensamente ao meu orientador Dr. Fred Luciano, primeiramente por ter me recebido com muita atenção na primeira reunião que tivemos quando demonstrei interesse em trabalhar com ele. Sempre tão objetivo, não se mostrou relutante em me aceitar, mas antes confiou e acreditou no meu potencial desde o início. Não acredito em coincidências, pois sei que para tudo há um objetivo, e ter feito parte do Grupo de Tecnologia Diagnóstica me possibilitou ver e experienciar que existe sim orientadores/pesquisadores/cientistas compreensivos, amigos, gentis, atenciosos e humanos. Levo comigo todas as boas lembranças e amizades que fiz durante a faculdade e mais ainda os amigos que a FIOCRUZ me concedeu. A Leonardo, sempre brilhante e não me canso de dizer que é a pessoa mais inteligente e divertida que conheci. A Ramona, Natália e Emily pelos bons momentos de descontração e ajuda nos experimentos. A Larissa, que mesmo chegada recentemente, contribuiu para que este trabalho fosse concluído. Ao LASP, meu laboratório de coração, e a cada uma das nossas Instituições parceiras.

SILVA, Ângelo Antônio Oliveira. Avaliação e validação de proteínas recombinantes do *Treponema pallidum* para o imunodiagnóstico da sífilis. 141 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A sífilis é uma infecção sexualmente transmissível (IST) causada pela bactéria *Treponema pallidum*, que se caracteriza por ser crônica, multissistêmica e restrita aos seres humanos. É um problema de saúde pública, considerada como a mais importante infecção que afeta gestantes e recém-nascidos. O diagnóstico laboratorial é realizado com testes sorológicos não-treponêmicos (VDRL e RPR) e testes treponêmicos (ELISA, QML e IFI). Dentre os treponêmicos, os imunoenzimáticos apresentam bom desempenho, a depender da preparação antigênica utilizada. Desta forma, proteínas recombinantes fornecem maior confiabilidade aos resultados por melhorarem a sensibilidade, especificidade e a reprodutibilidade dos imunoenaios. **OBJETIVO:** Avaliar o potencial diagnóstico das proteínas recombinantes TpN17, TpN47, TpN15 e TmpA do *T. pallidum* para o diagnóstico laboratorial da sífilis. **MATERIAL E MÉTODOS:** As proteínas foram produzidas e purificadas no Instituto de Biologia Molecular do Paraná. Os ensaios de ELISA indireto foram padronizados e otimizados através de *checkerboard titration* para determinar a quantidade ideal de antígeno, anticorpo secundário e amostras séricas, utilizando 4 *pools* negativos e 3 *pools* positivos em duplicata. Para o estudo de fase I, 653 amostras séricas foram consideradas elegíveis, sendo 143 positivas para sífilis, 301 negativas e 209 positivas para outras doenças infecto-parasitárias. As amostras foram reavaliadas para a presença ou ausência de anticorpos para sífilis, com testes não-treponêmicos (USR e RPR) e/ou treponêmicos (FTA-ABS - IIFT IgG). **RESULTADOS:** Na padronização, a maior diferença do sinal entre as amostras positivas e negativas foi atingida utilizando as seguintes condições: TpN17 e TpN47 (100 ng do antígeno, 1:25 do soro e 1:20.000 do conjugado) e TmpA (200 ng do antígeno, 1:25 do soro e 1:10.000 do conjugado). Não foi possível padronizar a molécula TpN15, provavelmente devido a problemas de expressão e purificação, e por isto ela foi desconsiderada do estudo. No estudo de fase I, TpN17, TmpA e TpN47 obtiveram área abaixo da curva (AUC) de 97,2%, 91,8% e 81,6%, respectivamente. A TpN17 e TmpA apresentaram especificidade de 100% enquanto a TpN47 obteve 99,7%. Todavia, do quantitativo de amostras positivas, a TpN17 e a TmpA diagnosticaram 43 amostras como falso-negativas, resultando em sensibilidade de 69,9%. Já a TpN47, diagnosticou 66 amostras como falso-negativas, apresentando sensibilidade de 53,8%. Na determinação do índice de reatividade cruzada, foi observada reatividade de 2,9% (6/209) para a TpN17 (leptospirose: 6) e 16,74% (35/209) tanto para a TmpA (leptospirose: 32; dengue: 1; filariose: 1; esquistossomose: 1) quanto para a TpN47 (leptospirose: 32; filariose: 1; HIV: 2). No ensaio de reprodutibilidade intra-placa não houve diferença significativa entre as moléculas, apresentando assim uma boa repetitividade dos ensaios. **CONCLUSÃO:** A despeito dos baixos valores de sensibilidade reportados, as proteínas mostraram elevada capacidade diagnóstica em virtude dos valores de AUC encontrados. Contudo, uma melhora na sensibilidade pode ser alcançada quando misturas antigênicas forem avaliadas, consistindo na próxima etapa de nossa investigação.

Palavras Chave: Sífilis; Imunodiagnóstico; Testes Sorológicos; Antígenos Recombinantes.

SILVA, Ângelo Antônio Oliveira. Evaluation and validation of recombinant proteins of *Treponema pallidum* for immunodiagnosis of syphilis. 141 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Syphilis is a life-long, multisystemic, human-specific sexually transmitted infection (STI), caused by the spirochete bacterium *Treponema pallidum*. It is a public health problem and the most important infection among pregnant women and newborns. Laboratory diagnosis is performed through non-treponemal serological tests (VDRL and RPR) and treponemal tests (ELISA, CLIA and IIF). Among the treponemal tests, the immunoenzymatic assays are regarded as efficient, however, its efficiency relies on the employed antigen preparation. Thus, recombinant proteins provide greater reliability to results by improving immunoassay sensitivity, specificity, and reproducibility. **AIM:** To evaluate the diagnostic potential of the recombinant *T. pallidum* proteins TpN17, TpN47, TpN15 and TmpA for syphilis serodiagnosis. **MATERIALS AND METHODS:** The proteins were produced and purified at the Institute of Molecular Biology of Paraná. Indirect ELISA was standardized and optimized by checkerboard titration to determine the appropriate antigen amount, secondary antibody and serum dilutions, by assessing 4 negative and 3 positive pools. All standardization assays were undertaken in pairs. For the phase I study, 653 serum samples were considered eligible, being 143 positive for syphilis, 301 negative and 209 positive samples for other parasitic diseases. The samples were reassessed for the presence or absence of syphilis antibody by non-treponemal (USR and RPR) and treponemal (FTA-ABS) tests. **RESULTS:** In standardization, the greatest signal difference between positive and negative samples was achieved using the following conditions: TpN17 and TpN47 (100 ng of antigen, 1:25 of serum and 1:20,000 of conjugate) and TmpA (200 ng of antigen, 1:25 serum and 1:10,000 conjugate). Standardization of TpN15 was not achieved, probably due to issues regarding protein expression and/or purification, therefore, it was omitted from the study. In the phase I study, the area under the ROC curve (AUC) for TpN17, TmpA and TpN47 was 97.2%, 91.8% and 81.6% respectively. TpN17 and TmpA had 100% of specificity, followed by TpN47 with 99.7%. However, TpN17 and TmpA provided a negative result for 43 syphilis-positive samples, resulting in sensitivity of 69.9%. TpN47, concurrently, rendered negative results for 66 syphilis-positive samples, which lowered its sensitivity to 53.8%. All three antigens cross-reacted in varying amounts. In regard to non-specific reactions, TpN17 recognized 2.9% (6 (leptospirosis)/209) of the samples as positive for syphilis, followed by TpN47 (leptospirosis: 32; filariasis: 1; HIV: 2) and TmpA (leptospirosis: 32; dengue: 3), both misdiagnosing 35/209 samples, resulting in 16.74% of cross-reactivity. No significant difference in performance was found in the intra-plate reproducibility assessment. **CONCLUSION:** Despite the sensitivity values found, these proteins showed a high diagnostic capacity based on their AUC values. Nevertheless, sensitivity can be improved by employing antigen mixtures, which shall be the next step in our investigation.

Keywords: Syphilis; Immunodiagnostic; Serological Tests; Recombinant Proteins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | Linha do tempo da sífilis. | 24 |
| Figura 2 | Fotomicrografia (A) e estrutura (B) do <i>Treponema pallidum</i> . | 26 |
| Figura 3 | Lesões da sífilis primária em homem (A) e em mulher (B). | 29 |
| Figura 4 | Lesões causadas na sífilis secundária. | 30 |
| Figura 5 | Goma sífilítica em pele de indivíduo com sífilis terciária. | 31 |
| Figura 6 | Lesões da sífilis congênita precoce. | 32 |
| Figura 7 | Sinais clínicos da sífilis congênita tardia. | 32 |
| Figura 8 | Incidência da sífilis congênita e em gestantes no Brasil de 2001 a 2017. | 35 |
| Figura 9 | Distribuição espaço-temporal da sífilis em gestantes (A) e congênita (B) no Brasil de 2001 a 2017. | 36 |
| Figura 10 | Distribuição espaço-temporal da sífilis adquirida no Brasil de 2010 a 2018. | 37 |
| Figura 11 | <i>Treponema pallidum</i> visualizado em microscopia de campo escuro. | 40 |
| Figura 12 | Desenho esquemático demonstrando a reação dos testes não treponêmicos. | 42 |
| Figura 13 | Teste FTA-ABS positivo mostrando espiroquetas fluorescentes do <i>Treponema pallidum</i> . | 44 |
| Figura 14 | Reação do teste de ELISA. | 44 |
| Figura 15 | Funcionamento da imunocromatografia. | 46 |
| Figura 16 | Tipos de testes para diagnóstico da sífilis de acordo com o estágio da infecção. | 46 |
| Quadro 1 | Sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos para sífilis. | 47 |
| Figura 17 | Algoritmos diagnósticos da sífilis. | 48 |
| Figura 18 | Modelo de localização das lipoproteínas do <i>Treponema pallidum</i> . | 51 |
| Figura 19 | Modelo de estrutura tridimensional das proteínas treponêmicas. | 52 |
| Quadro 2 | Lotes de produção e concentração dos antígenos IBMP. | 55 |

| | | |
|-----------|---|-----|
| Figura 20 | Fluxograma para avaliação do desempenho diagnóstico de antígenos recombinantes para detectar a sífilis em indivíduos infectados. | 56 |
| Figura 21 | Combinação binária entre os prováveis resultados obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença. | 62 |
| Figura 22 | SDS-PAGE dos antígenos recombinantes corados pelo azul de Coomassie. | 64 |
| Figura 23 | Análise gráfica dos valores médios de absorbância do TpN17. | 65 |
| Figura 24 | Análise gráfica dos valores médios de absorbância do TmpA. | 67 |
| Figura 25 | Análise gráfica dos valores médios de absorbância do TpN47. | 69 |
| Figura 26 | Análise gráfica dos valores médios de absorbância do TpN15. | 71 |
| Figura 27 | Gráfico dos índices de reatividade dos antígenos treponêmicos no estudo de fase I. | 75 |
| Figura 28 | Comparação dos índices de reatividade de amostras negativas e positivas para os antígenos no estudo de fase I. | 76 |
| Figura 29 | Comparação intervalos de confiança (IC95%) da sensibilidade e especificidade dos antígenos IBMP no estudo de fase I. | 77 |
| Figura 30 | Índice de reatividade dos antígenos na avaliação da reprodutibilidade intraplaca. | 80 |
| Figura 31 | Análise gráfica dos índices de reatividade dos antígenos treponêmicos utilizando amostras séricas de indivíduos portadores de doenças infecto-parasitárias. | 81 |
| Figura 32 | Análise gráfica da avaliação combinatória usando os antígenos treponêmicos para as amostras positivas. | 84 |
| Quadro 3 | Análise de reação cruzada de proteínas recombinantes do <i>Treponema pallidum</i> . | 89 |
| Quadro 4 | Parâmetros de desempenho diagnóstico de proteínas recombinantes usadas no diagnóstico laboratorial da sífilis. | 120 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao TpN17. | 66 |
| Tabela 2 | Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao TmpA. | 68 |
| Tabela 3 | Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao TpN47. | 70 |
| Tabela 4 | Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao TpN15. | 72 |
| Tabela 5 | Parâmetros de desempenho dos antígenos no estudo de fase I. | 74 |
| Tabela 6 | Índice de reatividade dos antígenos no estudo de fase I. | 74 |
| Tabela 7 | Parâmetros de desempenho dos antígenos na avaliação da reprodutibilidade intraplaca. | 78 |
| Tabela 8 | Índice de reatividade dos antígenos no estudo de fase I. | 79 |
| Tabela 9 | Índice de reatividade dos antígenos na fase I do estudo, utilizando as amostras séricas de indivíduos portadores de outras doenças infecto-parasitárias. | 82 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|---|
| ANTG | Antígeno |
| AEQ | Avaliação externa da qualidade |
| AIDS | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>) |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| APC | Varição Percentual Anual (<i>Annual Percent Change</i>) |
| AUC | Área Abaixo da Curva (<i>Area Under Curve</i>) |
| BA | Bahia |
| BSA | Albumina de soro bovino (<i>Bovine serum albumin</i>) |
| CAAE | Certificado de Apresentação para Apreciação Ética |
| CD4 ⁺ | Grupo de Diferenciação 4 positiva (<i>Cluster of Differentiation 4</i>) |
| CD8 ⁺ | Grupo de Diferenciação 8 positiva (<i>Cluster of Differentiation 8</i>) |
| CDC | Centro de Controle e Prevenção de Doenças (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>) |
| CHA | Doença de Chagas |
| CO | Ponto de corte (<i>Cut-off</i>) |
| DEN | Dengue |
| DO | Densidade óptica |
| DPP | Plataforma de Duplo Percurso (<i>Dual Path Platform</i>) |
| EDTA | Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>) |
| EIC | Ensaio Imunocromatográfico |
| ELISA | Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>) |
| ELIFA | Ensaio de Imunofiltração em Linha Ligado à Enzima (<i>Enzyme-Linked Immunofilter Assay</i>) |
| E-selectina | Selectina Endotelial |

| | |
|---------------|--|
| ESP | Especificidade |
| ESQ | Esquistossomose mansônica crônica |
| EXA | Exatidão |
| FIL | Filariose |
| FIOCRUZ | Fundação Oswaldo Cruz |
| FITC | Isotiocianato de Fluoresceína (<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>) |
| FN | Falso Negativo |
| FP | Falso Positivo |
| FTA-ABS | Anticorpo Treponêmico Fluorescente com Absorção (<i>Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Test</i>) |
| HBV | Vírus da Hepatite B (<i>Hepatitis B Virus</i>) |
| HCV | Vírus da Hepatite C (<i>Hepatitis C Virus</i>) |
| HEMOBA | Hemocentro da Bahia |
| HEMOPE | Hemocentro de Pernambuco |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>) |
| IC | Intervalo de Confiança |
| ICAM-1 | Molécula de Adesão Intercelular-1 (<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>) |
| ICC | Instituto Carlos Chagas |
| IFI | Imunofluorescência indireta |
| IFN- γ | Interferon Gama |
| IgG | Imunoglobulina do tipo G |
| IgM | Imunoglobulina do tipo M |
| IGM | Instituto Gonçalo Moniz |
| IL-12 | Interleucina 12 |
| IL-1 β | Interleucina 1 beta |
| IL-2 | Interleucina 2 |
| IL-6 | Interleucina 6 |

| | |
|----------------------------------|--|
| IL-8 | Interleucina 8 |
| INNO-LIA | Imunoensaio em Linha (<i>Line immunoassay</i>) |
| IR | Índice de Reatividade |
| IST | Infecção Sexualmente Transmissível |
| LACEN | Laboratório Central |
| LACTFAR | Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia |
| LASP | Laboratório Avançado de Saúde Pública |
| LATED | Laboratório de Tecnologia Diagnóstica |
| LCR | Líquido Cefalorraquidiano |
| LEI | Leishmaniose tegumentar e visceral |
| LEP | Leptospirose |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| MED | Medidas |
| MCP-1 | Proteína Quimiotática de Monócitos-1 (<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>) |
| MHA-TP | Ensaio de Micro-Hemaglutinação para <i>Treponema pallidum</i> (<i>Micro Hemagglutination Assay for Treponema pallidum</i>) |
| MS | Ministério da Saúde |
| Na ₂ CO ₃ | Carbonato de sódio |
| Na ₂ HPO ₄ | Fosfato dissódico |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NaH ₂ PO ₄ | Fosfato monossódico |
| NaHCO ₃ | Bicarbonato de sódio |
| NDo | Número de Doentes |
| NEG | Negativo |
| NSa | Número de Sadios |
| ORF | Quadro Aberto de Leitura (<i>Open Reading Frame</i>) |

| | |
|--------------------|---|
| PAGE | Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>) |
| PBS | Tampão Fosfato Salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>) |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| PFN | Proporção de falso-negativo |
| PFP | Proporção de falso-positivo |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| PM | Peso Molecular |
| PMN | Polimorfonuclear |
| POS | Positivo |
| PR | Paraná |
| QML | Quimiluminescência |
| RJ | Rio de Janeiro |
| ROC | Característica de Operação do Receptor (<i>Receiver Operating Characteristic</i>) |
| RPM | Rotações por Minuto |
| RPR | Reagina Plasmática Rápido (<i>Rapid Test Reagin</i>) |
| SDS-PAGE | Dodecil Sulfato de Sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>) |
| SEN | Sensibilidade |
| SINAN | Sistema de Informação de Agravos de Notificação |
| SLP | Sífilis Latente Precoce |
| SP | Sífilis Primária |
| SS | Sífilis Secundária |
| subsp | Subespécie |
| <i>T. pallidum</i> | <i>Treponema pallidum</i> |
| TLR2 | Receptores tipo Toll 2 (<i>Toll Like Receptor 2</i>) |
| TmpA | Proteína A de Membrana Treponêmica (<i>Treponemal Membrane Protein A</i>) |

| | |
|---------------|---|
| TNF- α | Fator de Necrose Tumoral Alfa (<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>) |
| TPHA | Ensaio de hemaglutinação para <i>Treponema pallidum</i> (<i>Treponema pallidum hemagglutination assay</i>) |
| TpN | <i>Treponema pallidum</i> /cepa Nichols |
| TPPA | Ensaio de Aglutinação Passiva de Partículas de Gelatina para <i>Treponema pallidum</i> (<i>Treponema pallidum particle agglutination assay</i>) |
| <i>tpr</i> | Região Promotora Translocada (<i>Translocated Promoter Region</i>) |
| TRUST | Teste da toluidina vermelha com soro não aquecido (<i>Toluidine Red Unheated Serum Test</i>) |
| UFBA | Universidade Federal da Bahia |
| UFG | Universidade Federal de Goiás |
| USR | Reagina sérica não aquecida (<i>Unheated Serum Reagin</i>) |
| VCAM-1 | Molécula de adesão celular vascular-1 (<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>) |
| VDRL | Laboratório de Pesquisa em Doenças Venéreas (<i>Veneral Disease Research Laboratory</i>) |
| VN | Verdadeiro Negativo |
| VP | Verdadeiro Positivo |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-----|-------------------|
| % | Porcentagem |
| μg | Micrograma |
| μl | Microlitro |
| ° C | Graus Celsius |
| kDa | Quilodalton |
| mg | Miligrama |
| mM | Milimolar |
| ng | Nanograma |
| nm | Nanômetro |
| κ | Kappa de Cohen |
| μm | Micrômetro |
| mL | Mililitro |
| < | Menor que |
| > | Maior que |
| mm | Milímetro |
| mA | Miliampère |
| x | Veze |
| ± | Mais ou menos |
| σ | Desvio padrão |
| J | Índice de Younden |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 21 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 23 |
| 2.1 | HISTÓRICO DA SÍFILIS | 23 |
| 2.2 | AGENTE ETIOLÓGICO | 25 |
| 2.3 | PATOGENIA/INFECÇÃO | 27 |
| 2.4 | MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS | 28 |
| 2.5 | EPIDEMIOLOGIA | 33 |
| 2.6 | RESPOSTA IMUNOLÓGICA | 38 |
| 2.7 | DIAGNÓSTICO LABORATORIAL | 39 |
| 2.7.1 | Exames diretos | 39 |
| 2.7.1.1 | <i>Exame em campo escuro</i> | 39 |
| 2.7.1.2 | <i>Material corado</i> | 40 |
| 2.7.1.3 | <i>Reação em cadeia da polimerase</i> | 40 |
| 2.7.2 | Testes imunológicos | 41 |
| 2.7.2.1 | <i>Não treponêmicos</i> | 41 |
| 2.7.2.2 | <i>Treponêmicos</i> | 42 |
| 2.8 | DESEMPENHO DIAGNÓSTICO DE ANTÍGENOS TREPONÊMICOS | 49 |
| 3 | OBJETIVOS | 53 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL | 53 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 53 |
| 4 | METODOLOGIA | 54 |
| 4.1 | DELINEAMENTO DO ESTUDO | 54 |
| 4.1.1 | Local do estudo | 54 |
| 4.1.2 | Considerações éticas | 54 |
| 4.2 | OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES | 54 |
| 4.2.1 | Eletroforese em gel de poliacrilamida | 55 |
| 4.3 | AMOSTRAS SOROLÓGICAS | 55 |
| 4.3.1 | Dimensionamento amostral | 55 |
| 4.3.2 | Obtenção e caracterização dos painéis sorológicos | 55 |
| 4.3.2.1 | <i>RPR</i> | 57 |
| 4.3.2.2 | <i>USR</i> | 57 |
| 4.3.2.3 | <i>FTA-ABS</i> | 57 |
| 4.3.3 | CrITÉrios de inclusão | 58 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.3.4 | Crêterios de não inclusão | 59 |
| 4.4 | PADRONIZA O DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO | 59 |
| 4.4.1 | Sensibiliza o das placas | 59 |
| 4.4.2 | Padroniza o dos componentes do ELISA indireto | 60 |
| 4.5 | ANÁLISE DOS RESULTADOS | 60 |
| 4.5.1 | Defini o da padroniza o | 60 |
| 4.5.2 | Defini o do ponto de corte (CO – cut-off) | 61 |
| 4.5.3 | Normaliza o dos dados | 61 |
| 4.5.4 | Avalia o dos parâmetros de desempenho | 62 |
| 4.5.5 | Reprodutibilidade intraplaca (repetitividade) | 63 |
| 4.5.6 | Testes estatísticos | 63 |
| 5 | RESULTADOS | 64 |
| 5.1 | AVALIA O DA EXPRESSÃO E QUALIDADE DOS ANTÍGENOS | 64 |
| 5.2 | PADRONIZA O DO ELISA INDIRETO | 64 |
| 5.2.1 | Antígeno TpN17 | 64 |
| 5.2.2 | Antígeno TmpA | 66 |
| 5.2.3 | Antígeno TpN47 | 69 |
| 5.2.4 | Antígeno TpN15 | 70 |
| 5.3 | AVALIA O DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO | 73 |
| 5.3.1 | Estudo de fase I | 73 |
| 5.3.2 | Reprodutibilidade intraplaca | 77 |
| 5.3.3 | Reatividade cruzada | 80 |
| 5.3.4 | Conserva o das proteínas TpN17, TpN47 e TmpA de <i>T. pallidum</i> | 82 |
| 5.3.5 | Análise combinatória dos resultados positivos | 83 |
| 6 | DISCUSSÃO | 85 |
| 6.1 | PADRONIZA O DO ELISA INDIRETO | 85 |
| 6.2 | AVALIA O DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO | 86 |
| 6.2.1 | Estudo de fase I | 86 |
| 6.2.2 | Reprodutibilidade intraplaca | 88 |
| 6.2.3 | Reatividade cruzada | 88 |
| 6.2.4 | Conserva o das proteínas TpN17, TpN47 e TmpA de <i>T. pallidum</i> | 90 |
| 6.2.5 | Análise combinatória dos resultados positivos | 90 |
| 7 | CONSIDERA OES FINAIS | 94 |
| 8 | PERSPECTIVAS | 95 |
| | REFERÊNCIAS | 96 |

| | |
|-----------------------|------------|
| APÊNDICE | 106 |
|-----------------------|------------|

1 INTRODUÇÃO

A sífilis é uma infecção crônica, sistêmica e restrita aos seres humanos, causada pela bactéria *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. Sua transmissão ocorre predominantemente pelo contato sexual, como também de forma vertical, manifestando-se em múltiplos estágios clínicos (SINGH; ROMANOWSKI, 1999). A transmissão da mãe para o filho ainda consiste em um grande desafio no cenário mundial. Do conjunto de infecções que podem ser transmitidas durante a gestação, a sífilis é a que apresenta a maior taxa de transmissão, sendo reconhecida como a mais importante infecção que afeta gestantes e recém-nascidos (OLIVEIRA, 2014; SMITH *et al.*, 2013).

A infecção é identificada através de testes sorológicos não-treponêmicos, utilizados para triagem e avaliação do sucesso terapêutico, e treponêmicos, os quais são utilizados para detecção de anticorpos específicos anti-*T. pallidum* (JIANG *et al.*, 2013). Dentre os testes treponêmicos, a depender da plataforma diagnóstica escolhida, os antígenos podem ser utilizados na forma nativa ou recombinante, em diferentes combinações e proporções. As proteínas nativas são pouco utilizadas, pois possuem estrutura antigênica complexa, dificultando a sua purificação e uso em imunoenaios. Por outro lado, as proteínas recombinantes são mais utilizadas, devido à possibilidade de obtenção em larga escala, de forma pura e confiável (SAMBRI *et al.*, 2001a).

No entanto, apesar da existência dos testes sorológicos, o diagnóstico da sífilis ainda é um desafio. Como não existe cultura de *T. pallidum* em meio axênico, os testes sorológicos são usados como diagnóstico final. Além disto, as formas clínicas distintas da infecção podem influenciar o desempenho sorológico dos testes (XU *et al.*, 2016). Por este motivo, muitos médicos reportam problemas nas decisões clínicas quando amostras de soro dos pacientes são confirmadas como reativas para os testes treponêmicos e não-reativas para os não-treponêmicos (ROURK, NOLTE, LITWIN, 2016). Desta forma, é necessária a busca por novos marcadores laboratoriais que atendam à necessidade de testes diagnósticos mais precisos, diferenciais, com maior rapidez nos resultados, redução de custos e aumento da eficiência de processamento de grandes quantidades de amostras.

De acordo com isto, a capacidade dos imunoenaios em detectar anticorpos anti-treponêmicos depende da matriz antigênica utilizada, sendo que a utilização de antígenos recombinantes fornece maior confiabilidade aos resultados por melhorarem a sensibilidade, especificidade e a reprodutibilidade dos testes diagnósticos (SEÑA; WHITE; SPARLING, 2010). Os métodos mais empregados para o estudo do potencial diagnóstico de novos

marcadores diagnósticos são os imunoenzimáticos, os quais apresentam alta sensibilidade na fase inicial da infecção (SÁEZ-ALQUÉZAR *et al.*, 2008).

Estudos utilizando Western blot mostraram que são produzidos anticorpos contra mais de 20 antígenos do *T. pallidum* (YOUNG *et al.*, 1998). Algumas destas proteínas foram amplamente utilizadas para pesquisa de anticorpos específicos nos testes sorológicos para a sífilis, como as lipoproteínas de membrana TpN15, TpN17, TpN47 e a TmpA (SATO *et al.*, 1999; XU *et al.*, 2016). Porém, os estudos referentes a estas proteínas foram realizados em outros países e podem representar condições que diferem do cenário presente no Brasil. Por este motivo, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o desempenho diagnóstico das moléculas TpN15, TpN17, TpN47 e a TmpA na identificação laboratorial da sífilis no Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO DA SÍFILIS

A sífilis é uma infecção datada de mais de meio século e teve seus primeiros casos registrados em 1495 pelos médicos venezianos Marcellus Cumanus e Alexandri Benedetto. Segundo relatos históricos, no final do século XV uma epidemia muito grave de sífilis iniciou-se na França e, em menos de 10 anos, se espalhou pela Europa dizimando populações (SOUZA, 1996). Em 1495, após a Batalha de Fornovo, a infecção se espalhou entre os soldados e no mesmo ano, novos casos surgiram na Itália e sul da França, chegando à Paris, Alemanha, Áustria, Trácia (1496), Inglaterra e Escócia (1497). Marcellus Cumanus em seus relatos após a guerra de 1495, descreveu o que lhe chamou a atenção ao ver as manifestações clínicas da infecção nos soldados:

“Lesões que pareciam grãos de milho na glândula e prepúcio, pústulas em todo o corpo, que eram seguidas por dores terríveis em braços e pernas que deixavam os soldados desesperados. Benedetto acentua o sofrimento causado por uma moléstia mais repugnante que lepra ou elefantíase” (NETO *et al.*, 2009, apud QUÉTEL, 1992).

O termo sífilis surgiu em 1510, através do médico e poeta Girolamo Fracastoro, que escreveu três livros contendo poemas com relatos sobre a origem da infecção, como ela se espalhou, principais sinais e sintomas, orientações para evitá-la, além dos cuidados e procedimentos com os doentes (FERREIRA, 2008, apud FRACASTORII, 1720). No entanto, a origem e o caráter contagioso da sífilis, só foram melhor compreendidos com a teoria bacteriana de Pasteur em 1878, mesmo sem o conhecimento do seu agente etiológico.

Entre 1860 e 1890 a sífilis se tornou uma infecção cotidiana na sociedade, com grande predominância entre a maioria dos casos de internação. O Brasil foi então marcado por epidemias que estavam relacionadas com hábitos sexuais inadequados do seu povo, mas somente a partir de 1920 iniciaram-se as campanhas de combate à infecção, sendo acentuadas em 1940 com a 1ª Conferência Nacional de Defesa contra a Sífilis, na tentativa de mudar o cenário de um problema que assolava o país desde sua colonização (CARRARA, 1996).

A descoberta e isolamento do agente etiológico da sífilis, só foram realizadas em 3 de março de 1905 por Fritz Richard Schaudinn, ao examinar, em um microscópio, uma amostra de pápula erodida da vulva de uma mulher com sífilis secundária, obtida por Paul Erich

Hoffmann. Eles relataram ter observado a presença de vários microrganismos espiralados, muito claros, delgados que se moviam para frente e para trás. Denominaram de *Spirochaeta pallida*, e posteriormente renomearam para *Treponema pallidum* em 14 de outubro de 1905 (SOUZA, 2005).

Anos mais tarde, em 1928, a descoberta da penicilina por Alexander Fleming se tornou uma das conquistas mais marcantes para a história da ciência, da medicina e da farmácia do século XX. Nesta perspectiva, a penicilina permitiu que novos investimentos fossem empregados no domínio da antibioticoterapia, levando conseqüentemente à descoberta de novos antibióticos que desencadearam profundas alterações no tratamento de infecções com significativas implicações sociodemográficas e econômicas. Assim, em 1943, nos Estados Unidos, a penicilina foi o primeiro antibiótico utilizado no combate à sífilis, pois sua terapêutica era curativa e com eficácia evidente. Os cientistas começaram a obter resultados satisfatórios e, a partir de então, os casos de infecções começaram a diminuir no país (PEREIRA; PITA, 2005). Por consistir em um tratamento eficaz, pensou-se que a penicilina levaria ao desaparecimento da infecção, entretanto a sífilis continua atingindo milhões de pessoas no mundo (JACINTO *et al.*, 2007). A figura 1 representa a linha do tempo acerca dos conhecimentos e descobertas em torno da infecção.

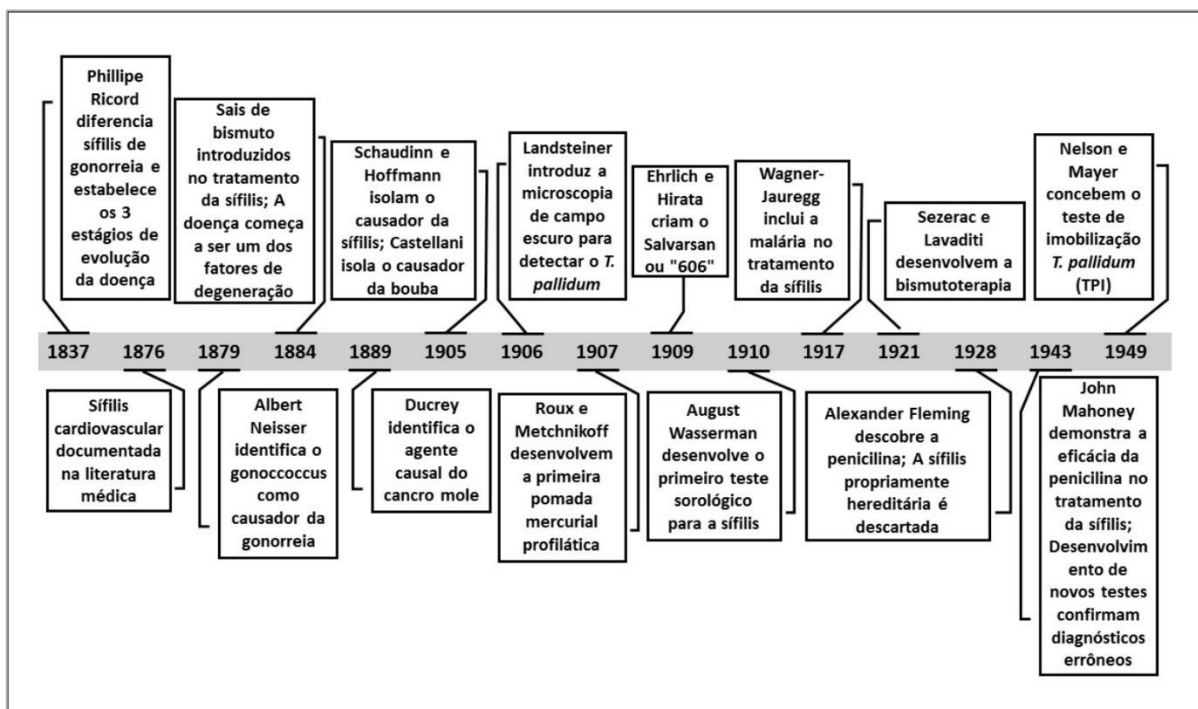


Figura 1: Linha do tempo da sífilis.

Fonte: Adaptado de Tampa *et al.* (2014) e Carrara (1996).

2.2 AGENTE ETIOLÓGICO

De acordo com a taxonomia, dentre as bactérias da ordem Spirochaetales e família Treponemataceae, existem três gêneros considerados patogênicos ao homem, sendo eles: *Treponema* spp., *Leptospira* spp. e *Borrelia* spp. Dentro do gênero *Treponema*, a espécie *Treponema pallidum* se divide em 4 subespécies responsáveis por infecções que acometem o ser humano: *T. pallidum* subsp. *pallidum* (agente causador da sífilis), *T. pallidum* subsp. *pertenue* (agente causador da boubá), *T. pallidum* subsp. *carateum* (agente causador da pinta) e *T. pallidum* subsp. *endemicum* (agente causador de bejel ou sífilis endêmica) (AVELLEIRA; BOTTINO, 2006).

Morfologicamente, *T. pallidum* é uma bactéria Gram-negativa de formato espiralado (10 a 20 voltas), com 6-15 µm de comprimento e 0,2 µm de diâmetro (Figura 2A). É fastidiosa, anaeróbia facultativa e catalase negativa, extremamente sensível às variações de temperatura, umidade e desinfetantes. Se dividem transversalmente por fissão binária a cada 30 horas (AVELLEIRA; BOTTINO, 2006). Como em todas as espiroquetas, o corpo espiral é composto por: a) uma membrana externa pobre em lipopolissacarídeos, que envolve o endoflagelo periplasmático e com função de barreira protetora, b) uma membrana citoplasmática rica em lipoproteínas e c) por um cilindro protoplasmático. Entre estas membranas existe uma fina camada de peptidoglicano, o qual fornece estabilidade estrutural à bactéria. Já no espaço periplasmático, encontra-se o endoflagelo (Figura 2B), estrutura responsável pelo movimento helicoidal que atribui a forma espiralada à bactéria (FERREIRA, 2013).

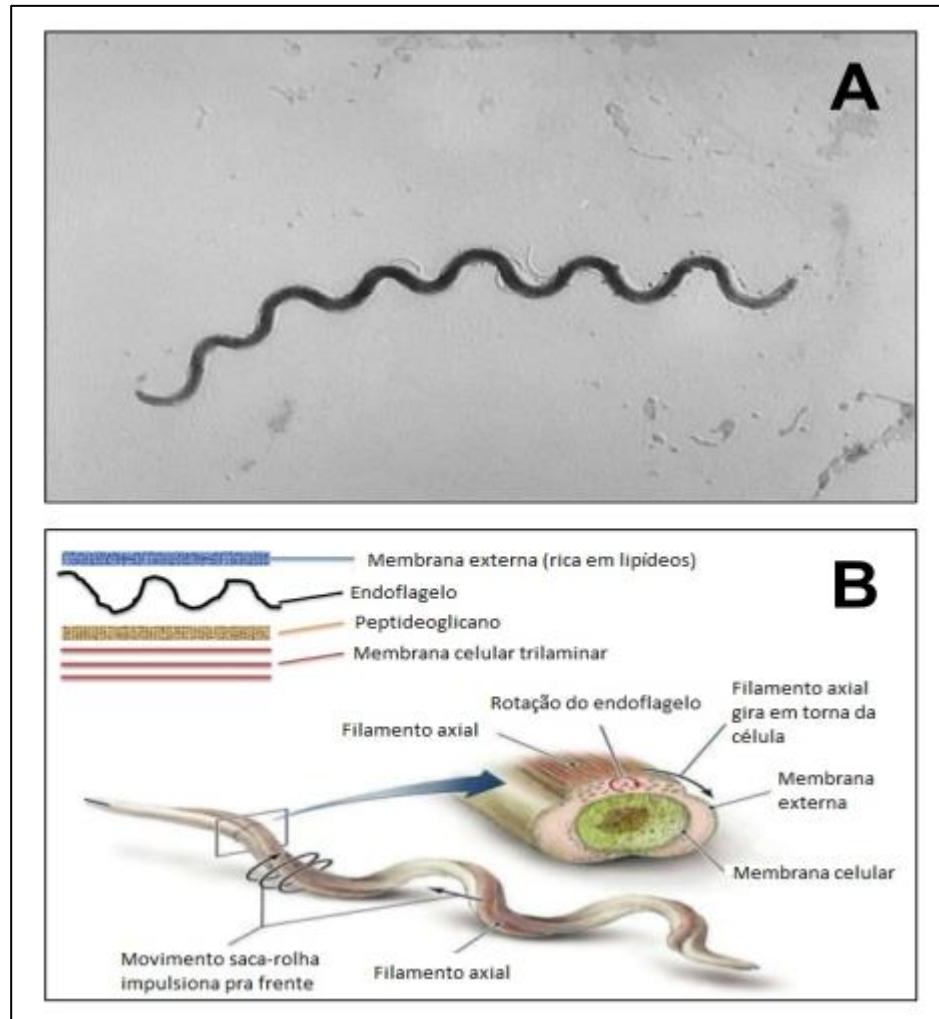


Figura 2: Fotomicrografia (A) e estrutura (B) do *Treponema pallidum*.

Fonte: <https://bit.ly/2LBfojm>. Acesso em: 28 de maio de 2018. Adaptado; Fraga (2013).

Geneticamente, *T. pallidum* subsp. *pallidum* possui um cromossomo circular de 1.138.000 pares de base com 1.041 quadros de leitura aberta (ORF, do inglês *Open Reading Frame*), considerado pequeno para uma bactéria. Com o estudo do seu genoma, percebeu-se que este organismo possui poucos genes envolvidos na produção de energia e síntese de nutrientes, por isso possui capacidade biosintética limitada, necessitando de nutrientes advindos do seu hospedeiro. Já a sua capacidade de sobreviver em condições hipóxicas está relacionada a ausência de genes que codifiquem enzimas que protejam o microrganismo contra a toxicidade do oxigênio (FIELDSTEEL; STOUT; BECKER, 1979; FRASER *et al.*, 1998; LAFOND; LUKEHART, 2006; SINGH; ROMANOWSKI, 1999).

2.3 PATOGENIA/INFECCÃO

A sífilis é uma infecção sexualmente transmissível (IST), crônica, sistêmica e restrita aos seres humanos. Normalmente os indivíduos adquirem a infecção durante relação sexual sem proteção, quando um dos parceiros está infectado (STOLTEY; COHEN, 2015). Uma gestante infectada também pode transmitir a bactéria para o feto, por via transplacentária, bem como durante o parto ou na amamentação. Neste sentido, a transmissão vertical é outro meio de transmissão significativa e está relacionada ao número de casos de sífilis congênita, óbito fetal e neonatal (MATTHES *et al.*, 2012; SARACENI *et al.*, 2017). De forma menos comum, a infecção pode ser obtida através do contato com lesões treponêmicas e pela exposição ao sangue ou fluidos corpóreos contaminados (ZHOU *et al.*, 2009; FANFAIR *et al.*, 2014; YU; ZENGH, 2016).

O diagnóstico precoce contribui para um bom prognóstico, pois se não tratada de início, a infecção pode evoluir para um estágio crônico com sequelas irreversíveis em vários componentes do organismo, como cérebro, nervos, olhos e coração (JUNIOR, 2007). Considerando estes fatores, a infecção é um importante agravo para a saúde pública, pois além de ser infectocontagiosa e causar danos severos ao organismo, já foi relatado aumento significativo no risco de se contrair o vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) através das lesões sifilíticas, como também acelera a progressão para a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS, do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) (BARSANTI *et al.*, 1999; NIRAGIRA *et al.*, 2016).

T. pallidum é caracterizado como um organismo altamente invasivo que não produz toxinas potentes, mas causa efeitos citopáticos quando presente em altas concentrações. Sua disseminação e colonização são resultantes da motilidade em “saca-rolhas”, da disseminação hematogênica, aderência e penetração das camadas de células epiteliais e outras barreiras, como também da sua capacidade de evasão do sistema imunológico. Grande parte dos sinais e sintomas da infecção se deve à reação inflamatória e ao dano tecidual ocasionado pelo mecanismo de invasão (NORRIS; COX; WEINSTOCK, 2001).

O seu genoma não revela fatores clássicos de virulência, característicos das bactérias Gram-negativas, os quais poderiam explicar os sinais e sintomas da infecção. Em suma, é demonstrada carência de enzimas citolíticas, exotoxinas e lipopolissacarídeo (LPS). Desta forma, os aspectos patogênicos da sífilis são relacionados aos (a) genes associados à motilidade

e (b) genes *tpr*, que codificam proteínas da membrana externa que atuam como porinas e adesinas (CASAL; ARAÚJO; CORVELO, 2012).

Na sífilis adquirida, a bactéria penetra no organismo durante a atividade sexual, através da mucosa íntacta ou lesões microscópicas teciduais que tenham contato com a pele ou mucosas de indivíduos com lesões infecciosas. No estágio primário, dentro de dias a semanas pós-exposição, a bactéria se multiplica no local do inóculo e se dissemina através do sistema linfático e circulatório, espalhando-se pelo organismo e resultando em uma infecção sistêmica. Após isto, ocorre o aparecimento de uma lesão característica no local de inoculação, denominada cancro duro (NORRIS; COX; WEINSTOCK, 2001; SANDES, 2016). Na sífilis congênita, o microrganismo se dissemina para o feto por via hematogênica, predominantemente por via transplacentária. Este mecanismo de transmissão é evitável quando a infecção é identificada e tratada adequadamente tanto na gestante quanto em seus parceiros sexuais (BRASIL, 2015a).

De acordo com a evolução natural da infecção, a partir da exposição ao microrganismo, a resposta da defesa local resulta em uma erosão e exulceração no ponto de inoculação da bactéria, enquanto a disseminação sistêmica se caracteriza pela produção de complexos imunes circulantes que podem depositar-se nos órgãos. No entanto, apesar de haver produção de anticorpos específicos, a imunidade humoral não confere memória imunológica e a imunidade celular, por ser tardia, permite que a bactéria se multiplique e sobreviva por longos períodos (AVELLEIRA; BOTTINO, 2006).

2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

2.4.1 Sífilis Adquirida

De acordo com diferentes diretrizes, a sífilis adquirida é dividida em precoce ou ativa (incluindo infecção primária, secundária e latente precoce) e tardia (incluindo infecção latente tardia e terciária). Indivíduos com sífilis adquirida não tratada, geralmente seguem o curso da doença e evoluem para os 4 estágios clínicos (PEELING *et al.*, 2017b):

a) Primária: caracteriza-se pelo aparecimento de uma úlcera (cancro duro) no local de inoculação, classificada como única, de fundo limpo, indolor, de base endurecida e rica em treponema. No homem (Figura 3A), a lesão se localiza na genitália, mais comumente no sulco

bálano-prepucial e glande, enquanto na mulher (Figura 3B), as lesões podem acometer o interior do trato genital ou nas partes externas, como os grandes e pequenos lábios (O'BYRNE; MCPHERSON, 2019; HOOK, 2017; PEELING *et al.*, 2017b). Também podem haver lesões primárias em locais extragenitais como ânus, área perianal e boca (GOH, 2005). Neste estágio pode ocorrer uma linfadenopatia regional, com aumento moderado dos gânglios linfáticos (HOOK, 2017; GOH, 2005). Com o tratamento, as lesões desaparecem dentro de alguns dias. Sem tratamento, após um período de 3 a 6 semanas, as lesões primárias desaparecem espontaneamente, sem cicatrizes, seguidas por manifestações secundárias (HOOK, 2017; PEELING *et al.*, 2017b).

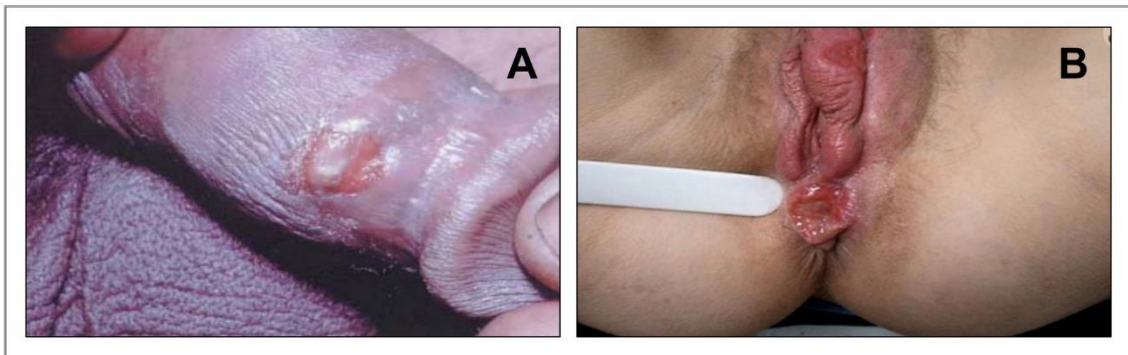


Figura 3: Lesões da sífilis primária em homem (A) e em mulher (B).

Fonte: Chernyadyev *et al.* (2018) e Goh (2005).

b) Secundária: os sinais e sintomas aparecem 2 semanas a 6 meses (média de 2-12 semanas) após a exposição. As lesões secundárias podem ocorrer simultaneamente ou até 8 semanas após o cancro (O'BYRNE; MCPHERSON, 2019). Caracteriza-se como uma fase com grande número de manifestações clínicas resultantes da disseminação hematogênica das espiroquetas durante a fase inicial (FORRESTEL *et al.*, 2020). Podem ocorrer erupções cutâneas em forma de máculas (roséola), principalmente no tronco (Figura 4A), lesões eritemato-escamosas palmo-plantares (não patognomônico, Figura 4B), placas eritematosas branco-acinzentadas nas mucosas (Figura 4C), lesões pápulo-hipertróficas nas mucosas ou pregas cutâneas (condiloma plano, Figura 4D), alopecia irregular, febre, cefaleia, adenopatia indolor generalizada. As lesões secundárias são altamente infecciosas. Nesta fase, há presença significativa de resposta imune (FORRESTEL *et al.*, 2020; O'BYRNE; MCPHERSON, 2019; SINGH; ROMANOWSKI, 1999).

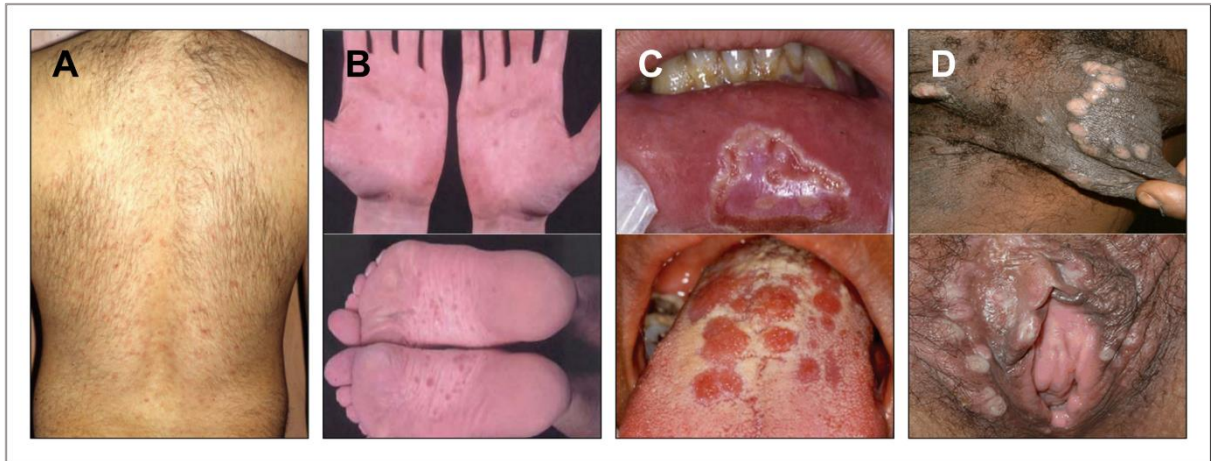


Figura 4: Lesões causadas na sífilis secundária.

Legenda: (A) Máculas ou roséolas no tronco; (B) Lesão palmo-plantar; (C) Placas branco-acinzentadas na mucosa oral; e (D) Condiloma plano em homem (acima) e mulher (abaixo).

Fonte: Ramírez-Amador *et al.* (2013); Carlson *et al.* (2011); Cruz *et al.* (2010); Ficarra e Carlos (2009); Goh (2005); Castro (2004).

c) Latente: a sífilis secundária não tratada é marcada por resolução espontânea em 3 a 12 semanas, com o desaparecimento de lesões e sintomas e evolução para o estado assintomático, chamado de latência (BAUGHN; MUSER, 2005). É definido como recente, dentro de dois anos, e tardio, após dois anos, terminando com o desenvolvimento da sífilis terciária. A divisão entre latente precoce e tardia é uma diferenciação que afeta as decisões de tratamento e as recomendações de notificação de parceiros, além disto, é de importância clínica, pois aproximadamente 25% dos pacientes desenvolverão recorrência da infecção secundária durante o estágio latente precoce (O'BYRNE; MCPHERSON, 2019; HOOK, 2017). A sífilis latente é definida como o período no qual os pacientes são sororreativos, mas não possuem outras evidências clínicas da infecção (BAUGHN; MUSER, 2005).

d) Terciária: alguns indivíduos na fase latente, progridem para a fase terciária ou sífilis sintomática tardia, caracterizada por ser uma fase inflamatória lentamente progressiva que pode afetar qualquer órgão 20-40 anos após a infecção inicial. A infecção tardia não tratada pode levar a complicações irreversíveis como sífilis cardiovascular (aneurisma da aorta, valvopatia aórtica), neurosífilis (meningite, hemiplegia, derrame, afasia, convulsões, *tabes dorsalis*) ou inflamação e destruição dos tecidos (Figura 5) pelas lesões de granulomatose (LASAGABASTER; GUERRA, 2019; TUDOR; AL; GOSSMAN, 2019; HOOK, 2017).



Figura 5: Goma sífilítica em pele de indivíduo com sífilis terciária.
Fonte: Ngwanya, Kakande e Khumalo (2017).

2.4.2 Sífilis Congênita

A sífilis congênita é uma infecção de transmissão vertical, entre o segundo e terceiro semestre de gestação, que ocorre devido às infecções primárias ou secundárias não tratadas na gestante. É ocasionada por uma disseminação hematogênica da bactéria, que provoca uma infecção generalizada, comprometendo praticamente todos os sistemas e tecidos do organismo. As consequências da gravidez associadas à sífilis incluem morte fetal precoce, natimorto, parto prematuro, baixo peso ao nascer e morte neonatal (WIJESOORIYA *et al.*, 2016; CAVAGNARO *et al.*, 2014). O quadro clínico varia a depender do estágio da infecção, que se divide em sífilis congênita:

a) Precoce: caracterizada por manifestações clínicas até o segundo ano de vida da criança. Normalmente ocorre hepatomegalia com ou sem esplenomegalia (Figura 6A), erupções cutâneas eritematosas e lesões descamativas palmo-plantares (Figura 6B), osteocondrite, pneumonia, rinite sero-sanguinolenta, linfadenopatia generalizada, síndrome nefrótica, hidropsia, glaucoma, catarata entre outras (HESTON; ARNOLD, 2018; CAVAGNARO *et al.*, 2014).



Figura 6: Lesões da sífilis congênita precoce.

Legenda: (A) hepatoesplenomegalia; (B) lesões cutâneas.

Fonte: Peeling *et al.* (2017b); Brighi *et al.* (2011); Karthikeyan (2005).

b) Tardia: surge após o segundo ano de vida da criança. Dentre as manifestações clínicas inclui-se tibia em “lâmina de sabre” (Figura 7A), dentes incisivos medianos superiores deformados (dentes de *Hutchinson*; Figura 7B), articulações de Clutton, fronte “olímpica”, nariz “em sela” (Figura 7C), molares em “amora”, rágades, mandíbula curta, arco palatino elevado, ceratite intersticial, uveíte, úlcera corneal, surdez, retardo mental, hidrocefalia, atrofia do nervo óptico, síndrome convulsiva entre outras (HESTON; ARNOLD, 2018; CAVAGNARO *et al.*, 2014).

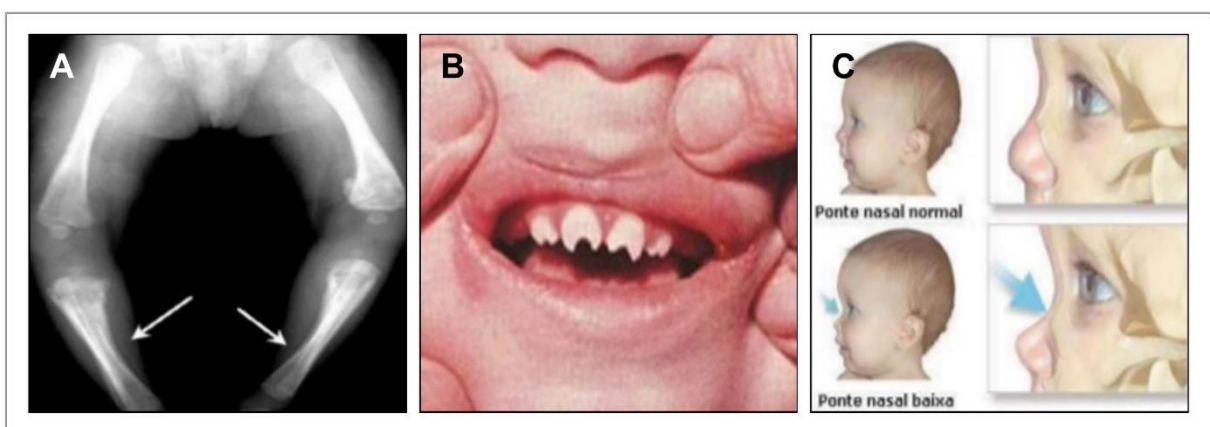


Figura 7: Sinais clínicos da sífilis congênita tardia.

Legenda: (A) Tíbia em “lâmina de sabre”; (B) Dentes incisivos medianos superiores deformados (dentes de *Hutchinson*); e (C) Nariz “em sela”.

Fonte: Mon’Alveme (2015). Disponível em:

<https://www.slideshare.net/rodrigomontalverne1/sfilis-cognita-rodrigo-montalverne>>. Acesso em 16 de novembro de 2018.

2.5 EPIDEMIOLOGIA

Dentre as ISTs, a sífilis persiste como um problema de saúde pública, com incidência anual estimada em 6 milhões de casos no mundo em indivíduos com idade entre 15 a 49 anos (NEWMAN *et al.*, 2015). Desde 1990, a incidência da infecção aumentou entre indivíduos de todas as faixas etárias e de diferentes etnias (MATTEI *et al.*, 2012). Mundialmente, cerca de um milhão de gestantes são infectadas a cada ano, ocasionando aproximadamente 300 mil mortes fetais e neonatais e colocando em risco de morte prematura mais de 200 mil crianças (BRASIL, 2017).

Apesar da existência de testes diagnósticos e tratamento eficaz, a sífilis ressurgiu em alguns países, como Estados Unidos, Canadá, Europa, Rússia, China e Brasil. Tal fato chama a atenção para um cenário de crise na saúde pública, principalmente pela sinergia entre a epidemiologia e biologia da sífilis com o HIV (STAMM, 2015). Esse crescimento recente do número de casos marcou uma nova era da transmissão da infecção, sendo ainda mais persistente em sistemas de saúde pública da América Latina, Ásia e África (KITAYAMA *et al.*, 2017).

Na Austrália, a maioria dos casos da infecção está relacionada aos homens que fazem sexo com homens com idade entre 39 a 49 anos, com um aumento de 20% nas taxas de 2012 comparadas as de 2008 (BRIGHT; DUPS, 2016). Além disso, um estudo utilizando a Base de Dados de Doadores do Serviço Nacional de Sangue da Austrália mostrou que a prevalência da sífilis ativa aumentou durante o período do estudo (2005 a 2010) entre os doadores de sangue (LUCKY *et al.*, 2013). Em relação aos casos reportados na China, dados do sistema de vigilância de infecções mostraram que o número de casos saltou de 135.210 em 2005 para 441.818 em 2014 (ZHANG *et al.*, 2016). De acordo com estudos realizados em diversas cidades chinesas, entre diferentes grupos, constatou-se que, entre 2010 e 2014, a prevalência da infecção foi maior entre os homens que fazem sexo com homens (HU *et al.*, 2017).

Em 2013, 22.237 casos foram notificados em 29 Estados membros da União Europeia, com uma taxa global de 5,4 notificações por 100.000 habitantes. A sífilis foi relatada cinco vezes mais em homens do que em mulheres (8,4 notificações por 100.000 homens e 1,6 mulheres). As maiores taxas foram entre os homens que fazem sexo com homens (58%) comparados aos heterossexuais (35%), sendo 34% dos casos de sífilis com co-infecção pelo HIV (ECDC, 2015).

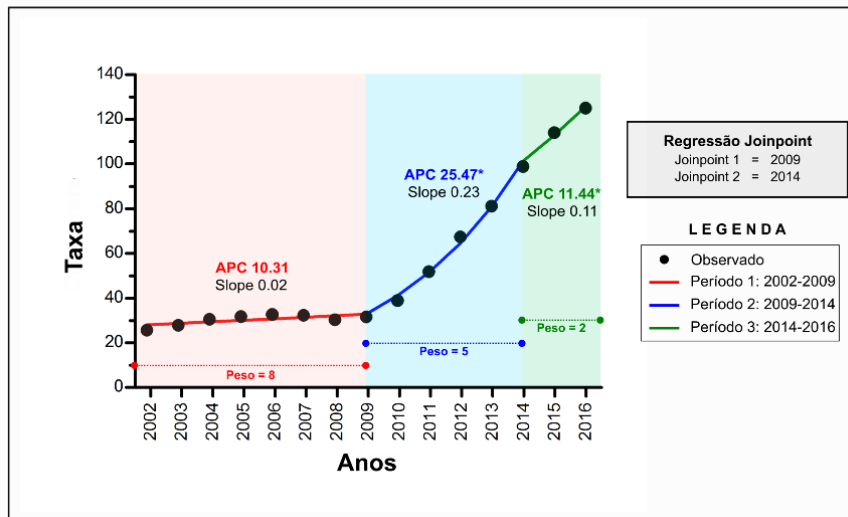
Nos Estados Unidos, entre 2015 e 2016, observou-se que as taxas de sífilis primária e secundária aumentaram na população acima de 15 anos, independente de raça, etnia e região

do país. No entanto, em 2016, o aumento foi maior entre homens (15,6 casos por 100.000 homens) do que entre mulheres (1,9 casos por 100.000 mulheres). Nos casos de co-infecção com o HIV, a percentagem foi de 47,0% para homens que fazem sexo com homens, 10,7% para heterossexuais masculinos e 4,1% para mulheres. Para os diferentes grupos étnicos que residem nos Estados Unidos, percebeu-se que, entre os negros americanos, a taxa foi de 23,1 casos/100.000, 12,9 casos/100.000 entre os nativos havaianos/outras ilhas do Pacífico, 10,9 casos/100.000 para os hispânicos americanos, 8,0 casos/100.000 entre os índios americanos/nativos do Alasca, 4,9 casos/100.000 para brancos americanos e 3,9 casos/100.000 entre os americanos de origem asiática (KOJIMA; KLAUSNER, 2018).

Considerando a América Latina, a sífilis em gestantes apresenta uma prevalência de 2,6%. Um estudo desenvolvido em Lima, Peru, mostrou uma prevalência de 16,8% entre os homens que fazem sexo com homens e 6,7% em mulheres transgêneros. Para ambos os grupos, a co-infecção pelo HIV obteve prevalência de 44,2% e 66,7%, respectivamente (KOJIMA *et al.*, 2017). Um estudo retrospectivo conduzido entre homens infectados pelo HIV residentes em Buenos Aires, Argentina, relatou uma incidência de 14,9 casos de sífilis por 100 infectados/ano (BISSIO *et al.*, 2016).

No Brasil, entre 2001 e 2017, foram notificados 188.630 casos de sífilis congênita e 235.895 em gestantes. A taxa média de casos reportados foi de 5,38 por 100.000 habitantes por ano para a sífilis congênita, variando de 2,5 a 12,36. Quanto à sífilis em gestantes, a taxa média foi de 6,33, variando de 0,02 a 19,05. Empregando o Joinpoint como modelo de regressão (KIM *et al.*, 2000), foram observados que no período de estudo houve três momentos epidemiológicos distintos, denominados APC (variações percentuais anuais, do inglês *annual percentage change*) (Figura 8). Tanto para a sífilis em gestantes quanto congênita, a incidência aumentou significativamente do primeiro ao terceiro períodos encontrados. Das 558 microrregiões brasileiras, 549 (98,4%) e 558 (100%) notificaram, respectivamente, pelo menos um caso de sífilis congênita (Figura 9B) e de sífilis em gestantes (Figura 9A) durante o período de estudo (SILVA *et al.*, submetido).

Sífilis congênita



Sífilis em gestantes

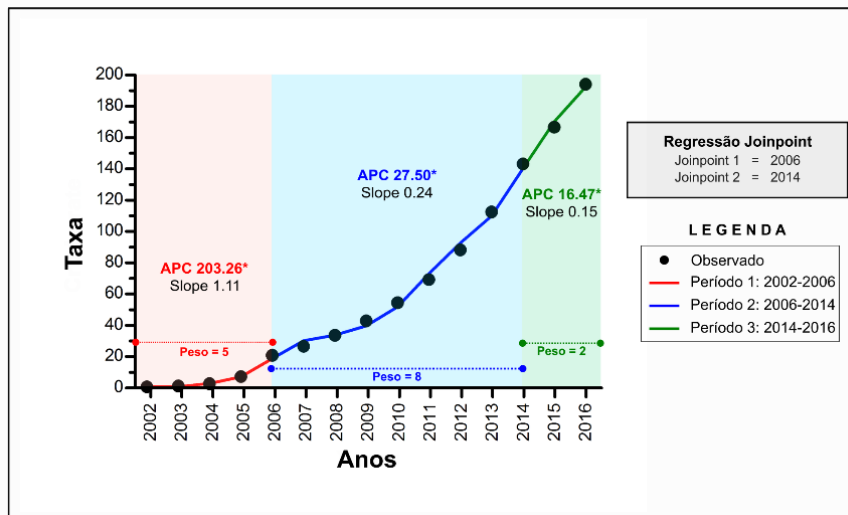


Figura 8: Incidência da sífilis congênita e em gestantes no Brasil de 2001 a 2017.

Legenda: Taxa de casos de sífilis congênita e em mulheres grávidas notificados no Brasil por 100.000 habitantes, de 2002 a 2016, de acordo com os registros do SINAN. Três variações percentuais anuais (APC) foram identificadas no modelo de regressão Joinpoint: (A) APC 1 (2002-2006), APC 2 (2006-2014) e APC 3 (2014-2016); (B) APC 1 (2002-2009), APC 2 (2009-2014) e APC 3 (2014-2016). A linha tracejada representa 1,00 caso por 100.000 habitantes. APC (variação percentual anual).

Fonte: O autor.

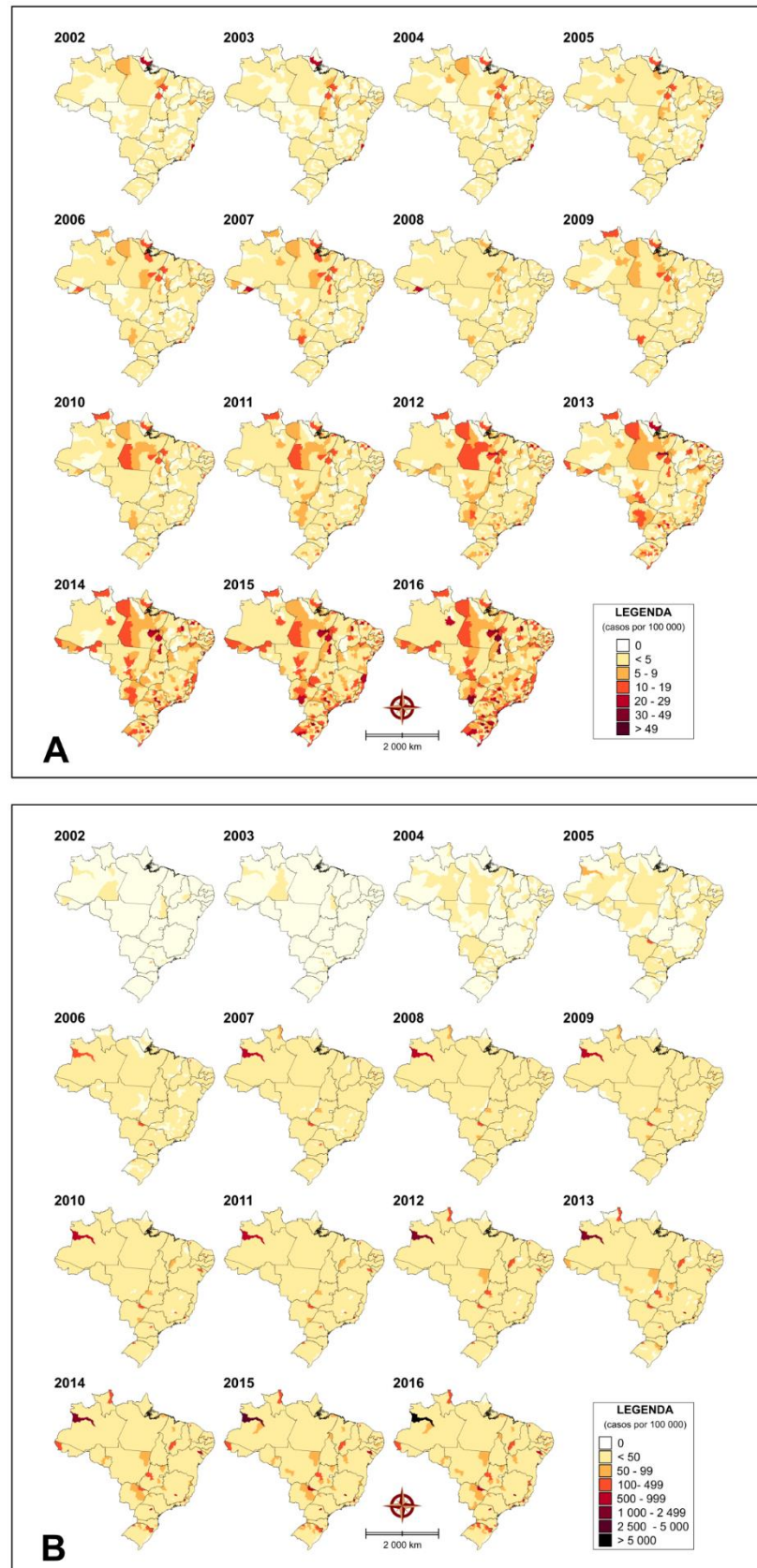


Figura 9: Distribuição espaço-temporal da sífilis em gestantes (A) e congênita (B) no Brasil de 2001 a 2017.

Fonte: O autor.

De 2010 a 2018, os casos de sífilis adquirida não mostraram mudanças percentuais anuais (APC). Cerca de 479.731 casos de sífilis adquirida foram reportados neste período, com uma taxa média de 236,6 casos por 100.000 habitantes por ano. Dos 26 estados mais o Distrito Federal, todos notificaram pelo menos um caso de sífilis adquirida (Figura 10) durante o período de estudo, com destaque para os estados da região sul (SILVA *et al.*, submetido).

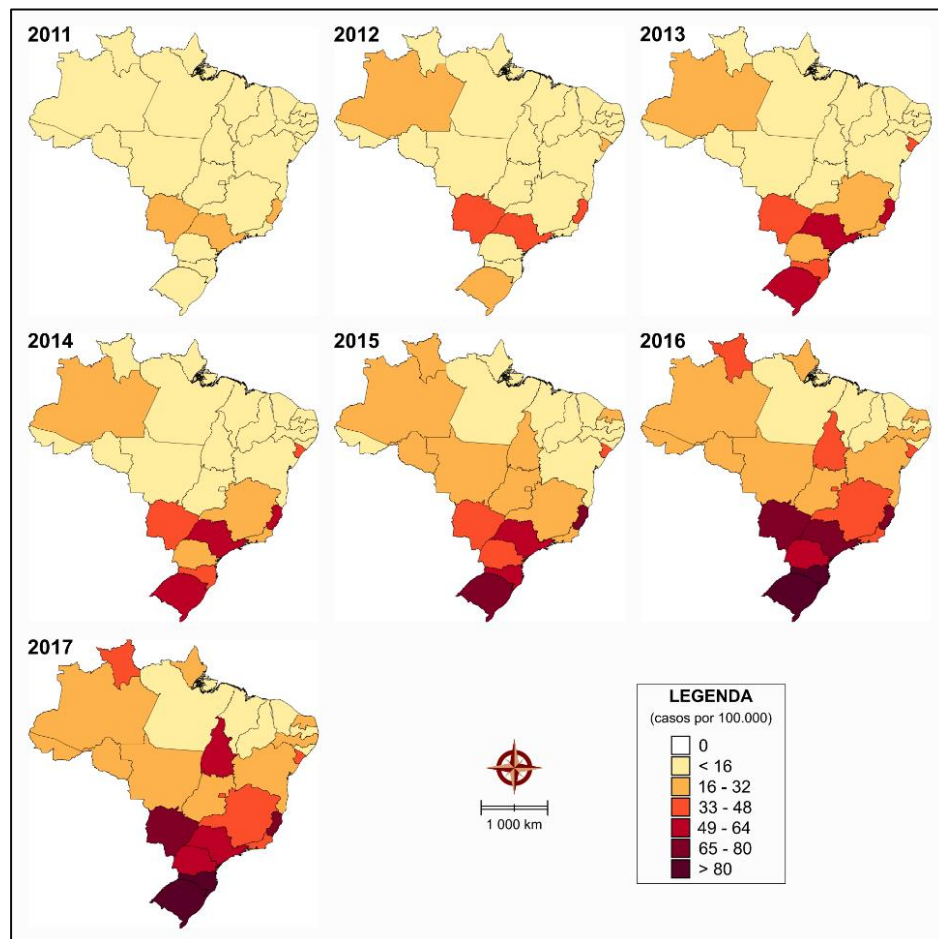


Figura 10: Distribuição espaço-temporal da sífilis adquirida no Brasil de 2010 a 2018.

Fonte: O autor.

O aumento do número de casos de sífilis congênita e em gestantes no Brasil, indica que a estratégia da testagem pré-natal seguida pelo tratamento das gestantes, seus parceiros e dos recém-nascidos, é aplicada de maneira falha ou insuficiente. Além disto, a ampliação da cobertura de testagem, fazendo assim mais significativos os números de casos, e o desabastecimento mundial da penicilina, também podem explicar este aumento (BRASIL, 2017). Além disso, dados de vigilância mostram que no perfil geral dos infectados há relatos de altos números de parceiros sexuais, sexo sem preservativo, uso de drogas recreativas e o uso de aplicativos de redes sociais para busca de parceiros sexuais (NYATSANZA; TIPPLE, 2016).

2.6 RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Em um hospedeiro infectado, o sistema imunológico inato e adaptativo recrutam células para o local da infecção, através da indução das adesinas ICAM-1, VCAM-1 e E-selectinas e liberação de citocinas, que aumenta a ativação endotelial e recruta os leucócitos polimorfonucleares (PMN). Células dendríticas especializadas são responsáveis pelo reconhecimento das lipoproteínas da bactéria através dos receptores TLR2 (*toll like receptors*) e juntamente com os macrófagos estimulam a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) e interleucina-12 (IL-12), responsáveis por uma reação inflamatória severa presente na sífilis. Nas lesões primárias e secundárias pode ser detectada a presença de interferon gama (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2), responsáveis pela ativação de macrófagos e proliferação de células T auxiliares (CD4⁺) e T citotóxicas (CD8⁺), respectivamente (CASAL; ARAÚJO; CORVELO, 2012).

Na sífilis, a resposta imune humoral possui 2 características distintas: os anticorpos treponêmicos, direcionados contra os antígenos polipeptídicos de *T. pallidum* e os anticorpos não-treponêmicos direcionados contra antígenos lipoidais (COX *et al.*, 2010; LARSEN; STEINER; RUDOLPH, 1995). A origem dos anticorpos não treponêmicos possui duas teorias: a primeira é que os complexos de cardiolipina são liberados das células hospedeiras danificadas pelo treponema e provocam uma reação autoimune (RADOLF; LUKEHART, 2006) e a segunda diz que os anticorpos não treponêmicos são induzidos pelos lipídios de *T. pallidum* (RADOLF; LUKEHART, 2006; SCHULTZ, 1997; DONIACH *et al.*, 1970).

Os anticorpos treponêmicos IgM são produzidos em aproximadamente 2 semanas pós-exposição ao agente infeccioso, com posterior diminuição dentro de 6 a 12 meses, em fases mais tardias e pós-tratamento (adequação da terapia). Duas semanas após a produção do IgM, começam a ser produzidos os anticorpos IgG, que se mantêm persistentes por anos, apesar da terapia, e permanecem aumentados nos infectados com maior duração dos sintomas. Estas respostas são específicas para o mesmo grupo de proteínas antigênicas treponêmicas. Ambos os anticorpos podem ser detectados dentro de 3 dias após o aparecimento do cancro (SEÑA; WHITE; SPARLING, 2010).

Embora as lipoproteínas de superfície sejam demonstradas para outras espiroquetas patogênicas, incluindo *Borrelia* spp. e *Leptospira* spp., a membrana externa do *T. pallidum* apresenta escassez de proteínas, cerca de 100 vezes menos do que as bactérias Gram-negativas típicas, que poderiam servir como alvos de anticorpos específicos. Este pode ser o motivo para

a cronicidade da infecção, pois a bactéria não é combatida pelo sistema imunológico de maneira eficaz (BLANCO; MILLER; LOVETT, 1997; RADOLF; NORGARD; SCHULZ, 1989). Apesar do relatado, os efeitos inflamatórios de *T. pallidum* são primariamente mediados por lipoproteínas da membrana citoplasmática. Pelo menos nove polipeptídios com massas moleculares aparentes de 15 (TpN15), 17 (TpN17), 33, 37 (TpN37), 39, 43, 45 (TnpA), 47 (TpN47) e 97 kDa já foram identificados como imunogênicos. Entre estas proteínas, pelo menos cinco mostraram ser de relevância diagnóstica, sendo elas o TnpA, TpN37, TpN47, TpN17 e TpN15 (DANG *et al.*, 2006; SAMBRI *et al.*, 2001a).

Durante a sífilis primária são produzidos anticorpos contra a TpN47 e as flagelinas TpN37, TpN33 e TpN30. Já na sífilis secundária e latente recente, os anticorpos são reativos principalmente para TpN47, TpN44.5a, TpN37, TpN34.5, TpN33, TpN30, TpN17 e TpN15. No entanto, esta reatividade diminui em indivíduos que evoluem para a sífilis latente tardia e terciária, permanecendo reativas somente algumas imunoglobulinas do tipo G, o que justifica a positividade dos testes treponêmicos mesmo após o tratamento, comparados aos não treponêmicos (NORRIS; COX; WEINSTOCK, 2001).

2.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Segundo o Manual Técnico para Diagnóstico da Sífilis, do Ministério da Saúde (2016), os testes diagnósticos são divididos em duas categorias: exames diretos e testes imunológicos indiretos.

2.7.1 Exames diretos

Os exames diretos são capazes de fornecer um diagnóstico de certeza a partir da identificação direta do *T. pallidum* em tecidos ou exsudato de lesões (ZILHÃO *et al.*, 2004).

2.7.1.1 Exame em campo escuro

A pesquisa do *T. pallidum* por microscopia de campo escuro é realizada pela análise do exsudato seroso de lesões ativas, podendo ser primárias ou secundárias. Possui sensibilidade de 74% a 86% e especificidade de até 97% (BRASIL, 2015a). A identificação é realizada a partir

da visualização da bactéria viva, na forma de corpos espiralados brilhantes e brancos, iluminados contra um fundo negro, além da sua motilidade típica (Figura 11).

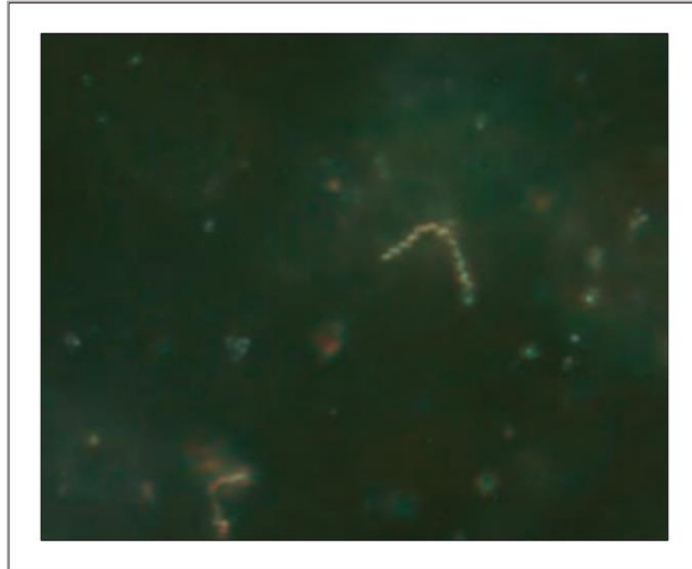


Figura 11: *Treponema pallidum* visualizado em microscopia de campo escuro.
Fonte: Brasil (2015b).

2.7.1.2 Material corado

O exsudato seroso de lesões ativas pode ser corado pelos métodos de Fontana-Tribondeau (nitrito de prata em esfregado seco da amostra), Burri (tinta da China ou nanquim), Giemsa (cora palidamente) e Levaduti (prata em cortes histológicos). Estes apresentam sensibilidade inferior ao exame de campo escuro (AVELLEIRA; BOTTINO, 2006).

2.7.1.3 Reação em Cadeia da Polimerase

A reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) possui sensibilidade de 80-100% e especificidade de 92.1-99.8%, sendo relevante para o diagnóstico de infecções causadas por organismos não cultiváveis, como o *T. pallidum* (FRAGA, 2013; NYATSANZA; TIPPLE, 2016). A PCR detecta de 1 a 10 organismos por espécime clínica e é útil para o diagnóstico da sífilis congênita, neurosífilis e sífilis primária precoce. É o método mais indicado para lesões orais e amostras de líquido cefalorraquidiano (JANIER *et al.*, 2015; RATNAM, 2005). No entanto, comparado ao método tradicional, estudos mostram que a PCR

em tempo real apresenta potencial como ferramenta de diagnóstico molecular altamente confiável, econômica e útil para a triagem em larga escala de amostras clínicas, além de ser mais rápida e sensível (GLATZ *et al.*, 2014; HEYMANS *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2015).

2.7.2 Testes imunológicos

O diagnóstico de triagem e confirmação da sífilis, baseia-se em testes sorológicos (ZILHÃO *et al.*, 2004), os quais são capazes de detectar anticorpos específicos ou não, podendo ser divididos em testes não treponêmicos e testes treponêmicos (RATNAM, 2005).

2.7.2.1 Testes não treponêmicos

São rápidos, simples, de baixo custo e úteis para o monitoramento da evolução da infecção durante e após o tratamento, bem como na detecção de reinfecções. Todos os testes disponíveis detectam anticorpos IgG e IgM produzidos contra produtos liberados durante a infecção, como a cardiolipina, não específicos do *T. pallidum*. Normalmente a produção de imunoglobulinas ocorre entre 1 a 2 semanas após o aparecimento do cancro e é considerada uma resposta contra o material lipídico, tanto da superfície celular da bactéria quanto da mitocôndria, devido à infecção e invasão tecidual. Porém, estes anticorpos também podem ser produzidos em outras condições infecciosas associadas à inflamação, como alterações imunes e até durante a gestação (CLYNE; JERRARD, 2000).

Os testes não treponêmicos tornam-se positivos uma a quatro semanas após o aparecimento do cancro primário e seis semanas após a exposição. Têm como limitações a baixa sensibilidade na sífilis primária e latente tardia e resultados falso-negativos devido ao fenômeno de pró-zona e às reações cruzadas com outras infecções que levam à destruição celular. Por este motivo, não são testes capazes de definir o diagnóstico da sífilis (RATNAM, 2005). Podem ser qualitativos (informam a presença ou ausência de anticorpos) ou semi-quantitativos (estimam a quantidade de anticorpos presentes, informando a fase de infecção atual e a resposta ao tratamento). A semi-quantificação só é realizada em amostras reagentes nos testes qualitativos, a partir de diluições seriadas, considerando-se como resultado a última titulação que ainda apresentar reatividade. Para esta finalidade existem quatro testes aprovados como padrão pelo Centro de Controle e Prevenção de Infecções dos Estados Unidos (CDC, do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*), que utilizam o método de floculação: VDRL (*Veneral Disease Reach Laboratory*), RPR (*Rapid Plasma Reagin*), USR (*Unheated Serum Reagin*) e

TRUST (*Toluidine Red Unheated Serum Test*). O VDRL baseia-se no uso de uma suspensão antigênica composta por uma solução alcoólica contendo cardioplipina, colesterol e lecitina purificada (Figura 12) (BRASIL, 2015a).

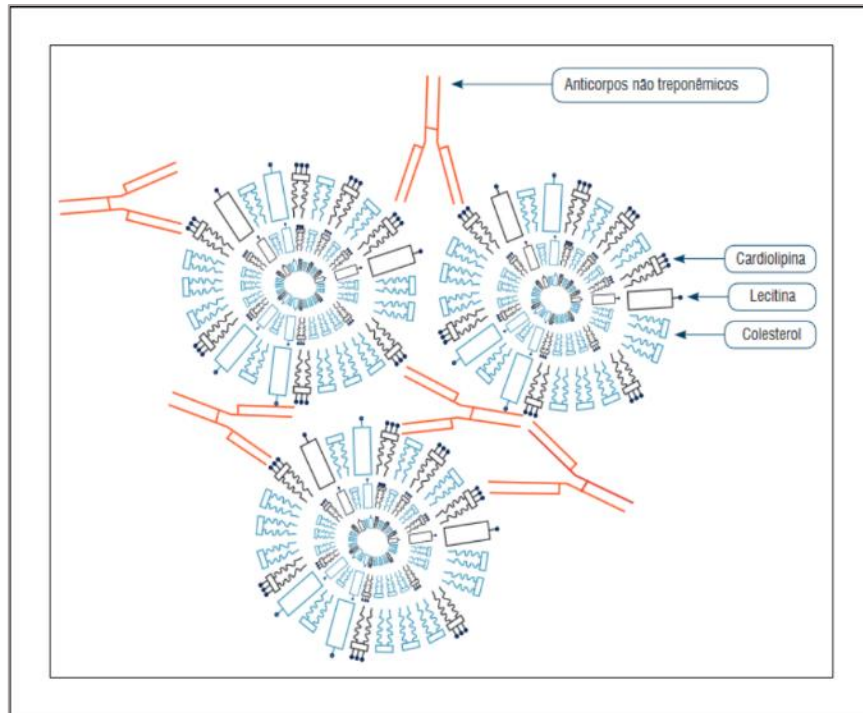


Figura 12: Desenho esquemático demonstrando a reação dos testes não treponêmicos.

Legenda: Os componentes da suspensão antigênica (lecitina, micropartículas de colesterol e o antígeno cardioplipina) se ligam ao acaso formando micelas. As reagentes, quando presentes na amostra do paciente, ligam-se às cardioplipinas das micelas formando imunocomplexos. A ligação destes anticorpos a várias micelas forma a floculação. Os flocos podem ser pequenos e/ou grandes e são visualizados ao microscópio (VDRL/USR) ou a olho nu (RPR/TRUST).

Fonte: Brasil (2014).

A necessidade de aumentar a estabilidade da suspensão antigênica, a possibilidade de usar plasma como amostra (RPR e TRUST) e a leitura do resultado a olho nu (RPR e TRUST) levou à criação de testes adaptados a partir do VDRL (BRASIL, 2016). Além disso, a adição de cloreto e EDTA permitiu ao USR usar plasma ou soro não aquecido como uma matriz de amostra aceitável. Diferente do VDRL, que necessita de microscópio, a leitura do RPR a olho nu só foi possível devido a adição de partículas de carvão à suspensão antigênica. Já no TRUST, as partículas de carvão foram substituídas por partículas vermelhas de toluidina (MORSHED; SINGHB, 2015).

2.7.2.2 Testes treponêmicos

São exames que utilizam lisados completos de *T. pallidum* ou antígenos treponêmicos recombinantes a fim de detectar anticorpos específicos (IgM e IgG) contra a espiroqueta. Em alguns países, são realizados como testes de triagem ou confirmatórios, a depender do algoritmo diagnóstico utilizado. Como teste confirmatório, normalmente são utilizados para excluir resultados que foram falso-positivos nos testes não treponêmicos (FRAGA, 2013).

Os testes treponêmicos normalmente são os primeiros a apresentarem resultados positivos após a infecção, como na sífilis primária. Também são úteis quando os testes não treponêmicos apresentam baixa sensibilidade, como na sífilis tardia. Nos casos em que os testes treponêmicos e não treponêmicos são positivos, a especificidade do resultado é considerada alta, confirmando, assim, o diagnóstico (BRASIL, 2016).

Apesar destas vantagens, algumas desvantagens já foram descritas. Em indivíduos infectados, com ou sem tratamento, os exames permanecem reativos por anos. Além disso, os títulos de anticorpos não apresentam correlação com a atividade da infecção, por isso não são úteis em avaliar a eficácia do tratamento, recaída ou reinfeção em indivíduos já tratados, e também não são capazes de diferenciar sífilis venérea da endêmica (bouba e pinta) (RATNAM, 2005).

De acordo com o Manual Técnico para Diagnóstico da Sífilis do Ministério da Saúde (2016), várias metodologias, descritas a seguir, podem ser utilizadas para o diagnóstico da sífilis. Em sua grande maioria, estes testes utilizam antígenos treponêmicos recombinantes como, por exemplo, TpN17, TpN15 e TpN47 (SEÑA; WHITE; SPARLING, 2010).

- O teste de fluorescência (FTA-ABS, do inglês *Fluorescent Treponemal Antibody-absorption*) é o primeiro teste, após a infecção, a tornar-se reativo e é um dos mais utilizados. Apresenta elevada especificidade (97%), mas limita-se a determinar a fase da infecção, pois permanece reagente por toda a vida do indivíduo (SEÑA; WHITE; SPARLING, 2010). Lâminas sensibilizadas com antígenos do *T. pallidum* (cepa *Nichols*), obtidos do testículo de coelhos infectados, são utilizadas no ensaio. A amostra sérica é colocada na lâmina seguida pela adição de imunoglobulina anti-humana (antigamaglobulina) marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*). Se a amostra possuir anticorpos anti-*T. pallidum* ocorrerá a ligação aos antígenos fixados na lâmina, formando um complexo antígeno-anticorpo. Conseqüentemente, a antigamaglobulina se liga aos imunocomplexos levando a formação de uma reação de cor verde-maçã brilhante, visualizada ao microscópio de fluorescência (Figura 13) (BRASIL, 2016).

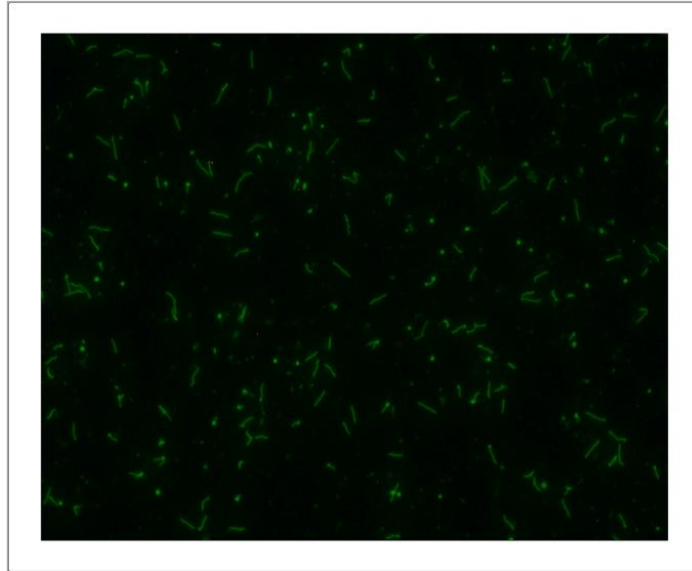


Figura 13: Teste FTA-Abs positivo mostrando espiroquetas do *Treponema pallidum* fluorescentes.
Fonte: O autor.

- O ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA, do inglês *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) é um teste imunoenzimático que utiliza antígenos totais ou sintéticos do *T. pallidum* como matriz antigênica. As amostras são adicionadas às placas de poliestireno E na presença de anticorpos anti-*T. pallidum*, haverá ligação aos antígenos, formando o complexo antígeno-anticorpo. Após esta reação, adiciona-se um conjugado anti-humano, composto por IgG marcado com peroxidase, que se liga aos imunocomplexos formando a interação antígeno-anticorpo-conjugado. No final, é adicionado o substrato para detecção do complexo, resultando em uma cor visível. A leitura é realizada em um espectrofotômetro. A intensidade de cor é diretamente proporcional à quantidade de anticorpos presentes na amostra (Figura 14) (BRASIL, 2016).

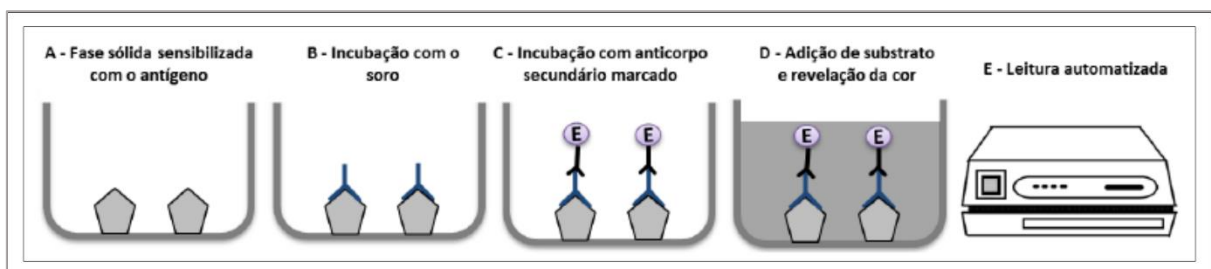


Figura 14: Reação do teste de ELISA.

Legenda: sensibilização da fase sólida com antígenos (A), incubação com o soro diluído (B), incubação com conjugado anti-humano IgG marcado com enzima (C), adição do substrato (D) e leitura da microplaca (E).

Fonte: Santos (2016).

- O teste de quimiluminescência consiste em pérolas revestidas com antígenos do *T. pallidum*. O material biológico é adicionado e anticorpos específicos, quando presentes na amostra, ligam-se às pérolas sensibilizadas formando um imunocomplexo. Em seguida, a revelação pode ser utilizando IgG marcada com ficoeritrina ou através do uso de um conjugado com isoluminol-antígeno, gerando emissão de quimiluminescência, quantificada por um fotomultiplicador (BRASIL, 2016).

- O ensaio de hemaglutinação para *T. pallidum* (TPHA, do inglês *T. pallidum haemagglutination test*) e o ensaio de micro-hemaglutinação (MHA-TP, do inglês *microhaemagglutination assay*) se baseiam na ligação de anticorpos treponêmicos, presentes no soro, com os antígenos fixados nas superfícies de hemácias, resultando em uma reação de aglutinação. Já no ensaio de aglutinação passiva de partículas de gelatina para *T. pallidum* (TPPA, do inglês *T. pallidum passive particle agglutination test*), os antígenos são adsorvidos na superfície de partículas gelatinosas e a reação acontece da mesma forma que as anteriores, levando a formação de aglutinação visível a olho nu (BRASIL, 2016).

- Os testes rápidos foram introduzidos na triagem da sífilis mais recentemente, e a sua principal vantagem é a possibilidade de serem utilizados em laboratórios com pouca estrutura ou em estudos de campo. Utilizam os mesmos princípios metodológicos da imunocromatografia de fluxo lateral (Figura 15A) ou de plataforma de duplo percurso (DPP, do inglês *dual path platform*) (Figura 15B). No dispositivo existe uma área denominada “T” (Teste), onde ficam fixados os antígenos de *T. pallidum* e outra região denominada “C” (Controle). Ao inserir a amostra (sangue total, soro ou plasma) no local indicado, os anticorpos que estiverem presentes se ligarão ao conjugado presente na tira (antígenos recombinantes ligados a um agente revelador) e migrarão por capilaridade até a região T onde se complexarão. Havendo a formação do complexo antígeno-anticorpo-conjugado, aparecerá uma linha colorida na área teste. Todos os testes devem ter a formação de uma linha colorida na área do controle. Sua ausência invalida o resultado. A execução, leitura e interpretação ocorre em cerca de 30 minutos. Quando reagentes, são visualizadas as linhas na região teste e controle. No caso de resultado não reagente, a linha aparecerá somente na área do controle (Figura 15) (BRASIL, 2016).

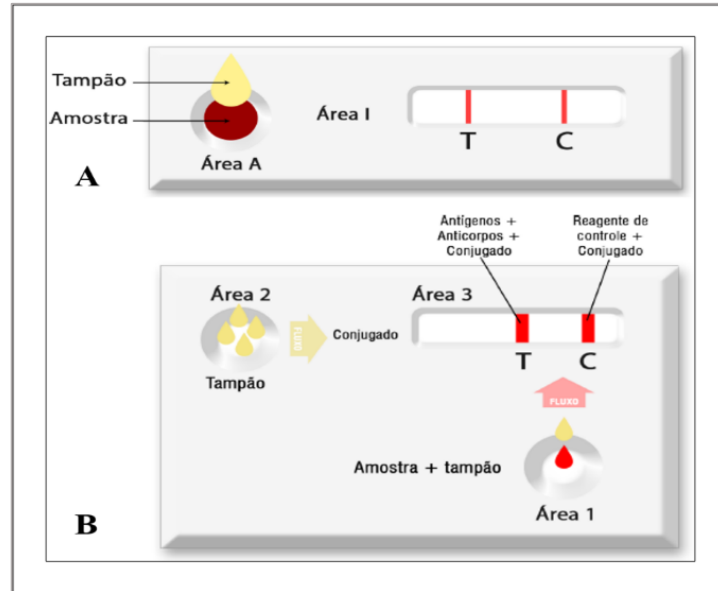


Figura 15: Funcionamento da imunocromatografia.

Legenda: (A) Teste rápido de fluxo lateral; (B) dupla migração.

Fonte: Brasil (2014).

A triagem sorológica e o diagnóstico podem ser realizados utilizando os testes descritos acima. Entretanto, conforme relatado, a infecção apresenta um quadro clínico variável e por isto o desempenho diagnóstico dos testes disponíveis no mercado varia conforme a fase da infecção, conforme apresentado na Figura 16 e Quadro 1.

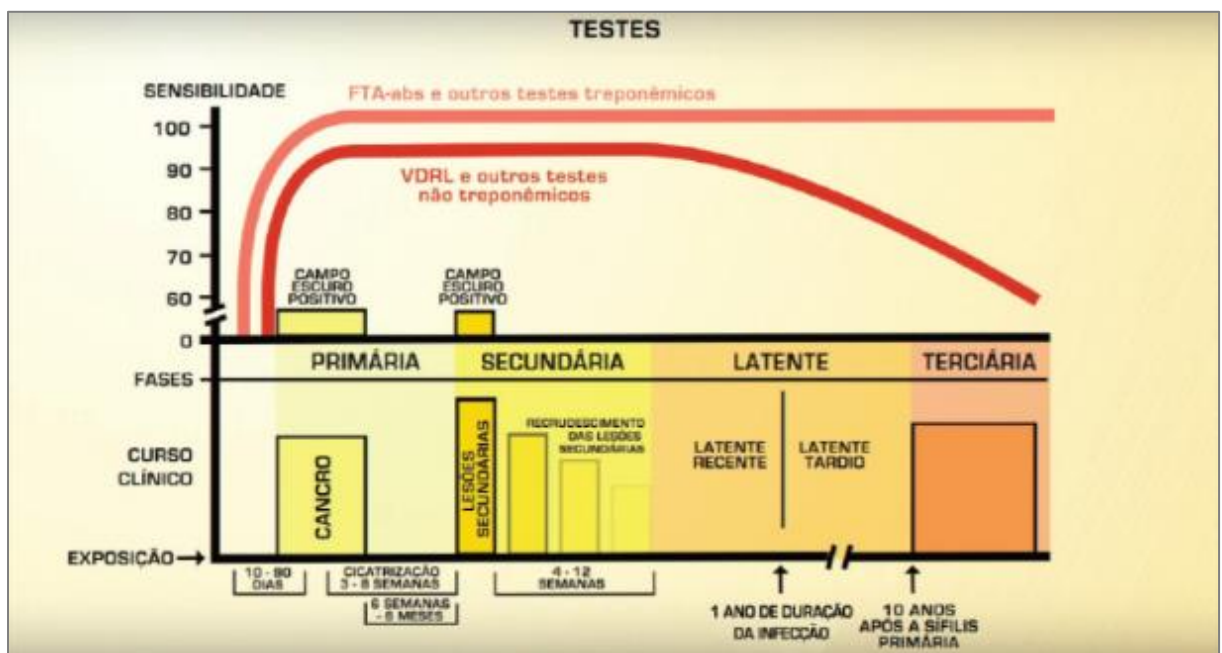


Figura 16: Tipos de testes para diagnóstico da sífilis de acordo com o estágio da infecção.

Fonte: Brasil (2016).

Quadro 1: Sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos para sífilis.

| Testes | % Sensibilidade | | | | % Especificidade |
|-------------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|--------------------|
| | Primária | Secundária | Latente | Terciária | |
| Exames diretos | | | | | |
| Campo escuro | 74-86 ^{b,e} | 74-86 ^{b,e} | - | - | 97 ^{b,e} |
| PCR* | 80 ^d | 76 ^d | - | 14 ^d | 100 ^d |
| PCR** | 28 ^d | 36 ^d | - | - | 100 ^d |
| PCR*** | - | 50 ^d | - | - | 100 ^d |
| Não treponêmicos | | | | | |
| VDRL | 78 ^c | 100 ^c | 95 ^c | 71 ^c | 98 ^c |
| TRUST | 85 ^c | 100 ^c | 98 ^c | - | 99 ^c |
| RPR | 86 ^c | 100 ^c | 98 ^c | 73 ^c | 98 ^c |
| USR | 80 ^c | 100 ^c | 95 ^c | - | 99 ^c |
| Treponêmicos | | | | | |
| FTA-ABS | 84 ⁱ | 100 ⁱ | 100 ⁱ | 96 ⁱ | 97 ⁱ |
| ELISA IgG | 100 ^h | 100 ^h | 100 ^h | 100 ^h | 100 ^h |
| QML | 98 ^f | 100 ^f | 100 ^f | 100 ^f | 99 ^f |
| MHA-TP | 76 ^k | 100 ^k | 97 ^k | 94 ^k | 99 ^k |
| TPPA | 88 ^g | 100 ^g | 100 ^g | - | 96 ^g |
| TPHA | 86 ^j | 100 ^j | 100 ^j | 99 ^j | 96 ^j |
| Teste rápido | 84-98 ^a | 84-98 ^a | - | - | 94-98 ^a |

Nota: Teste rápido não diferencia as fases da infecção e só é utilizado como triagem.

Legenda: QML – quimiluminescência; PCR* - exsudato de lesões; PCR** - sangue; PCR*** - líquido.

Fonte: Peeling; Ye, 2017^a; Brasil, 2016^b; Gayet-Ageron *et al.*, 2013^c; Müller *et al.*, 2011^d; Almeida, 2009^e; Young *et al.*, 2009^f; Ratnam *et al.*, 2005^g; Castro *et al.*, 2004^h; Larsen *et al.*, 1995ⁱ; Lesiński *et al.*, 1974^j.

O diagnóstico sorológico da sífilis se baseia em dois ou mais testes combinados que formam um fluxograma. Existe três abordagens distintas (Figura 17), que dependem da infraestrutura laboratorial disponível e quantidade de amostras a serem testadas diariamente, além das informações clínicas sugestivas do estágio suspeito da sífilis a ser diagnosticada (BRASIL, 2016).

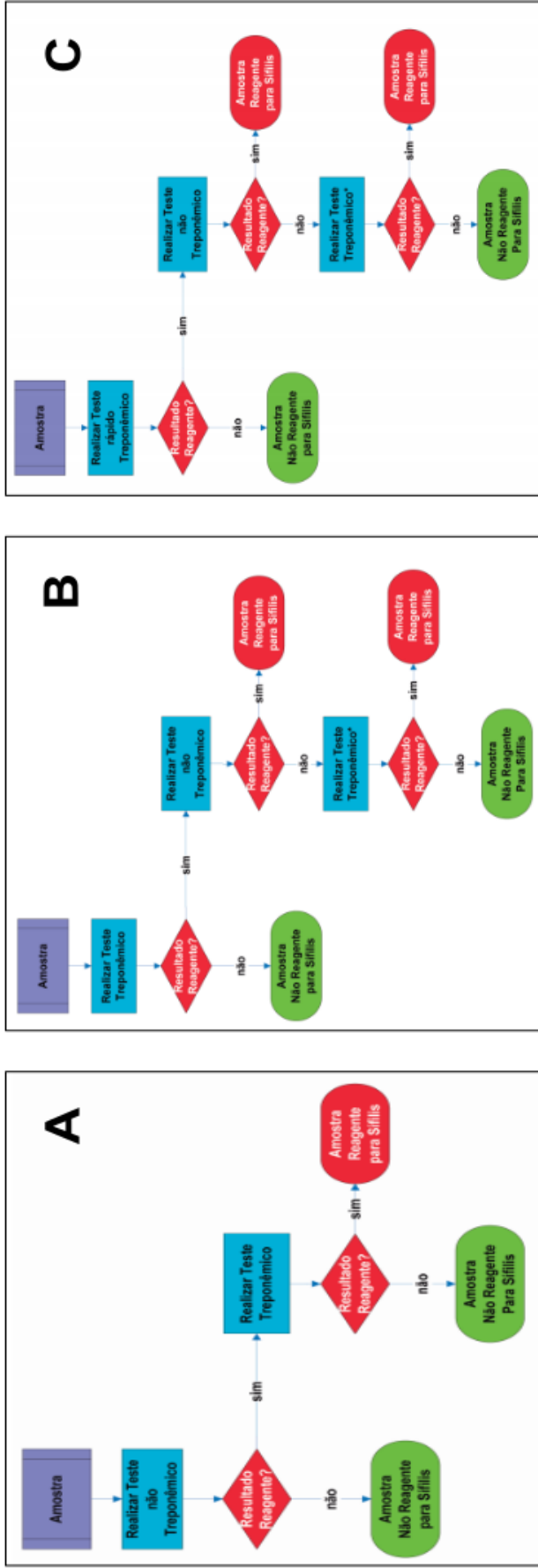


Figura 17: Algoritmos diagnósticos da sífilis.

Legenda: Teste de triagem treponêmico confirmado por teste treponêmico (A) algoritmo reverso (B) e diagnóstico com utilização de testes rápidos (C).

Fonte: Brasil, 2016.

O algoritmo tradicional (Figura 17A) é vantajoso devido ao custo-benefício para laboratórios que apresentam baixa demanda, com baixo volume de amostras. Contudo, possui limitações quanto à necessidade de operação manual e conseqüentemente a sua subjetividade. Nos últimos anos, percebeu-se a necessidade de melhorar a eficiência na triagem da sífilis, e duas novas abordagens reversas à convencional, foram adotadas: (a) realização da triagem com ensaios de anticorpos treponêmicos automatizados ou semi-automatizados (Figura 17B), a qual deveu-se ao grande número de amostras a ser testadas e a laboriosidade dos testes; (b) realização de um teste rápido treponêmico como primeiro teste (Figura 17C), seguido por um teste não treponêmico para a confirmação do diagnóstico, útil para localidades e serviços de saúde sem infraestrutura laboratorial e/ou regiões de difícil acesso, programas do Ministério da Saúde (MS) e laboratórios que realizam pequenas rotinas de até cinco amostras diárias para o diagnóstico da sífilis (BRASIL, 2016; MORSHED; SINGHB, 2015).

2.8 DESEMPENHO DIAGNÓSTICO DE ANTÍGENOS TREPONÊMICOS

T. pallidum tem como característica uma baixa densidade de lipoproteínas expostas na superfície bacteriana, sendo estas encontradas em sua maioria na membrana interna. Desta forma, estas poucas proteínas de membrana externa não são essenciais para o estudo de testes diagnósticos para sífilis, pois limitam a detecção geral, de forma indireta, da espiroqueta ao permitir a evasão do patógeno do sistema imunológico (KUBANOV; RUNINA; DERYABIN, 2017).

Apesar disto, estudos de imunoproteoma revelaram que existe um conjunto de proteínas capazes de induzir a resposta imunológica de alto nível no hospedeiro e que estes antígenos podem ser usados para fins de diagnóstico, desenvolvendo assim um efeito específico significativo aos testes sorológicos. Por isto, ao considerar a capacidade diagnóstica de proteínas treponêmicas, a tecnologia da proteína recombinante é a principal abordagem para o desenvolvimento de testes laboratoriais específicos para o treponema, aliada à pesquisa de imunoproteomas que levou à seleção de um conjunto variável de antígenos já testados em ensaios imunoenzimáticos como ELISA, quimiluminescência e Western blot (KUBANOV; RUNINA; DERYABIN, 2017).

Com propósito de identificar os antígenos mais importantes na resposta imunológica contra *T. pallidum*, Brinkman *et al.* (2006) avaliaram a reatividade de anticorpos séricos de indivíduos com sífilis para 908 das 1.039 proteínas do proteoma de *T. pallidum* subsp. *pallidum*, usando o ELISA como plataforma diagnóstica. Somente trinta e quatro proteínas exibiram

reatividade quando analisadas com soros humanos e os resultados demonstraram que a resposta imune humoral às proteínas individuais se desenvolve em taxas diferentes durante o curso da infecção.

Além disto, McGill *et al.* (2010) avaliaram a resposta imunológica de proteínas frente a uma análise de imunotransferência utilizando soros de coelhos infectados ou soros de indivíduos em diferentes fases da infecção. Vinte e nove antígenos apresentaram padrões de reatividade que incluíram cerca de 8 subgrupos de proteínas, incluindo principalmente a TmpA e as lipoproteínas de 47-kDa (TpN47), 17-kDa (TpN17) e 15-kDa (TpN15). Os dois estudos demonstraram que uma variedade de proteínas exibe imunoreatividade para o soro de indivíduos infectados, incluindo as proteínas deste estudo. As análises imunoproteômicas e sorológicas combinadas permitiram identificar o potencial destes antígenos como candidatos à vacina ou biomarcadores diagnósticos, além de fornecer informações sobre os mecanismos de interação patógeno-hospedeiro que ocorrem durante a infecção pelo *T. pallidum*.

As proteínas TpN15, TpN17, TpN47 e TmpA, produtos dos genes: *tp0171*, *tp0435*, *tp0574* e *tp0768*, respectivamente), codificam com uma alta expressão na bactéria. Todas elas são consideradas altamente imunogênicas e de relevância diagnóstica (KUBANOV; RUNINA; DERYABIN, 2017). Além disto, estas moléculas também desempenham funções importantes na bactéria, exceto a TpN15 que ainda não possui função conhecida. A TpN17 tem como função a ligação de proteínas para a manutenção da arquitetura da membrana da bactéria e ativação da expressão de moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1), E-selectina e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1). Já a TpN47 é uma carboxipeptidase (ligação à penicilina) e desempenha papel na interação patógeno-hospedeiro através da estimulação de células endoteliais de microvasos para a síntese de moléculas de adesão intercelular (KUBANOV; RUNINA; DERYABIN, 2017). Além destas funções, a TmpA, a TpN17 e a TpN15 estão envolvidas na via de biossíntese de peptidoglicano (NORRIS; COX; WEINSTOCK, 2001).

Baseado nisto, Oliveira (2014), em um estudo de caracterização e avaliação do desempenho diagnóstico de antígenos recombinantes, selecionou as quatro lipoproteínas citadas acima, que estão localizadas na membrana interna da bactéria como demonstrado na Figura 18.

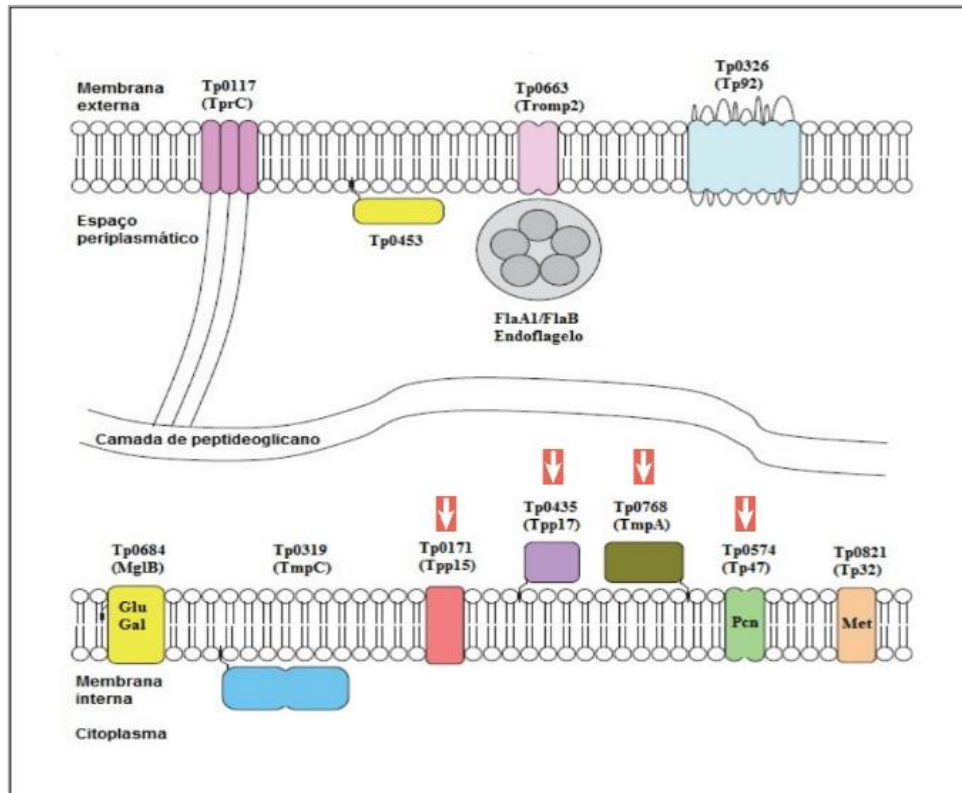


Figura 18: Modelo de localização das lipoproteínas do *Treponema pallidum*.

Nota: TpN15, TpN17, TmpA e TpN47, estão destacadas com setas vermelhas, respectivamente.

Fonte: Kubanov; Runina e Deryabin (2017).

Foi realizada a caracterização estrutural dos antígenos (Figura 19) além das análises de dicroísmo circular (verificação do conteúdo de estrutura secundária e enovelamento), espalhamento dinâmico de luz (avaliação da polidispersividade) e modelagem baseada em homologia. Todas as proteínas foram submetidas à caracterização biofísica visando analisar a estabilidade, solubilidade e estado de agregação. As análises de dicroísmo circular, indicaram que os peptídeos são estruturados e termicamente estáveis até temperaturas próximas de 35° C, já as análises de espalhamento dinâmico de luz, demonstraram que todas elas não apresentam agregados, tendo a qualidade necessária para imunoenaios quando presentes em tampão carbonato/bicarbonato (pH 9,0).

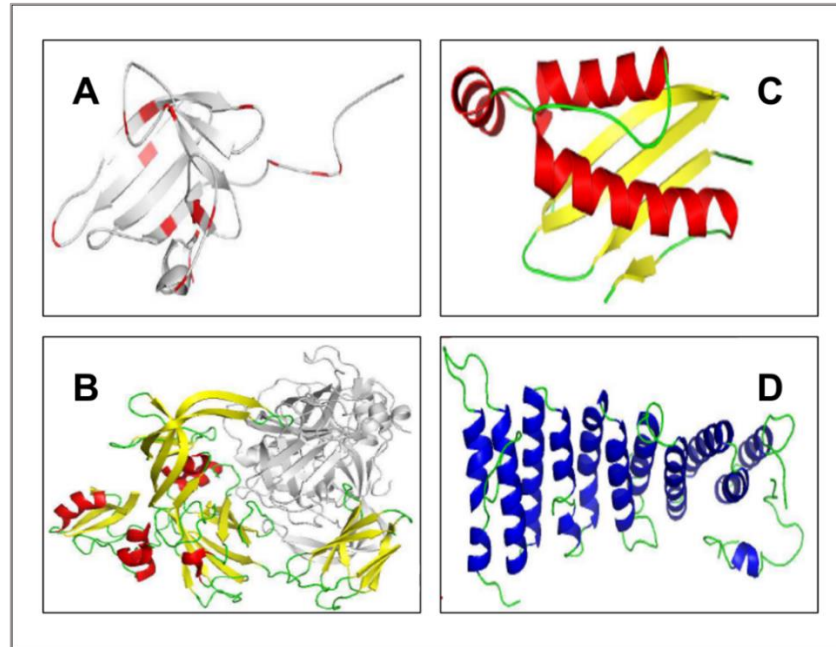


Figura 19: Modelo de estrutura tridimensional das proteínas treponêmicas.

Legenda: proteínas recombinantes (A) TpN17; (B) TpN47 (B); (C) TmpA; e (D) TpN15.

Fonte: Oliveira (2014).

Para a validação de uma nova metodologia diagnóstica, é imprescindível que seja realizado um estudo piloto ou de fase I, como prova de conceito. Esta verificação prévia, consiste em avaliar a capacidade do novo teste em classificar corretamente os indivíduos frente a um agravo, levando em consideração os limites da metodologia escolhida (SANTOS, 2016). No estudo piloto realizado por Oliveira (2014), a proteína TpN17 apresentou 100% de sensibilidade e 98,70% de especificidade com os painéis AEQ e 100% de sensibilidade e 98,80% de especificidade com os painéis AEQ e Sera Care. A proteína TpN47 apresentou 100% de sensibilidade e 97,50% de especificidade com os painéis AEQ e 100% de sensibilidade e 97,70% de especificidade com os painéis AEQ e Sera Care. A proteína TmpA apresentou 76,5% de sensibilidade e 97,50% de especificidade testada com os painéis AEQ e 76,50% de sensibilidade e 91,60% de especificidade com os painéis AEQ e Sera Care. No entanto, o painel sorológico utilizado foi considerado um viés para os resultados encontrados, pois foi composto por amostras séricas com altos títulos de anticorpos anti-*T. pallidum* provenientes do painel do Programa de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ/ANVISA/MS) e de painéis comerciais internacionais (Sera-Care Life Sciences Inc. - Milford/MA, EUA; Boston Biomedical Inc.- Norwood/MA, EUA). Devido a isto, percebeu-se a necessidade de realizar um novo estudo de fase I utilizando amostras provenientes de indivíduos portadores da sífilis.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial diagnóstico das proteínas recombinantes de *Treponema pallidum* (TpN15, TpN17, TpN47 e TmpA) para detecção de anticorpos treponêmicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar os testes imunoenzimáticos no formato ELISA indireto utilizando os antígenos recombinantes de *T. pallidum*;
- Validar os ensaios imunoenzimáticos utilizando os antígenos recombinantes e amostras séricas de indivíduos infectados e não infectados por *T. pallidum*;
- Avaliar a reatividade cruzada utilizando amostras séricas de indivíduos portadores de doenças infecto-parasitárias de interesse epidemiológico no Brasil.

4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

4.1.1 Locais de experimentação

A produção e a purificação dos antígenos recombinantes TpN15, TpN17, TpN47 e TmpA foram realizadas no Laboratório de Genômica e de Proteínas do Instituto Carlos Chagas - ICC/FIOCRUZ-PR. A caracterização do painel sorológico e a avaliação do potencial diagnóstico dos antígenos, incluindo a padronização e a otimização dos imunoenaios pela metodologia de ELISA, foram realizadas no Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP) do Instituto Gonçalo Moniz - IGM/FIOCRUZ-BA.

4.1.2 Considerações éticas

Este estudo possui aprovação junto ao Comitê de Ética do IGM/FIOCRUZ/BA sob o número 2.209.976 (CAAE 67809417.0.0000.0040, Apêndice A).

4.2 OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES

Os antígenos TpN15, TpN17, TpN47 e TmpA foram obtidos a partir da tecnologia do DNA recombinante, utilizando o plasmídeo pET28a em cepa de *Escherichia coli* B121 (DE3)-Star (Invitrogen, EUA). As sequências codificadoras foram adquiridas da empresa GenScript (Piscataway, Nova Jersey, EUA) e as sequências de aminoácidos que compõem as proteínas recombinantes foram obtidas do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, www.ncbi.nlm.nih.gov), conforme anotação das sequências genômicas da cepa *T. pallidum* subsp. *pallidum* str. Nichols. A purificação foi realizada através dos métodos de cromatografia de afinidade, troca iônica e exclusão por tamanho. Por fim, os antígenos recombinantes foram obtidos nas concentrações descritas no Quadro 2 (OLIVEIRA, 2014) e enviados ao LASP para a realização deste estudo.

Quadro 2: Lotes de produção e concentração dos antígenos IBMP

| Código | Antígeno | Lote | Concentração (mg/mL) |
|---------------|-----------------|-------------|-----------------------------|
| IBMP 7-1 | TpN17 | TpN17012017 | 2,0 |
| IBMP 7-2 | TpN47 | TpN47072015 | 1,8 |
| IBMP 7-3 | TmpA | TmpA072015 | 2,0 |
| IBMP 7-4 | TpN15 | TpN15062015 | 1,7 |

Fonte: O autor.

4.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os extratos proteicos e os purificados cromatográficos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% e 0,75 mm de espessura. Os géis contendo as amostras foram submetidos à eletroforese com 20 mA de corrente, corados com azul de Coomassie e descorados em metanol e ácido acético.

4.3 AMOSTRAS SOROLÓGICAS

4.3.1 Dimensionamento amostral

Por conta das características de um estudo de fase I, a amostragem utilizada foi de conveniência, não havendo a necessidade, da determinação do tamanho amostral, sendo esta obrigatória em estudos de fase II e III (SANTOS, 2016).

4.3.2 Obtenção e caracterização dos painéis sorológicos

Para a realização deste estudo foram selecionadas 871 amostras séricas, obtidas em parceria com os Hemocentros de Pernambuco (HEMOPE) e da Bahia (HEMOBA), Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (LACTFAR-UFBA), Universidade Federal de Goiás (UFG), Laboratório Central de Saúde Pública Prof^o Gonçalo Moniz (LACEN-BA) e Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE). As amostras foram reavaliadas para a presença ou ausência de anticorpos IgG anti-*T*.

pallidum, com de testes não-treponêmicos (USR e RPR) e/ou treponêmicos (FTA-ABS - IIFT IgG). As amostras positivas para outras doenças infecto-parasitárias também foram analisadas quanto à co-infecção com sífilis (Figura 20; Apêndice B – Tabela das amostras). Todas as amostras foram codificadas e armazenadas no LASP (IGM/FIOCRUZ-BA).

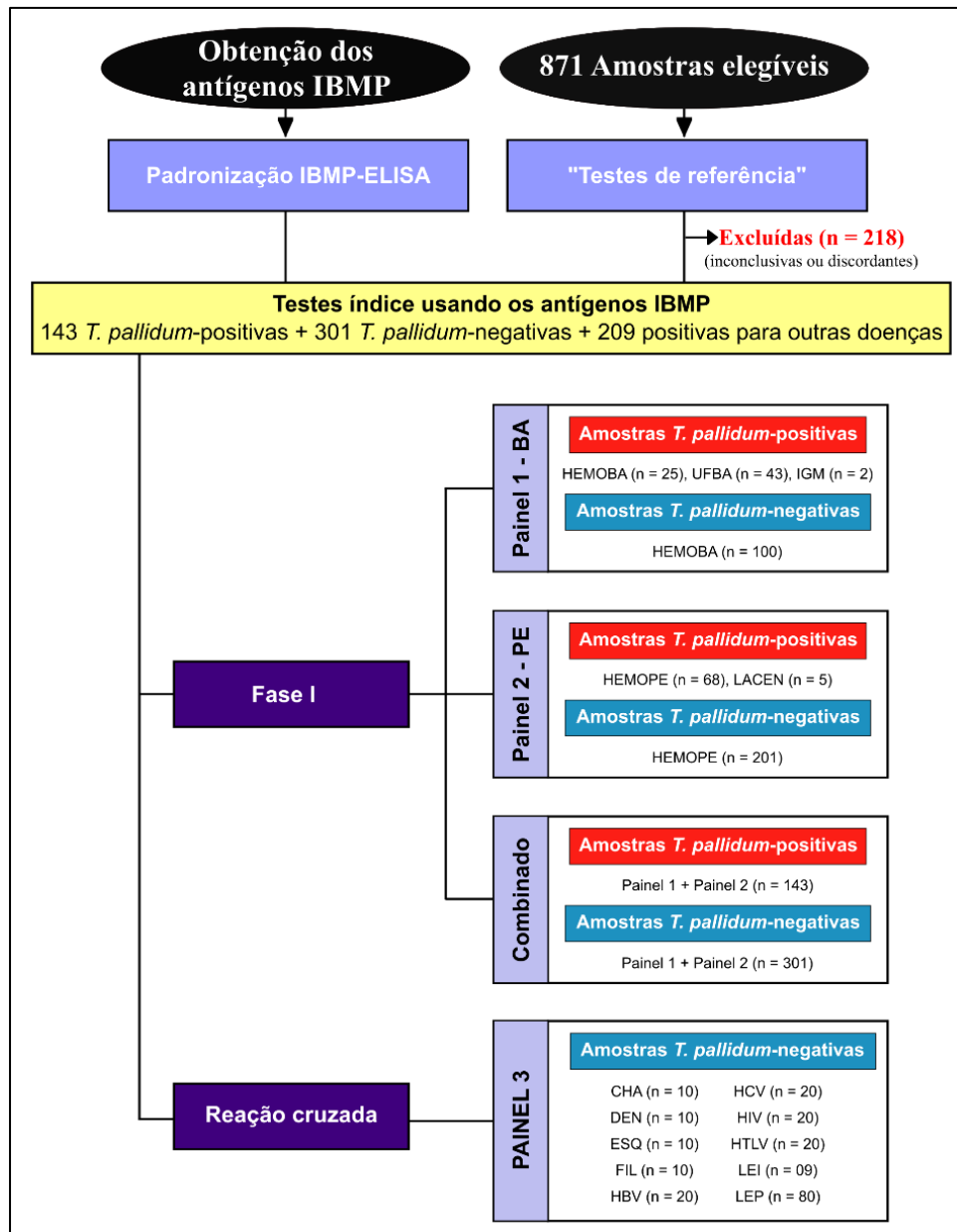


Figura 20: Fluxograma para avaliação do desempenho diagnóstico de antígenos recombinantes para detectar a sífilis em indivíduos infectados.

Nota: Foram consideradas inconclusivas ou discordantes as amostras que não se enquadraram nos critérios de inclusão.

Legenda: CHA (doença de Chagas); DEN (dengue); ESQ (esquistossomose); FIL (filariose); HBV (hepatite B); HCV (hepatite C); HIV (vírus da imunodeficiência humana); LEI (leishmaniose); e LEP (leptospirose).

Fonte: O autor.

4.3.2.1 RPR (*Rapid Plasm Reagin*)

O teste foi realizado utilizando o kit RPR-BRAS Corado, lote 51127047 (Laborclin – Produtos para Laboratórios LTDA, Paraná, Brasil). A caracterização sorológica das amostras negativas e positivas foi realizada através da detecção de anticorpos não-treponêmicos (anti-cardiolipina) presentes nos soros. Os testes foram conduzidos seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, 50 µl das amostras e dos controles positivos e negativos foram homogeneizados com 20 µl do antígeno RPR-CORADO. Em seguida, os cartões plásticos foram submetidos a agitação de 100 ± 2 rpm por 8 minutos em agitador mecânico (TITRAMAX 100 - Heidolph, Schwabach, Alemanha). Após este período, as reações foram analisadas a olho nu e interpretadas de acordo com a presença ou ausência de aglomerados. Ou seja, amostras não reagentes foram aquelas que apresentavam mistura homogênea na forma de um ponto corado no centro da circunferência e amostras positivas foram aquelas que apresentavam qualquer aglomerado visível a olho nu.

4.3.2.2 USR (*Unheated Serum Reagin*)

O teste de floculação em lâmina para detecção de anticorpos não treponêmicos foi realizado utilizando o kit IMMUTREP® USR ANTIGEN, lote 7060467 (Omega Diagnostics LTD., Escócia, Reino Unido), sendo este teste uma variação do VDRL. A caracterização sorológica das amostras negativas e positivas foi realizada através da detecção qualitativa de anticorpos reaginas no soro. Os testes foram conduzidos de acordo com as instruções do fabricante. Em lâminas esmerilhadas de vidro foi adicionada uma gota do controle positivo na primeira cavidade e 50 µL das amostras nas demais áreas circulares. Em seguida, foram adicionados 22 µL do antígeno homogeneizado, sem misturar. Na próxima etapa, as lâminas foram submetidas a agitação mecânica por 4 minutos a 180 rpm (TITRAMAX 100 - Heidolph, Schwabach, Alemanha). Após este período, o resultado foi analisado ao microscópio com aumento de 10x. As amostras reagentes apresentaram grumos médios, grandes ou dispersos e as não reagentes apresentaram ausência de grumos e/ou aparência acinzentada.

4.3.2.3 *Imunofluorescência indireta*

Para esta finalidade, foi utilizado o kit anti-*Treponema pallidum* IIFT (IgG), lote F190214AC (EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Alemanha). A caracterização das amostras discordantes foi realizada através da detecção qualitativa de anticorpos IgG nos soros. Os testes foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Em tubos plásticos foram adicionados 12,5 µL de cada amostra mais 50 µL do sorvente FTA (proporção 1:5). Os tubos foram agitados durante 4 segundos em um vórtex (AP 56 – Phoenix, São Paulo, Brasil) para depois serem incubados por 30 minutos a 37 °C em banho-maria (Banho-maria modelo 100 – FANEM LTDA, São Paulo, Brasil). Em seguida, 25 µL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo plástico, sendo adicionados 25 µL de PBS-Tween (proporção 1:2). Os tubos foram novamente agitados em vórtex por 4 segundos. Ao final, a diluição do soro foi de 1:10. Na próxima etapa, 30 µl da amostra diluída foram pipetados em cada poço da lâmina, a qual foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida. As lâminas foram lavadas com PBS-Tween e depois mergulhadas em uma cubeta contendo PBS-Tween por 5 minutos. Após a lavagem, 25 µl do anticorpo secundário marcado com fluoresceína foi adicionado a cada poço e as lâminas foram, então, incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida. Posteriormente, as lâminas foram lavadas, secas e preparadas para montagem, a qual ocorreu com a adição de 1 gota de glicerol em cada campo de reação, seguida da colocação de lamínula. A leitura foi realizada com auxílio de um microscópio de fluorescência (Olympus BX51 – Olympus Corporation, Shinjuku, Japão) em objetivas de 20x e 40x, utilizando filtro de excitação entre 450 e 490 nm. Em uma reação positiva foi possível visualizar fluorescência distinta nas espiroquetas presentes nas áreas de reação. No caso de resultado negativo, as espiroquetas não mostraram fluorescência.

4.3.3 Critérios de inclusão das amostras

Foram incluídas neste estudo amostras séricas de indivíduos sorologicamente positivos ou negativos para a sífilis, como também de indivíduos com diagnóstico laboratorial positivo para outras doenças infecto-parasitárias, porém negativos para sífilis. Foram adotados os seguintes critérios:

- a) Amostras séricas positivas para sífilis: aquelas com sorologia verdadeiramente positiva em pelo menos dois testes com registros ativos na ANVISA, sendo um não-treponêmico e um outro treponêmico;

- b) Amostras séricas negativas para sífilis: aquelas com sorologia verdadeiramente negativa em dois testes não treponêmicos, com preparações antigênicas diferentes e registro ativo na ANVISA. Em caso de resultados duvidosos, as amostras foram testadas em um teste treponêmico;
- c) Amostras séricas positivas para outras infecções e negativas para sífilis: aquelas que apresentam positividade em metodologias diagnósticas padrão-ouro para dengue, filariose, hepatite B, hepatite C, HIV-1/2, HTLV-1/2, leptospirose, esquistossomose crônica, doença de Chagas e leishmaniose tegumentar e visceral. Em caso de resultados duvidosos, as amostras foram testadas por um teste treponêmico.

4.3.4 Critérios de não inclusão de amostras

Não foram incluídas neste estudo todas as amostras séricas que apresentaram volumes inferiores a 50 µl e aquelas com avaliação sorológica duvidosa ou indefinida para a sífilis.

a) Amostras séricas duvidosas ou indefinidas: foram aquelas que apresentaram resultados discordantes entre os testes de referência adotados neste estudo, ou seja, amostras com resultado positivo em um teste e negativo no outro (ou vice-versa).

4.4 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO

4.4.1 Sensibilização das microplacas

Os ensaios imunoenzimáticos indiretos no formato ELISA foram padronizados para determinar a quantidade ideal dos antígenos TpN15, TpN17, TpN47 e TmpA, bem como a melhor titulação do anticorpo secundário e das amostras séricas. Em microplacas de poliestireno de 96 cavidades de fundo chato (Microtest Plate 96 Well, F – Sarstedt, Alemanha) foram distribuídos, separadamente, 100 µl da solução tampão carbonato/bicarbonato (50 mM, pH 9, carbonato de sódio – Na₂CO₃ e bicarbonato de sódio – NaHCO₃) contendo quantidades distintas dos antígenos recombinantes (12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 ng por cavidade). Após a adição dos antígenos, foram acrescentados 100 µl da solução WellChampion™ (lote 130703; Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca) por cavidade, para sensibilização e bloqueio. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, as microplacas foram

esvaziadas por inversão e colocadas em estufa a 37° C por 3 horas para secagem (MARCONI® MA032, São Paulo, Brasil). Após estes procedimentos as microplacas encontravam-se prontas para uso.

4.4.2 Padronização dos componentes do ELISA indireto

Para a padronização do ELISA indireto foram utilizados, em duplicata, 4 *pools* de amostras séricas negativas e 3 positivas para a sífilis, previamente caracterizados, nas diluições de 25, 50, 100 e 200 vezes utilizando o tampão PBS pH 7.4 (fosfato dissódico - Na₂HPO₄, fosfato monossódico - NaH₂PO₄, cloreto de sódio - NaCl). Doze cavidades denominadas “branco”, foram utilizadas como controle negativo (seis sem adição de antígeno com tampão de diluição e seis sensibilizadas).

Após a sensibilização, 100 µl das amostras séricas, em duplicata, nas diluições propostas, foram adicionadas a cada cavidade. As microplacas foram seladas e incubadas em estufa a 37° C por 60 minutos (MARCONI® MA032, São Paulo, Brasil). Ao final desta etapa, os poços foram lavados cinco vezes com adição de 250 µl de tampão PBS Tween-20 a 0,05% (PBS-T) para remoção do material não adsorvido. Em seguida, 100 µl do conjugado diluído em PBS foram adicionados em cada cavidade. Trata-se de uma anti-globulina humana (anti-IgG) conjugada à peroxidase cedida pelo Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED, Biomanguinhos, FIOCRUZ-RJ; lote 167EXCJHPCC6Z) para a realização deste estudo. O anticorpo secundário foi avaliado nas diluições de 1:10.000, 1:20.000, 1:40.000 e 1:80.000. As microplacas foram novamente seladas e incubadas em estufa a 37° C por 30 minutos. Ao final da incubação, as microplacas foram lavadas conforme descrito anteriormente.

Após o segundo ciclo de lavagem, foram adicionados a cada cavidade 100 µl da solução reveladora TMB Plus (lote 111011; Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca). Após 10 minutos e sob abrigo da luz, 50 µl de H₂SO₄ a 0,2 M foram adicionados para a interrupção das reações. Em seguida, foi realizada a leitura das densidades ópticas em um espectrofotômetro de microplacas (SPECTRAMax 340PC®, Califórnia, EUA) a 450 nm.

4.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.5.1 Definição da padronização

Os valores da densidade ótica (DO) obtidos dos “brancos” foram subtraídos das DO das amostras positivas e negativas. Posteriormente, as médias aritméticas dos valores das DO das amostras positivas e negativas foram calculadas, bem como os seus respectivos desvios padrão, utilizando o programa Microsoft Excel 2016 (Microsoft, EUA). O critério estabelecido para a determinação das melhores condições se baseou na maior distância entre a média aritmética das DO das amostras positivas daquela obtida para as amostras negativas acrescida à três desvios-padrão (DP), considerando a fórmula: \bar{X} DO positivas – (\bar{X} DO negativas + 3DP). De acordo com Santos *et al.* (2016), a média aritmética das DO das amostras positivas deveriam obrigatoriamente ultrapassar valores de 0.900 e das amostras negativas não atingir o valor de 0.250.

4.5.2 Definição do ponto de corte (CO- *cut-off*)

Os pontos de corte foram calculados individualmente para cada microplaca. Os valores das DO obtidas foram exportados para o GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., EUA). Desta maneira, foi calculada a área abaixo da curva ROC (AUC – *area under ROC*) utilizando um intervalo de confiança de 95% (IC 95%) para obtenção dos valores dos pontos de corte (GREINER; PFEIFFER; SMITH, 2000). Para a interpretação dos valores da AUC, considerou-se excelente: $1,00 \leq AUC \leq 0,90$; bom: $0,90 < AUC \leq 0,80$; razoável: $0,80 < AUC \leq 0,70$; pobre: $0,70 < AUC \leq 0,60$ e fraco: $0,60 < AUC \leq 0,50$ (MEHDI; BASHARDOOST; AHMADI, 2011; METZ, 1978).

4.5.3 Normalização dos dados

A normalização dos dados foi realizada para evitar a variabilidade inerente a cada microplaca. Para isso, foi calculado o índice de reatividade (IR) para cada amostra, como descrito a seguir:

$$\text{Índice de reatividade (IR)} = \frac{\text{DO da Amostra}}{\text{Valor do CO}}$$

Foram consideradas negativas todas as amostras com IR inferiores a 1,00 e positivas todas aquelas com IR iguais ou superiores a 1,00 (Apêndice B – Tabela com os resultados das

amostras). As amostras que obtiveram $IR = 1,0 \pm 10\%$ foram consideradas na zona cinza (zona de inconclusividade). Com o propósito de evitar erros sistemáticos, foi estabelecido como critério de repetição que todas as amostras com IR entre 0,80 e 1,20, independente da condição sorológica, fossem reavaliadas. A partir da obtenção dos valores do IR de cada amostra, os resultados foram representados em gráficos pelo GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., EUA).

4.5.4 Avaliação dos parâmetros de desempenho

A avaliação do potencial diagnóstico dos antígenos foi realizada através da obtenção dos parâmetros de desempenho de um teste diagnóstico, como sensibilidade, especificidade, exatidão, índice de Youden (> 0 e < 1) e índice de Kappa de Cohen (< 0 – insignificante; 0 a 0,2 – fraco; 0,21 a 0,4 – razoável; 0,41 a 0,6 – moderado; 0,61 a 0,8 – forte e 0,81 a 1 – quase perfeito), juntamente com seus intervalos de confiança. Para isto, foram utilizadas tabelas de dupla entrada relacionando os resultados dos antígenos com o ELISA e aqueles obtidos através do padrão-ouro definido anteriormente (Figura 21).

| | | Padrão Ouro | | | |
|-------|----------|----------------------------|----------------------------|---------------|--|
| | | Com doença | Sem doença | | |
| Teste | Positivo | Verdadeiro Positivos VP | Falso Positivos FP | VP + FP | |
| | Negativo | Falso Negativos FN | Verdadeiro Negativos VN | FN + VN | |
| | | VP + FN | FP + VN | VP+FP + FN+VN | |

Figura 21: Combinação binária entre os prováveis resultados obtidos em um determinado teste e o diagnóstico verdadeiro da doença.

Fonte: Santos (2016).

Legenda: FN (falso negativo); FP (falso positivo); VN (verdadeiro negativo); VP (verdadeiro positivo).

A partir da obtenção dos resultados e a relação através da combinação binária, calculou-se os desempenhos de acordo com as fórmulas abaixo:

$$Sen = \frac{VP}{VP + FN} \quad e \quad Esp = \frac{VN}{VN + FP}$$

Os valores dos intervalos de confiança a 95% (IC95%) para a sensibilidade e especificidade foram calculados conforme as fórmulas abaixo:

$$IC95\% = \pm 1,96x \sqrt{\frac{Sen \times (1-Sen)}{NDo}} \quad e \quad IC95\% = \pm 1,96x \sqrt{\frac{Esp \times (1-Esp)}{NSa}}$$

NDo = número de doentes

NSa = número de sadios

4.5.5 Reprodutibilidade intraplaca (Repetitividade)

Na avaliação da reprodutibilidade intraplaca foram utilizadas 10 amostras negativas e 22 positivas para a sífilis, as quais foram analisadas em quadruplicata (medida 1, medida 2, medida 3 e medida 4). As reações de ELISA foram realizadas como descrito no tópico 4.4. As médias aritméticas dos IR bem como o desvio padrão e coeficiente de variação foram calculados para as quatro determinações e os resultados comparados entre eles.

4.5.6 Testes estatísticos

A apresentação das variáveis mensuradas foi realizada através de medidas descritivas como: médias aritmética e geométrica, desvio padrão e coeficiente de variação. As médias aritméticas foram utilizadas para a padronização dos componentes do ELISA. Para as demais análises foi utilizada a média geométrica. Para testar a normalidade dos dados foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk. Quando da rejeição da hipótese nula, foi utilizado o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. No caso de confirmação da normalidade dos dados foi utilizado o teste T de Student. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de $p < 0,05$. A ausência de sobreposição dos valores dos IC95% foi considerada significância estatística. Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., EUA) para realização dos testes estatísticos.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E QUALIDADE DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES

Para confirmar a qualidade dos antígenos recombinantes recebidos pelo nosso grupo, foi realizada a análise eletroforética em gel de poliacrilamida usando dodecil sulfato de sódio para auxiliar na identificação das proteínas isoladas. Foi possível observar a presença de bandas intensas para as quatro moléculas, com destaque para uma banda clara e inespecífica de 100-150 kDa para a TmpA e três bandas para a TpN15 (Figura 22).

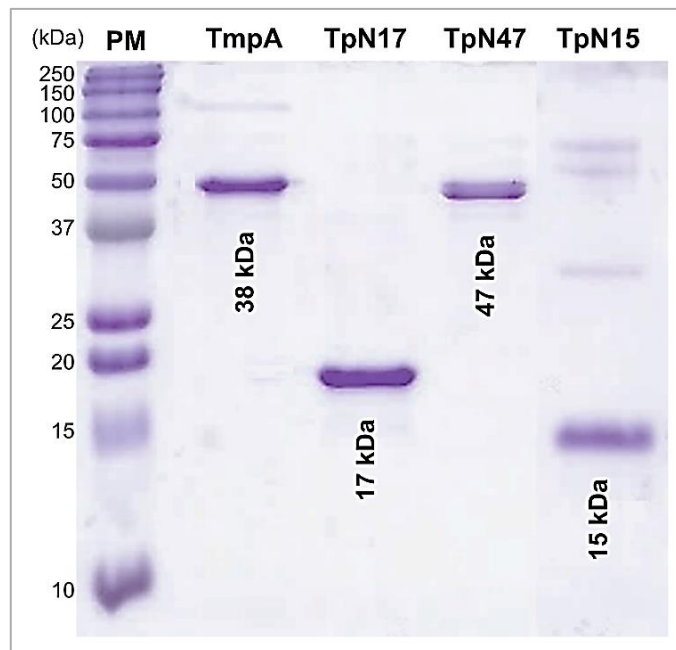


Figura 22: SDS-PAGE dos antígenos recombinantes corados pelo azul de Coomassie.

Nota: Adicionado 1 μ g de antígeno/poço.

Legenda: kDa (quilodaltos); PM (peso molecular).

Fonte: O autor.

5.2 PADRONIZAÇÃO DO ELISA INDIRETO

5.2.1 Antígeno TpN17

Na padronização do antígeno TpN17, a molécula foi avaliada utilizando 400, 200, 100, 50, 25 e 12,5 ng do antígeno por cavidade, além de diferentes diluições do anticorpo conjugado (1:20.000, 1:40.000 e 1:80.000) e das amostras séricas (1:25, 1:50, 1:100 e 1:200) (Figura 23).

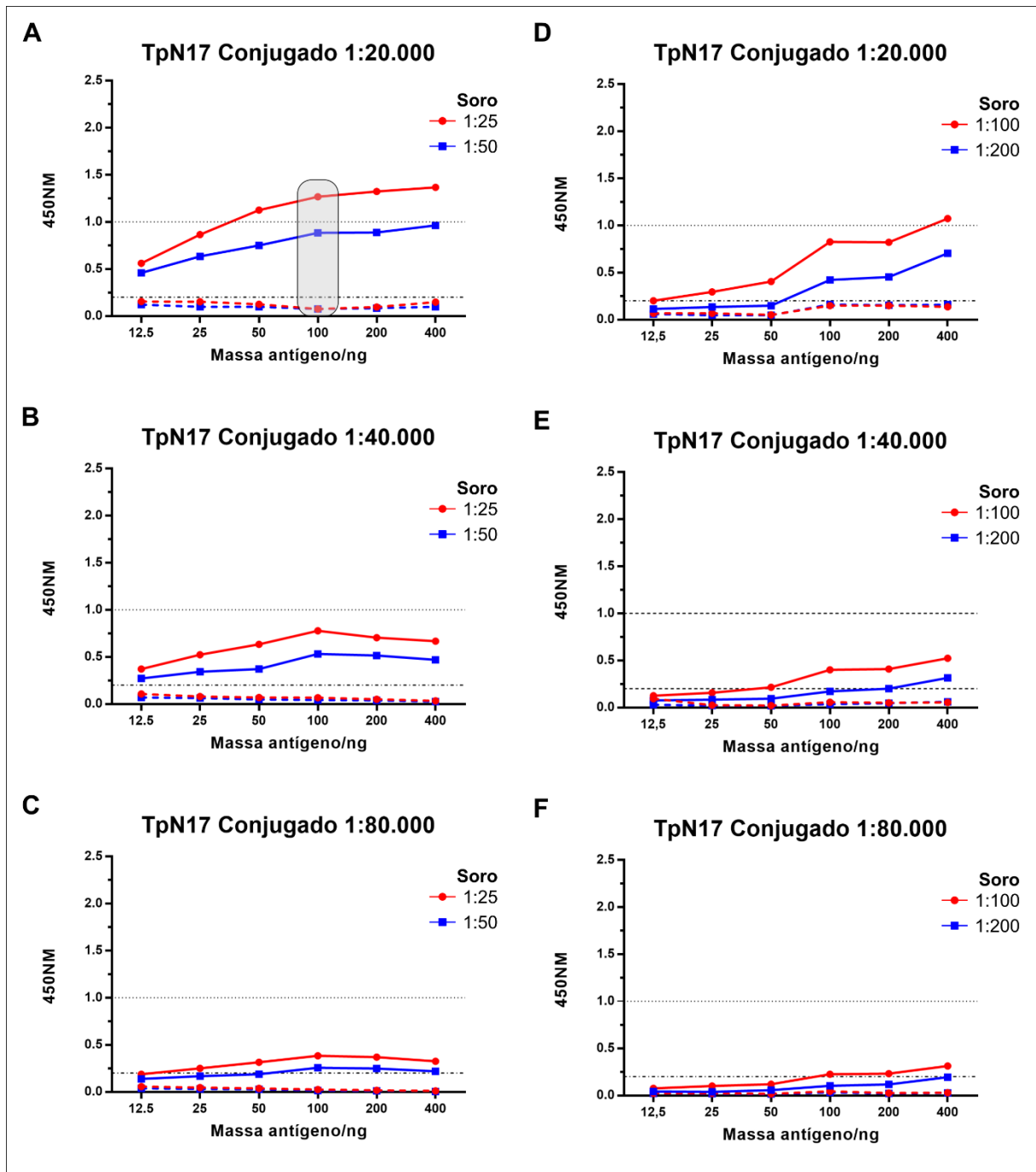


Figura 23: Análise gráfica dos valores médios de absorvância da TpN17.

Nota: As linhas contínuas representam as amostras positivas e as linhas tracejadas as amostras negativas. O limite mínimo inferior requerido para o conjunto de amostras positivas foi de 1.0 e o limite máximo exigido para o conjunto de amostras negativas foi de 0.2. A melhor condição de padronização da molécula está destacada na figura (A).

Fonte: O autor.

A partir da análise dos valores médios de absorvância do antígeno TpN17, a maior diferença entre a média aritmética do sinal (DO) das amostras positivas e a média aritmética do sinal das amostras negativas acrescida de três desvios-padrão foi atingida ao se utilizar 100 ng

do antígeno por cavidade, diluição sérica de 25 vezes e do conjugado de 20.000. Nestas condições, a molécula foi capaz de diferenciar bem os *pools* negativos e positivos com diferença de sinal superior a 1,130 (Tabela 1).

Tabela 1: Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao TpN17.

| Conjugado | Antígeno | Soro | DO NEG | σ | DO NEG + 3σ | DO POS | (DO NEG + 3σ) – (DO POS) |
|-----------|----------|------|--------|----------|--------------------|--------|----------------------------------|
| 1:20.000 | 400 ng | 1:25 | 0,076 | 0,014 | 0,117 | 1,267 | 1,149 |
| | | 1:50 | 0,077 | 0,022 | 0,145 | 0,885 | 0,740 |
| | 200 ng | 1:25 | 0,096 | 0,027 | 0,178 | 1,323 | 1,145 |
| | | 1:50 | 0,084 | 0,022 | 0,150 | 0,888 | 0,738 |
| | 100 ng | 1:25 | 0,148 | 0,029 | 0,236 | 1,367 | 1,131 |
| | | 1:50 | 0,098 | 0,025 | 0,173 | 0,963 | 0,790 |
| 1:40.000 | 400 ng | 1:25 | 0,034 | 0,010 | 0,065 | 0,667 | 0,602 |
| | | 1:50 | 0,027 | 0,010 | 0,058 | 0,470 | 0,412 |
| | 200 ng | 1:25 | 0,051 | 0,011 | 0,083 | 0,705 | 0,622 |
| | | 1:50 | 0,038 | 0,009 | 0,064 | 0,516 | 0,452 |
| | 100 ng | 1:25 | 0,068 | 0,013 | 0,108 | 0,779 | 0,670 |
| | | 1:50 | 0,043 | 0,011 | 0,074 | 0,533 | 0,458 |
| 1:80.000 | 400 ng | 1:25 | 0,012 | 0,005 | 0,027 | 0,327 | 0,300 |
| | | 1:50 | 0,006 | 0,005 | 0,022 | 0,220 | 0,198 |
| | 200 ng | 1:25 | 0,018 | 0,006 | 0,036 | 0,369 | 0,333 |
| | | 1:50 | 0,012 | 0,004 | 0,025 | 0,249 | 0,224 |
| | 100 ng | 1:25 | 0,027 | 0,010 | 0,059 | 0,385 | 0,326 |
| | | 1:50 | 0,015 | 0,005 | 0,030 | 0,258 | 0,228 |

Legenda: σ (desvio padrão); DO (densidade ótica); NEG (amostras negativas); POS (amostras positivas).

Fonte: O autor.

5.2.2 Antígeno TmpA

Este antígeno foi investigado nas quantidades de 400, 200 e 100 ng por cavidade, diluições do anticorpo conjugado de 1:20.000, 1:40.000 e 1:80.000 e diluições séricas de 1:25 e 1:50 (Figuras 26B, C e D). Nestas condições, o antígeno apresentou baixo poder discriminatório entre os *pools* negativos e positivos (inferior a 0,700). Por esta razão, os ensaios

utilizando as mesmas quantidades de antígeno e soro foram repetidos, variando somente a diluição de 1:10.000 do anticorpo secundário (Figura 24A).

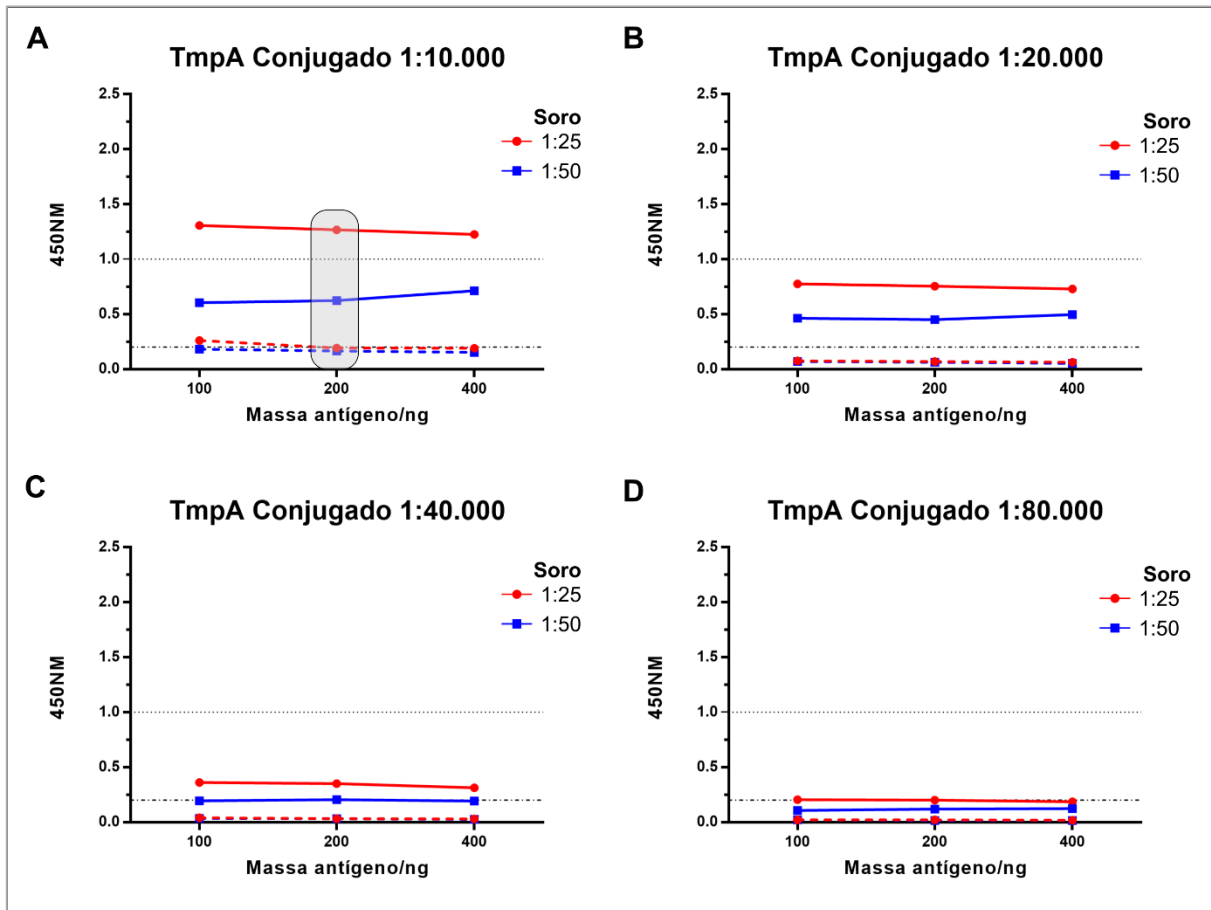


Figura 24: Análise gráfica dos valores médios de absorvância do TmpA.

Nota: As linhas contínuas representam as amostras positivas e as linhas tracejadas as amostras negativas. O limite mínimo inferior requerido para o conjunto de amostras positivas foi de 1.0 e o limite máximo exigido para o conjunto de amostras negativas foi de 0.2. A melhor condição de padronização da molécula está destacada na figura.

Fonte: O autor.

Na análise gráfica, a melhor distinção entre amostras negativas das positivas foi obtida utilizando 200 ng do antígeno, mais a diluição sérica de 25 vezes e do anticorpo secundário de 10.000. Nestas condições, a molécula diferenciou os *pools* negativos e positivos com diferença de sinal próxima a 1,000 (Tabela 2).

Tabela 2: Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao TmpA.

| Conjugado | Antígeno | Soro | DO NEG | Σ | DO NEG + 3σ | DO POS | (DO NEG + 3σ) – (DO POS) |
|-----------------|----------|------|-----------|----------|-----------------------|--------|-------------------------------------|
| 1:10.000 | 400 ng | 1:25 | 0,191 | 0,034 | 0,294 | 1,226 | 0,932 |
| | | 1:50 | 0,153 | 0,035 | 0,259 | 0,713 | 0,454 |
| | 200 ng | 1:25 | 0,193 | 0,028 | 0,277 | 1,267 | 0,990 |
| | | 1:50 | 0,165 | 0,029 | 0,254 | 0,623 | 0,369 |
| | 100 ng | 1:25 | 0,262 | 0,056 | 0,374 | 1,308 | 0,878 |
| | | 1:50 | 0,183 | 0,031 | 0,245 | 0,605 | 0,330 |
| 1:20.000 | 400 ng | 1:25 | 0,063 | 0,012 | 0,098 | 0,731 | 0,633 |
| | | 1:50 | 0,054 | 0,012 | 0,091 | 0,497 | 0,406 |
| | 200 ng | 1:25 | 0,069 | 0,014 | 0,110 | 0,756 | 0,645 |
| | | 1:50 | 0,063 | 0,015 | 0,107 | 0,452 | 0,344 |
| | 100 ng | 1:25 | 0,075 | 0,013 | 0,113 | 0,777 | 0,664 |
| | | 1:50 | 0,069 | 0,019 | 0,125 | 0,463 | 0,338 |
| 1:40.000 | 400 ng | 1:25 | 0,031 | 0,006 | 0,050 | 0,314 | 0,265 |
| | | 1:50 | 0,026 | 0,005 | 0,042 | 0,193 | 0,152 |
| | 200 ng | 1:25 | 0,033 | 0,005 | 0,048 | 0,352 | 0,304 |
| | | 1:50 | 0,032 | 0,007 | 0,053 | 0,206 | 0,153 |
| | 100 ng | 1:25 | 0,040 | 0,006 | 0,059 | 0,361 | 0,302 |
| | | 1:50 | 0,034 | 0,005 | 0,048 | 0,194 | 0,146 |
| 1:80.000 | 400 ng | 1:25 | 0,017 | 0,003 | 0,026 | 0,187 | 0,169 |
| | | 1:50 | 0,016 | 0,005 | 0,032 | 0,124 | 0,092 |
| | 200 ng | 1:25 | 0,022 | 0,007 | 0,042 | 0,200 | 0,158 |
| | | 1:50 | 0,016 | 0,003 | 0,026 | 0,119 | 0,093 |
| | 100 ng | 1:25 | 0,021 | 0,001 | 0,024 | 0,206 | 0,182 |
| | | 1:50 | 0,021 | 0,009 | 0,047 | 0,107 | 0,060 |

Legenda: σ (desvio padrão); DO (densidade ótica); NEG (amostras negativas); POS (amostras positivas).

Fonte: O autor.

5.2.3 Antígeno TpN47

O antígeno TpN47 foi avaliado nas quantidades de 400, 200 e 100 ng por cavidade e diluições séricas de 1:25 e 1:50. Adicionado a isto, o conjugado foi usado nas diluições de 1:10.000, 1:20.000, 40.000 e 80.000 vezes (Figura 25).

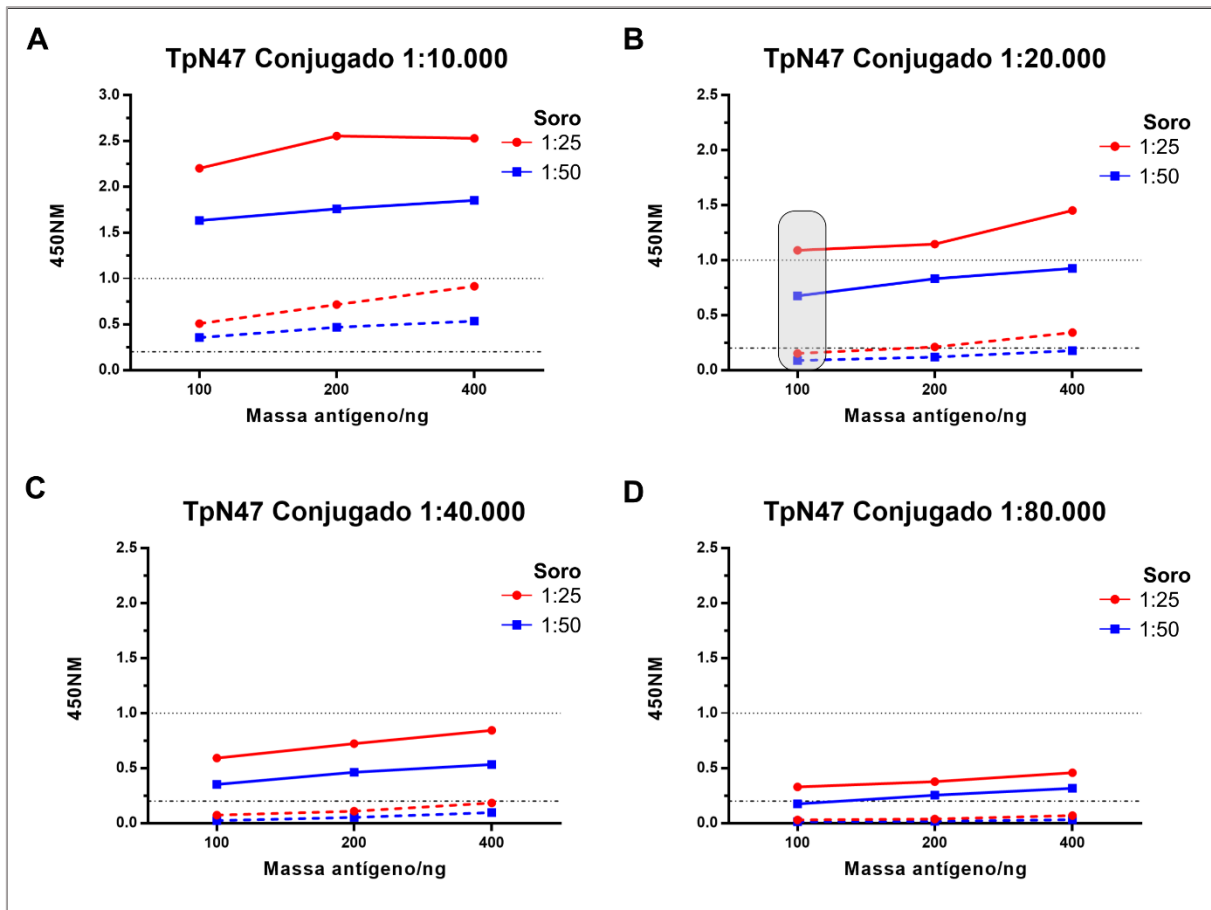


Figura 25: Análise gráfica dos valores médios de absorvância do TpN47.

Nota: As linhas contínuas representam as amostras positivas e as linhas tracejadas as amostras negativas. O limite mínimo inferior requerido para o conjunto de amostras positivas foi de 1.0 e o limite máximo exigido para o conjunto de amostras negativas foi de 0.2. A melhor condição de padronização da molécula está destacada na figura.

Fonte: O autor.

A maior diferença observada entre a média aritmética das DO das amostras positivas e a média aritmética das DO das amostras negativas acrescida de três desvios-padrão foi obtida utilizando 100 ng do antígeno, diluição sérica de 25 vezes e diluição do anticorpo secundário de 20.000 vezes, como demonstrado na Tabela 3. Nestas condições a molécula diferenciou os *pools* negativos e positivos com sinal superior a 0,800.

Tabela 3: Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao TpN47.

| Conjugado | Antígeno | Soro | DO NEG | Σ | DO NEG + 3σ | DO POS | (DO NEG + 3σ) – (DO POS) |
|-----------------|----------|------|--------|----------|--------------------|--------|----------------------------------|
| 1:10.000 | 400 ng | 1:25 | 0,917 | 0,167 | 1,419 | 2,531 | 1,112 |
| | | 1:50 | 0,535 | 0,107 | 0,856 | 1,853 | 0,998 |
| | 200 ng | 1:25 | 0,715 | 0,141 | 1,137 | 2,555 | 1,418 |
| | | 1:50 | 0,470 | 0,055 | 0,636 | 1,761 | 1,125 |
| | 100 ng | 1:25 | 0,508 | 0,100 | 0,807 | 2,204 | 1,397 |
| | | 1:50 | 0,355 | 0,082 | 0,602 | 1,634 | 1,032 |
| 1:20.000 | 400 ng | 1:25 | 0,343 | 0,077 | 0,573 | 1,453 | 0,881 |
| | | 1:50 | 0,178 | 0,038 | 0,294 | 0,926 | 0,632 |
| | 200 ng | 1:25 | 0,212 | 0,053 | 0,372 | 1,147 | 0,775 |
| | | 1:50 | 0,120 | 0,032 | 0,215 | 0,833 | 0,619 |
| | 100 ng | 1:25 | 0,153 | 0,041 | 0,275 | 1,090 | 0,815 |
| | | 1:50 | 0,089 | 0,030 | 0,180 | 0,675 | 0,495 |
| 1:40.000 | 400 ng | 1:25 | 0,185 | 0,047 | 0,326 | 0,845 | 0,519 |
| | | 1:50 | 0,096 | 0,025 | 0,169 | 0,534 | 0,365 |
| | 200 ng | 1:25 | 0,110 | 0,028 | 0,195 | 0,724 | 0,529 |
| | | 1:50 | 0,053 | 0,018 | 0,107 | 0,464 | 0,357 |
| | 100 ng | 1:25 | 0,073 | 0,022 | 0,138 | 0,593 | 0,455 |
| | | 1:50 | 0,024 | 0,010 | 0,056 | 0,354 | 0,298 |
| 1:80.000 | 400 ng | 1:25 | 0,069 | 0,021 | 0,133 | 0,460 | 0,328 |
| | | 1:50 | 0,032 | 0,010 | 0,063 | 0,317 | 0,254 |
| | 200 ng | 1:25 | 0,038 | 0,010 | 0,069 | 0,378 | 0,309 |
| | | 1:50 | 0,018 | 0,009 | 0,044 | 0,255 | 0,211 |
| | 100 ng | 1:25 | 0,031 | 0,011 | 0,064 | 0,330 | 0,266 |
| | | 1:50 | 0,014 | 0,008 | 0,038 | 0,177 | 0,139 |

Legenda: σ (desvio padrão); DO (densidade ótica); NEG (amostras negativas); POS (amostras positivas).

Fonte: O autor.

5.2.4 Antígeno TpN15

Avaliamos este antígeno nas quantidades de 800, 600, 400, 200 e 100 ng por cavidade com diluições séricas de 1:25 e 1:50 e conjugado nas diluições de 1:20.000, 40.000 e 80.000 vezes (Figura 26).

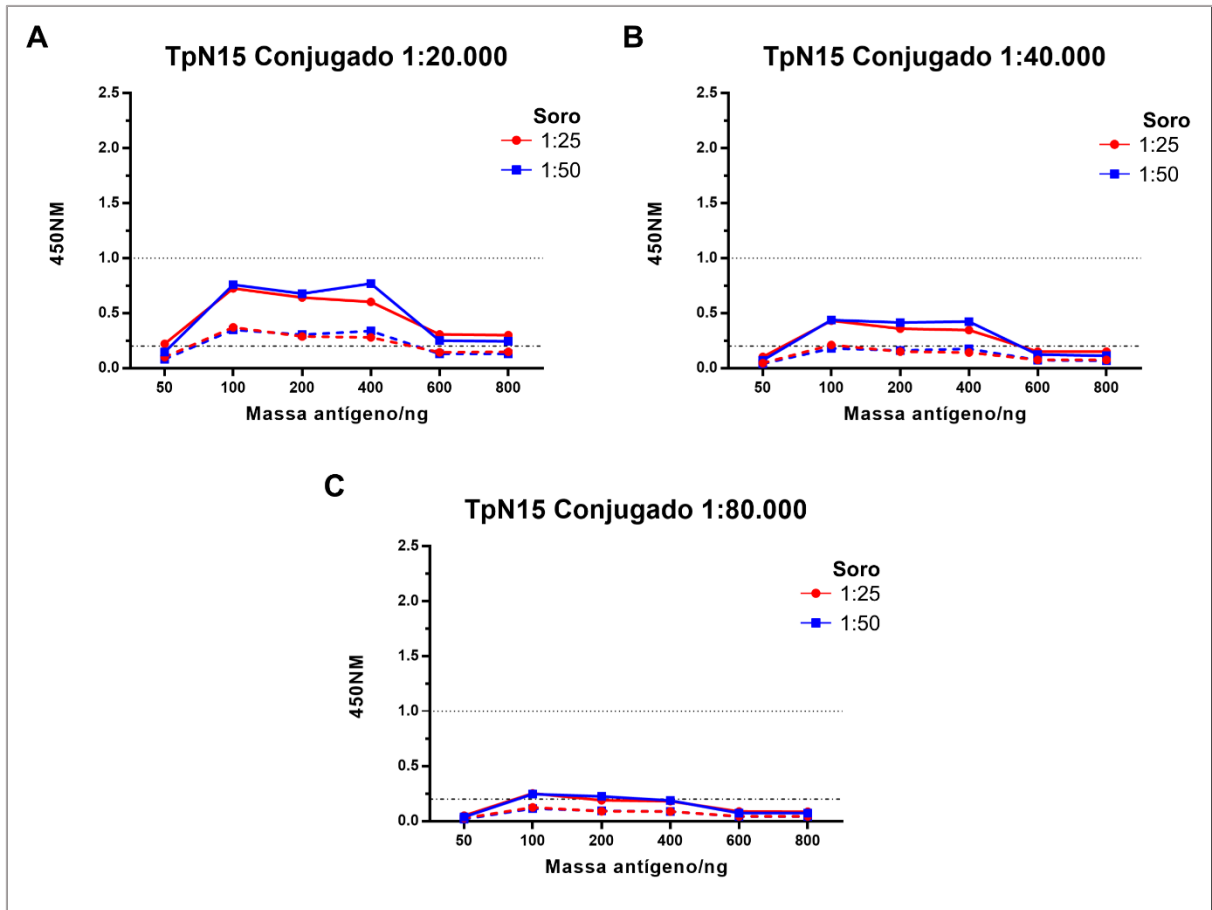


Figura 26: Análise gráfica dos valores médios de absorvância do TpN15.

Nota: As linhas contínuas representam as amostras positivas e as linhas tracejadas as amostras negativas. O limite mínimo inferior requerido para o conjunto de amostras positivas foi de 1.0 e o limite máximo exigido para o conjunto de amostras negativas foi de 0.2.

Fonte: O autor.

Nas condições testadas, a diferença entre a média aritmética das DO das amostras positivas e a média aritmética das DO das amostras negativas não foi significativa, pois os sinais obtidos utilizando as amostras dos *pools* positivos e negativos não atingiram os critérios estabelecidos pelo grupo (Tabela 4). Por conta disso, este antígeno foi descontinuado de nosso estudo.

Tabela 4: Análise da densidade ótica das amostras submetidas ao TpN15.

| Conjugado | Antígeno | Soro | DO NEG | Σ | DO NEG + 3σ | DO POS | (DO NEG + 3σ) – (DO POS) | |
|-----------------|-----------------|--------|--------|----------|--------------------|--------|----------------------------------|--------|
| 1:20.000 | 800 ng | 1:25 | 0.149 | 0.092 | 0.425 | 0.301 | -0.125 | |
| | | 1:50 | 0.130 | 0.063 | 0.319 | 0.244 | -0.076 | |
| | 600 ng | 1:25 | 0.145 | 0.090 | 0.415 | 0.307 | -0.108 | |
| | | 1:50 | 0.131 | 0.073 | 0.348 | 0.250 | -0.098 | |
| | 400 ng | 1:25 | 0.281 | 0.102 | 0.586 | 0.603 | 0.017 | |
| | | 1:50 | 0.339 | 0.126 | 0.717 | 0.769 | 0.052 | |
| | 200 ng | 1:25 | 0.289 | 0.103 | 0.599 | 0.642 | 0.043 | |
| | | 1:50 | 0.306 | 0.088 | 0.569 | 0.678 | 0.109 | |
| | 100 ng | 1:25 | 0.372 | 0.175 | 0.896 | 0.727 | -0.169 | |
| | | 1:50 | 0.348 | 0.143 | 0.778 | 0.760 | -0.018 | |
| | 1:40.000 | 800 ng | 1:25 | 0.075 | 0.045 | 0.211 | 0.151 | -0.061 |
| | | | 1:50 | 0.074 | 0.047 | 0.216 | 0.123 | -0.092 |
| 600 ng | | 1:25 | 0.076 | 0.049 | 0.225 | 0.150 | -0.075 | |
| | | 1:50 | 0.068 | 0.034 | 0.171 | 0.113 | -0.058 | |
| 400 ng | | 1:25 | 0.143 | 0.063 | 0.333 | 0.347 | 0.015 | |
| | | 1:50 | 0.177 | 0.085 | 0.431 | 0.424 | -0.007 | |
| 200 ng | | 1:25 | 0.152 | 0.055 | 0.317 | 0.360 | 0.043 | |
| | | 1:50 | 0.162 | 0.078 | 0.397 | 0.416 | 0.019 | |
| 100 ng | | 1:25 | 0.212 | 0.119 | 0.569 | 0.432 | -0.137 | |
| | | 1:50 | 0.180 | 0.095 | 0.465 | 0.438 | -0.027 | |
| 1:80.000 | | 800 ng | 1:25 | 0.045 | 0.021 | 0.107 | 0.086 | -0.021 |
| | | | 1:50 | 0.042 | 0.023 | 0.111 | 0.073 | -0.038 |
| | 600 ng | 1:25 | 0.044 | 0.022 | 0.111 | 0.088 | -0.023 | |
| | | 1:50 | 0.042 | 0.016 | 0.090 | 0.074 | -0.015 | |
| | 400 ng | 1:25 | 0.089 | 0.042 | 0.216 | 0.183 | -0.033 | |
| | | 1:50 | 0.089 | 0.041 | 0.214 | 0.189 | -0.025 | |
| | 200 ng | 1:25 | 0.090 | 0.043 | 0.219 | 0.191 | -0.028 | |
| | | 1:50 | 0.095 | 0.039 | 0.212 | 0.227 | 0.014 | |
| | 100 ng | 1:25 | 0.125 | 0.065 | 0.321 | 0.253 | -0.068 | |
| | | 1:50 | 0.115 | 0.051 | 0.268 | 0.246 | -0.022 | |

Legenda: σ (desvio padrão); DO (densidade ótica); NEG (amostras negativas); POS (amostras positivas).

Fonte: O autor.

5.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO

5.3.1 Estudo de fase I

A avaliação do potencial diagnóstico das moléculas foi conduzida utilizando 143 amostras séricas positivas e 301 negativas para a sífilis. De acordo com a Tabela 5, os antígenos TpN17, TmpA e TpN47, obtiveram uma área abaixo da curva ROC de 97,2%, 91,8% e 81,6%, respectivamente (Figura 27). Segundo a interpretação dos valores da AUC, TpN17 e TmpA obtiveram valores excelentes, enquanto a TpN47 demonstrou ter um bom valor da área abaixo da curva ROC. Em relação a especificidade, TpN17 e TmpA mostraram um valor de 100% enquanto a TpN47 obteve 99,7%, devido a uma amostra falso-positiva (0,3%). Todavia, do quantitativo de amostras positivas, a TpN17 e a TmpA diagnosticaram 43 (30,1%) como falso-negativas, resultando em sensibilidade de 69,9%. Já a TpN47, diagnosticou 66 (46,2%) amostras como falso-negativas, obtendo uma sensibilidade de 53,8%. Ao analisar o quantitativo de amostras com resultados inconclusivos, observou-se que a TpN17 apresentou 14 amostras positivas na zona cinza (4,67%), enquanto TmpA obteve 11 amostras positivas (3,67%) e 1 amostra negativa (0,33%) na zona cinza; por fim, 10 amostras positivas (3,33%) e 1 amostra negativa (0,33%) estiveram na zona cinza para a TpN47.

Segundo o índice de Younden (J), as três moléculas obtiveram a menor proporção de possíveis erros de classificação, estando entre 0 e 1, com destaque para a TpN17 e TmpA que se aproximaram de 1, tendo o menor número de diagnósticos incorretos. O índice Kappa (κ) mostrou que as moléculas TpN17 e TmpA alcançaram um forte coeficiente de concordância (75,9%) em relação ao padrão ouro utilizado, enquanto a TpN47 mostrou uma concordância moderada (60,8%) (Tabela 5). Os valores médios dos IR estão discriminados por molécula na Tabela 6.

Tabela 5 - Parâmetros de desempenho dos antígenos no estudo de fase I

| Parâmetros de desempenho | TpN17 | | TnpA | | TpN47 | |
|--------------------------|-------|-----------|------|-----------|-------|-----------|
| | % | IC95% | % | IC95% | % | IC95% |
| AUC | 97,2 | 95,9-98,5 | 91,8 | 88,5-95,1 | 81,6 | 76,3-86,9 |
| SEN | 69,9 | 62,0-76,8 | 69,9 | 62,0-76,8 | 53,8 | 45,7-61,8 |
| ESP | 100 | 98,7-100 | 100 | 98,7-100 | 99,7 | 98,1-99,9 |
| PFN | 30,1 | 23,2-38,0 | 30,1 | 23,2-38,0 | 46,2 | 38,2-54,3 |
| PFP | 0 | 0-1,3 | 0 | 0-1,3 | 0,3 | 0-1,9 |
| EXA | 90,3 | 87,2-92,7 | 90,3 | 87,2-92,7 | 84,9 | 81,3-87,9 |
| J | 70 | - | 70 | - | 50 | - |
| κ | 75,9 | 69,1-82,8 | 75,9 | 69,1-82,8 | 60,8 | 52,1-69,4 |

Legenda: IC (intervalo de confiança); AUC (área abaixo da curva); SEN (sensibilidade); ESP (especificidade); PFN (proporção de falso-negativos); PFP (proporção de falso-positivos); EXA (exatidão); J (índice de Younden); κ (índice Kappa de Cohen).

Fonte: O autor.

Tabela 6 – Índice de reatividade dos antígenos no estudo de fase I

| Antígeno | AMOSTRAS POSITIVAS | | | | AMOSTRAS NEGATIVAS | | | |
|----------|--------------------|-----------|----------|------|--------------------|-----------|----------|------|
| | IR | IC95% | σ | CV | IR | IC95% | σ | CV |
| TpN17 | 1,3 | 1,12-1,45 | 0,35 | 0,27 | 0,13 | 0,11-0,14 | 0,32 | 2,46 |
| TpN47 | 1,0 | 0,88-1,2 | 0,41 | 0,40 | 0,38 | 0,36-0,40 | 0,14 | 0,36 |
| TnpA | 1,6 | 1,40-1,87 | 0,38 | 0,23 | 0,40 | 0,38-0,41 | 0,16 | 0,40 |

Legenda: σ (desvio padrão); CV (coeficiente de variação); IC (intervalo de confiança); IR (índice de reatividade).

Fonte: O autor.

Na análise gráfica dos dados (Figura 27), observa-se que as três moléculas mostraram elevada capacidade diagnóstica em virtude dos valores de AUC encontrados, sendo capazes de diferenciar entre amostras positivas e negativas para sífilis ($p < 0,001$).

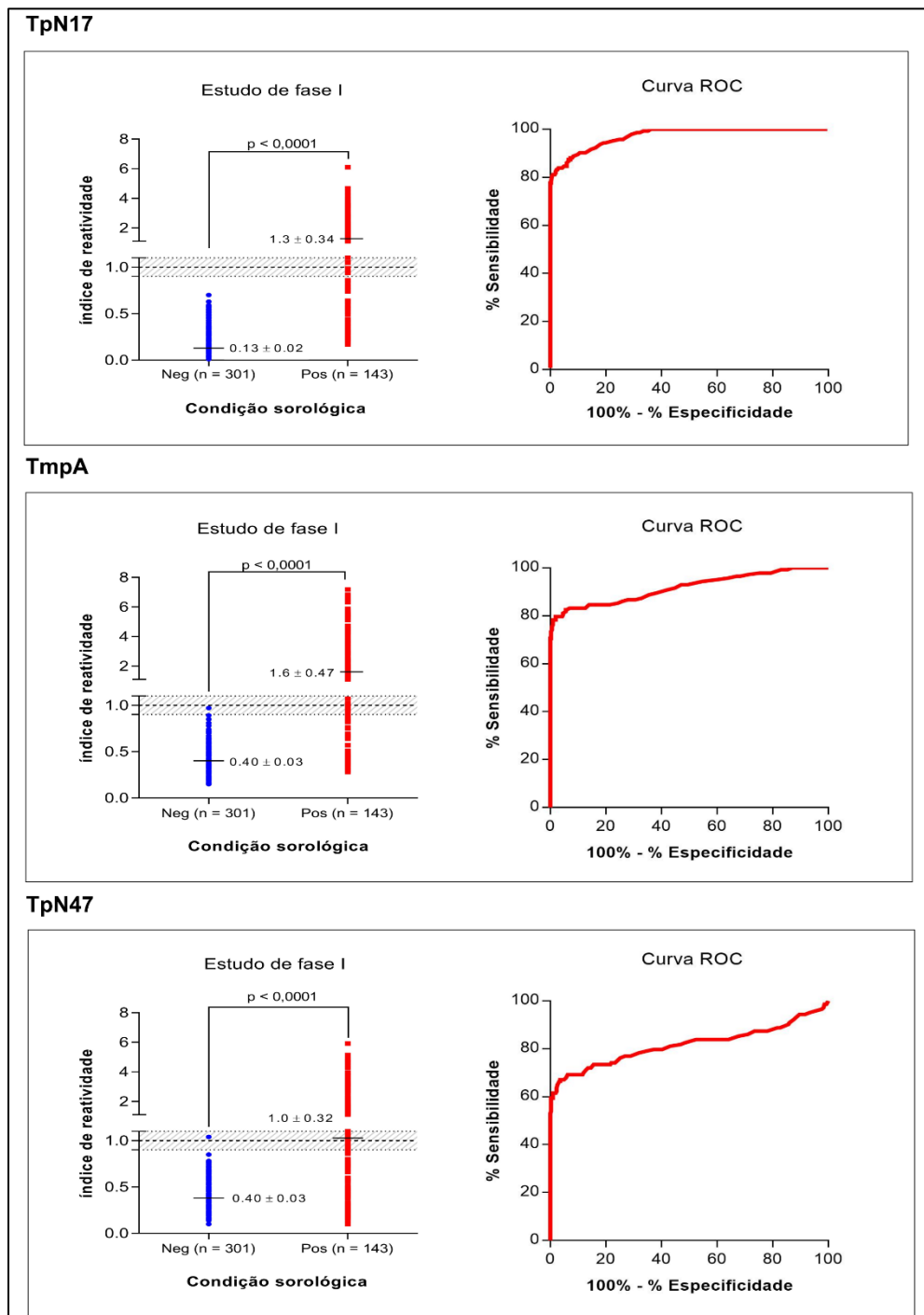


Figura 27: Gráfico dos índices de reatividade dos antígenos treponêmicos no estudo de fase I.

Nota: Os pontos de corte estão representados pelas linhas pontilhadas e as áreas sombreadas representam a zona cinza ($IR \pm 10\%$). Os valores expressos nas barras correspondem às significâncias estatísticas calculadas pelo método de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Legenda: Neg (amostras negativas); Pos (amostras positivas).

Fonte: O autor.

A análise das três moléculas utilizando os IR médios das amostras positivas mostrou não haver sobreposição dos IC95% entre elas. Além disso, na análise estatística, os grupos

mostraram ter uma diferença significativa (Figura 30). Para as amostras negativas, encontrou-se resultados semelhantes, com exceção das moléculas TpN47 e TmpA ($p=$) (Figura 28).

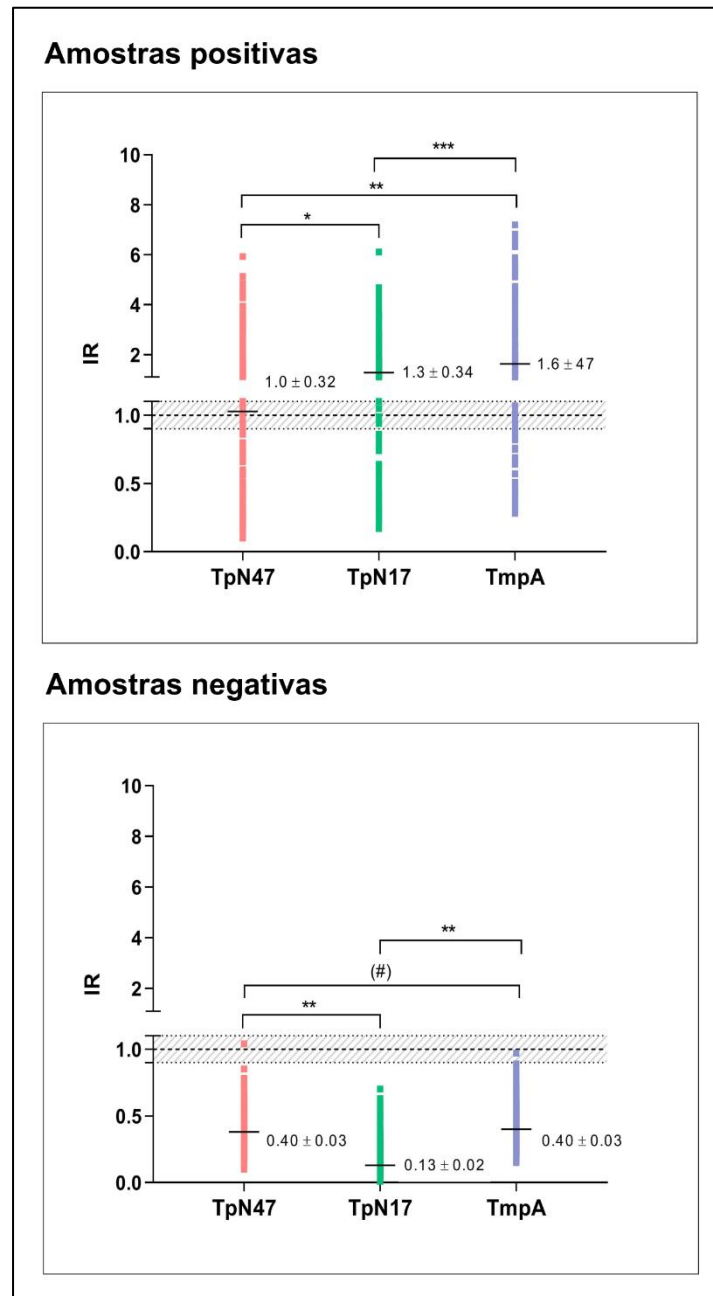


Figura 28: Comparação dos índices de reatividade de amostras negativas e positivas para os antígenos no estudo de fase I.

Nota: Os pontos de corte estão representados pelas linhas pontilhadas e as áreas sombreadas representam a zona cinza ($IR \pm 10\%$). * ($p = 0,0374$); ** ($p < 0,0001$); *** ($p = 0,0328$); (#) ($p = 0,1005$). Os símbolos expressos nas barras correspondem às significâncias estatísticas calculadas pelo método de Mann-Whitney.

Fonte: O autor.

Além dos valores médios analisados, também foi avaliada a sobreposição dos IC95% para os valores de sensibilidade e especificidade das três proteínas. De acordo com a Figura 29, observa-se que, em relação aos dois parâmetros avaliados, houve sobreposição dos IC95% para todas as moléculas, mostrando que não há diferenças significativas entre eles.

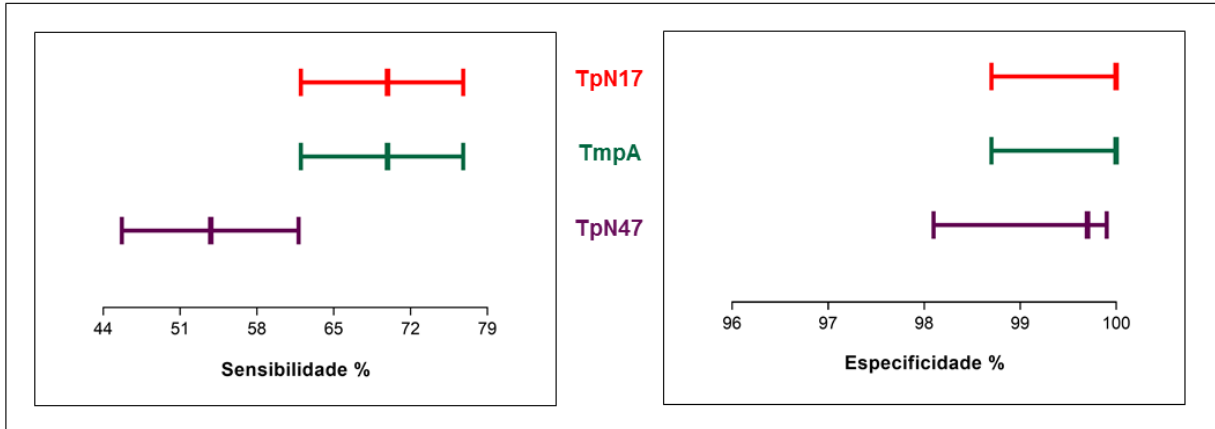


Figura 29: Comparação dos intervalos de confiança (IC95%) da sensibilidade e especificidade dos antígenos no estudo de fase I.

Legenda: IR (índice de reatividade).

Fonte: O autor.

5.3.2 Reprodutibilidade intraplaca

Conforme exposto na Tabela 7, a avaliação da reprodutibilidade intraplaca revelou que todas as moléculas obtiveram altos valores da área abaixo da curva ROC. Em relação aos demais parâmetros de desempenho investigados, a TpN17 obteve valores elevados dentre as quatro medidas. No entanto, para as demais moléculas, houve diferença nos parâmetros avaliados entre as quatro determinações, com destaque para a perda de sensibilidade. A avaliação dos IC95% revelou existir sobreposição dos parâmetros entre a primeira, segunda, terceira e quarta medida. Os índices médios de reatividade estão expostos na Tabela 8.

Tabela 7: Parâmetros de desempenho dos antígenos na avaliação da reprodutibilidade intraplaca.

| ANTG | MED | %AUC (IC95%) | %SEN (IC95%) | %ESP (IC95%) | %EXA (IC95%) | %J |
|--------------|-----|------------------|------------------|-----------------|------------------|-----|
| TpN17 | 1 | 100 | 100 (85,1-100) | 100 (72,2-100) | 100 (89,3-100) | 100 |
| | 2 | 100 | 100 (85,1-100) | 100 (72,2-100) | 100 (89,3-100) | 100 |
| | 3 | 100 | 100 (85,1-100) | 100 (72,2-100) | 100 (89,3-100) | 100 |
| | 4 | 100 | 100 (85,1-100) | 100 (72,2-100) | 100 (89,3-100) | 100 |
| TmpA | 1 | 99,3 (97,4-100) | 81,8 (61,5-92,7) | 100 (72,2-100) | 87,5 (71,9-95) | 80 |
| | 2 | 97 (92,1-100) | 90,9 (72,2-97,5) | 90 (59,6-98,2) | 90,6 (75,8-96,8) | 80 |
| | 3 | 94,5 (86,6-100) | 76,9 (49,7-91,8) | 100 (72,2-100) | 87 (67,9-95,5) | 80 |
| | 4 | 95,45 (87,4-100) | 76,9 (49,7-91,8) | 100 (72,2-100) | 87 (67,9-95,5) | 80 |
| TpN47 | 1 | 98,1 (94,1-100) | 95,5 (78,2-99,2) | 90 (59,6-98,2) | 93,8 (79,9-98,3) | 90 |
| | 2 | 88,1 (69,5-100) | 90,9 (72,2-97,5) | 90 (59,6-98,2) | 90,6 (75,8-96,8) | 80 |
| | 3 | 98,6 (95,4-100) | 86,4 (66,7-95,3) | 100 (72,2-100) | 90,6 (75,8-96,8) | 90 |
| | 4 | 97,7 (92,8-100) | 86,4 (66,7-95,3) | 100 (72,2-100) | 90,6 (75,8-96,8) | 90 |

Legenda: ANTG (antígeno); IC (intervalo de confiança); AUC (área abaixo da curva); SEN (sensibilidade); ESP (especificidade); EXA (exatidão); J (índice de Younden).

Fonte: O autor.

Tabela 8: Índice de reatividade dos antígenos no estudo de fase I.

| ANTG | MED | AMOSTRAS POSITIVAS | | | | AMOSTRAS NEGATIVAS | | | |
|-------|-----|--------------------|-----------|----------|------|--------------------|-----------|----------|------|
| | | IR | IC95% | σ | CV | IR | IC95% | σ | CV |
| TpN17 | 1 | 2,30 | 2,08-2,73 | 0,13 | 0,06 | 0,16 | 0,10-0,32 | 0,35 | 2,19 |
| | 2 | 2,31 | 2,09-2,74 | 0,13 | 0,06 | 0,36 | 0,25-0,60 | 0,28 | 0,78 |
| | 3 | 2,28 | 2,06-2,70 | 0,13 | 0,06 | 0,24 | 0,16-0,43 | 0,19 | 0,79 |
| | 4 | 2,27 | 2,06-2,66 | 0,13 | 0,06 | 0,27 | 0,18-0,46 | 0,27 | 1,00 |
| TpN47 | 1 | 1,69 | 1,52-2,02 | 0,14 | 0,08 | 0,47 | 0,29-0,78 | 0,27 | 0,60 |
| | 2 | 1,68 | 1,52-1,99 | 0,13 | 0,07 | 0,63 | 0,23-1,43 | 0,22 | 0,35 |
| | 3 | 1,70 | 1,55-1,98 | 0,12 | 0,07 | 0,48 | 0,31-0,76 | 0,22 | 0,46 |
| | 4 | 1,65 | 1,49-1,95 | 0,13 | 0,07 | 0,48 | 0,31-0,79 | 0,23 | 0,48 |
| TmpA | 1 | 1,74 | 1,41-2,98 | 0,29 | 0,16 | 0,40 | 0,34-0,48 | 0,11 | 0,27 |
| | 2 | 1,93 | 1,59-3,12 | 0,27 | 0,14 | 0,47 | 0,35-0,77 | 0,31 | 0,66 |
| | 3 | 1,90 | 1,56-3,17 | 0,29 | 0,15 | 0,48 | 0,40-0,80 | 0,42 | 0,87 |
| | 4 | 1,91 | 1,61-3,21 | 0,32 | 0,17 | 0,44 | 0,35-0,70 | 0,34 | 0,77 |

Legenda: ANTG (antígeno); MED (medidas); σ (desvio padrão); CV (coeficiente de variação); IC (intervalo de confiança); IR (índice de reatividade).

Fonte: O autor.

As representações gráficas dos índices de reatividade com os respectivos valores de significância estatística estão na Figura 30, mostrando que não há significância estatística entre as quatro medidas, tanto das amostras positivas, quanto das negativas.

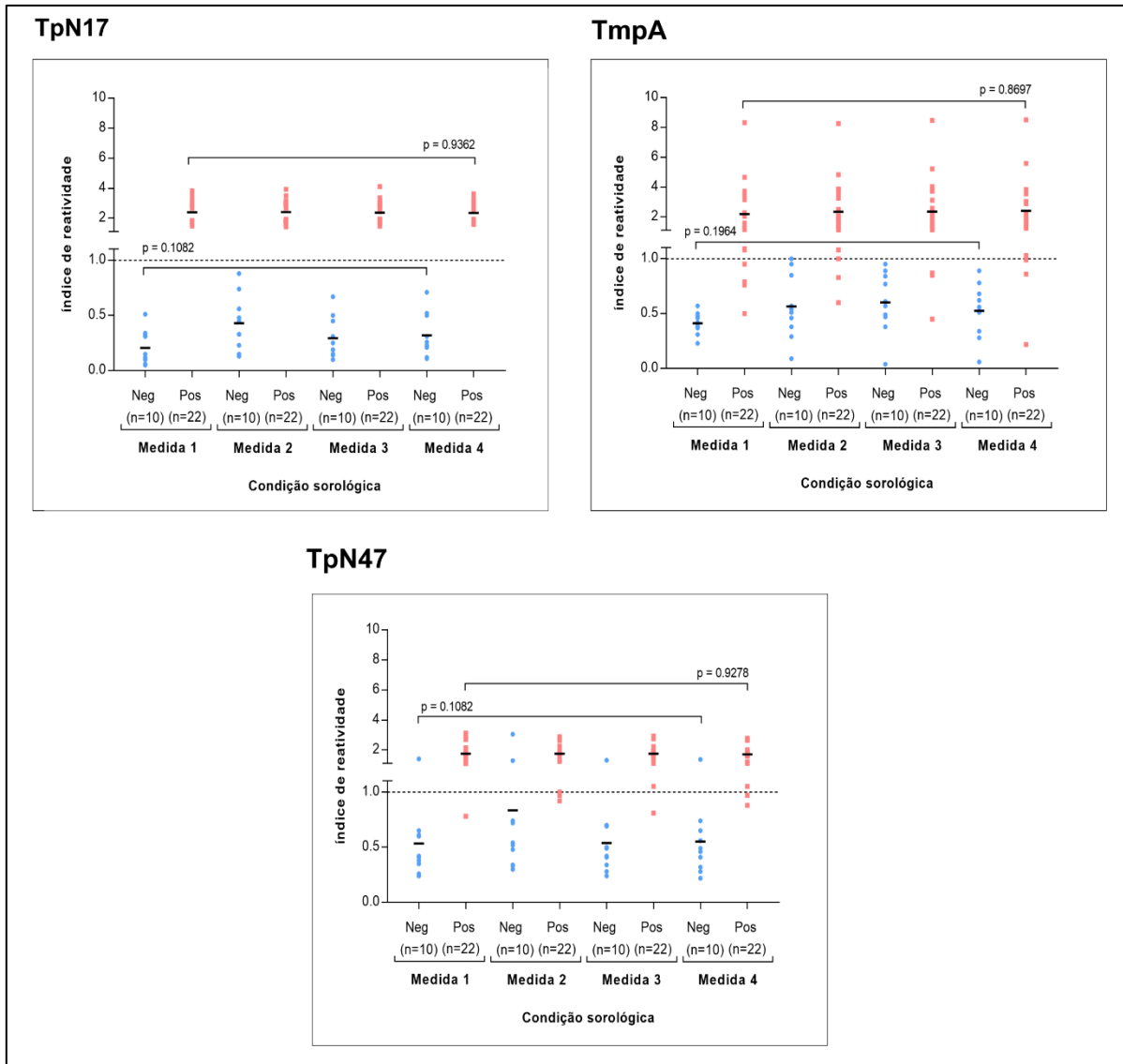


Figura 30: Índice de reatividade dos antígenos na avaliação da reprodutibilidade intraplaca.

Nota: Os valores expressos nas barras correspondem às significâncias estatísticas calculadas pelo método de Kruskal-Wallis. Os pontos de corte estão representados pelas linhas pontilhadas.

Legenda: IR (índice de reatividade).

Fonte: O autor.

5.3.3 Reatividade cruzada

Foram avaliadas 209 amostras de outras doenças infecto-parasitárias, a saber: doença de Chagas (n = 10), dengue (n = 10), hepatite B (n = 20), hepatite C (n = 20), HIV-1/2 (n = 20), esquistossomose crônica (n = 10), leptospirose (n = 80), HTLV-1/2 (n = 20), filariose (n = 10), leishmaniose tegumentar e visceral (n = 9). Foi observada reatividade em 2,9% (6/209) das amostras para TpN17 (leptospirose: 6) e 16,74% (35/209) para a TmpA (leptospirose: 32; dengue: 1; filariose: 1; esquistossomose crônica: 1) e 16,74% (35/209) para TpN47

(leptospirose: 32; filarose: 1; HIV-1/2: 2), conforme representada na Figura 31. Ao considerar a zona cinza ($IR \pm 10\%$) foi observado que 6,22% (13/209) das amostras apresentaram resultados inconclusivos para a TmpA, enquanto 4,78% (10/209) foram inconclusivas para a TpN47.

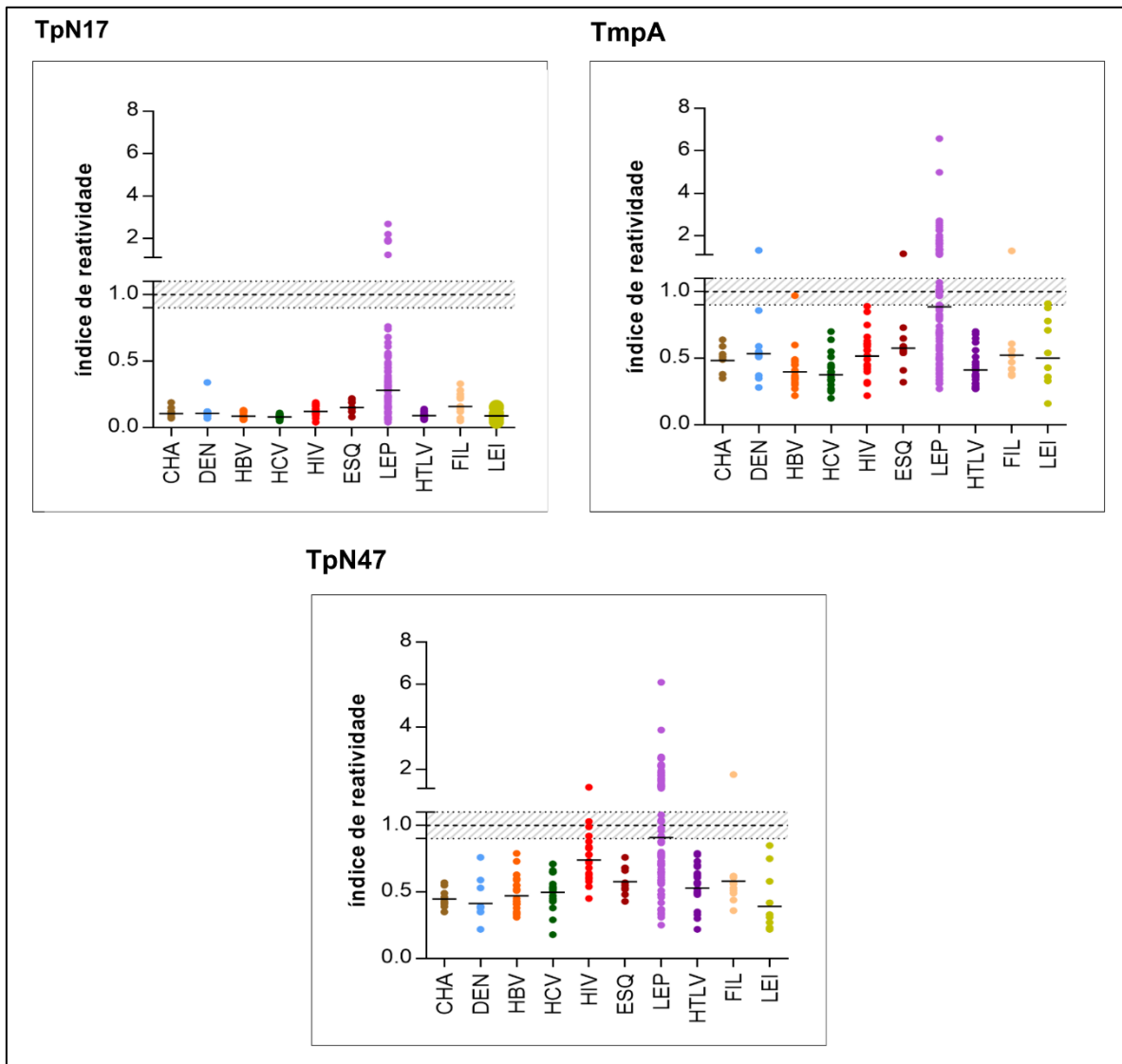


Figura 31: Análise gráfica dos índices de reatividade dos antígenos treponêmicos utilizando amostras séricas de indivíduos portadores de doenças infecto-parasitárias.

Nota: Os pontos de corte estão representados pelas linhas pontilhadas e as áreas sombreadas representam a zona cinza ($IR \pm 10\%$).

Legenda: CHA (doença de Chagas); DEN (dengue); ESQU (esquistossomose); FIL (filariose); LEIS (leishmaniose); HBV (hepatite B); HCV (hepatite C); HIV (vírus da imunodeficiência humana); HTLV (vírus linfotrófico de células T humanas); IR (índice de reatividade); LEP (leptospirose).

Fonte: O autor.

Na análise do IR para a TpN17 observa-se que os valores variaram de 0,08 para HBV e HCV até 0,28 para leptospirose. Para TmpA o valor mínimo encontrado foi de 0,38 para HCV e o maior foi de 0,89 para leptospirose. Quanto ao antígeno TpN47, o menor valor demonstrado foi de 0,42 para dengue e o maior de 0,91 para leptospirose (Tabela 9).

Tabela 9: Índice de reatividade dos antígenos na fase I do estudo, utilizando as amostras séricas de indivíduos portadores de outras doenças infecto-parasitárias.

| Morbidades | TpN17 | | TmpA | | TpN47 | |
|-------------|-------|-----------|------|-----------|-------|-----------|
| | IR | IC95% | IR | IC95% | IR | IC95% |
| CHA | 0,10 | 0,08-0,13 | 0,48 | 0,42-0,56 | 0,45 | 0,40-0,50 |
| DEN | 0,10 | 0,08-0,15 | 0,53 | 0,39-0,73 | 0,42 | 0,32-0,52 |
| HBV | 0,08 | 0,07-0,10 | 0,40 | 0,34-0,46 | 0,47 | 0,41-0,53 |
| HCV | 0,08 | 0,07-0,09 | 0,38 | 0,32-0,44 | 0,50 | 0,42-0,58 |
| HIV | 0,12 | 0,10-0,15 | 0,52 | 0,44-0,61 | 0,74 | 0,66-0,82 |
| ESQ | 0,15 | 0,12-0,19 | 0,58 | 0,45-0,73 | 0,58 | 0,51-0,66 |
| LEP | 0,28 | 0,23-0,34 | 0,89 | 0,77-1,02 | 0,91 | 0,80-1,04 |
| HTLV | 0,09 | 0,08-0,10 | 0,41 | 0,36-0,48 | 0,53 | 0,45-0,62 |
| FIL | 0,16 | 0,10-0,25 | 0,52 | 0,40-0,67 | 0,59 | 0,43-0,78 |
| LEIS | 0,08 | 0,06-0,12 | 0,50 | 0,32-0,77 | 0,40 | 0,27-0,58 |

Legenda: CHA (doença de Chagas); DEN (dengue); ESQU (esquistossomose); FIL (filariose); LEIS (leishmaniose); HBV (hepatite B); HCV (hepatite C); HIV (vírus da imunodeficiência humana); HTLV (vírus linfotrópico de células T humanas); IC (intervalo de confiança); IR (índice de reatividade); LEP (leptospirose).

Fonte: O autor.

5.3.4 Conservação das proteínas TpN17, TpN47 e TmpA de *T. pallidum*

Uma hipótese inicial para explicar os altos índices de reatividade cruzada observados em amostras de soro de indivíduos com leptospirose, pode ser a conservação das sequências de proteínas entre as bactérias. Portanto, avaliamos a conservação da sequência de aminoácidos desses antígenos usando as ferramentas BLASTP e PSI-BLAST e pesquisando no banco de dados Genbank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A TpN17 pertence à família das proteínas lipoproteínas NlpE e seus homólogos são encontrados em uma ampla variedade de bactérias, incluindo espécies patogênicas e entéricas. Para TpN17, a identidade de aminoácidos foi encontrada na faixa de 34-39% e a similaridade na faixa de 49-57%. Uma pesquisa limitada a Leptospiraceae identificou quatro proteínas que mostram 35-40% de identidade em um

segmento de 50 a 60 aminoácidos (proteína que contém o domínio de ligação a glicolípido putativo de *Leptonema illini*, ID da sequência: WP_002775996.1; sequência de proteína de ligação de *Leptospira broomii* 4Fe-4S ID: WP_010568632.1; *Leptospira fletcheri* tipo I 3-desidroquinato desidratase, sequência ID: WP_135767117.1; *Leptospira inadai* proteína de ligação 4Fe-4S, sequência ID: WP_020988179.1). Também foram encontrados homólogos de TpN47 em espécies bacterianas patogênicas e entéricas, embora o número de espécies no Genbank pareça ser menor do que para TpN17. Os homólogos de TpN47 compartilham aproximadamente 27-28% de identidade de aminoácidos e 40-42% de similaridade. Uma pesquisa limitada a Leptospiraceae identificou três proteínas mostrando aproximadamente 30% de identidade sobre um segmento de 109 aminoácidos (alfa / beta hidrolase, ID da sequência: WP_108927162.1 e proteína de domínio semelhante a PGAP1, ID do domínio: GBF37386.1 em *Leptospira johnsonii* e TetR Regulador transcricional da família / AcrR, ID da sequência: WP_109022509.1 em *Leptospira kobayashii*). As pesquisas no Genbank mostraram homólogos de TmpA apenas para espécies do gênero *Treponema* com identidade e similaridade de aminoácidos na faixa de 30% e 50%, respectivamente. Uma busca por homólogos de TmpA limitados a Leptospiraceae não encontrou nenhuma sequência homóloga.

5.3.5 Análise combinatória dos resultados positivos

Das 143 amostras séricas positivas para sífilis, 39 (27,3%) apresentaram resultados discordantes, 34 (23,8%) foram falso-negativas e 70 (49%) foram verdadeiramente positivas quando submetidas ao estudo de fase I. Dos resultados discordantes, 8 amostras só foram positivas para a TpN17, 3 para a TmpA e nenhuma para a TpN47. Somente 28 foram positivas para pelo menos duas proteínas: 21 para a TpN17 e TmpA, 1 para TpN17 e TpN47 e 6 para TmpA e TpN47 (Figura 32).

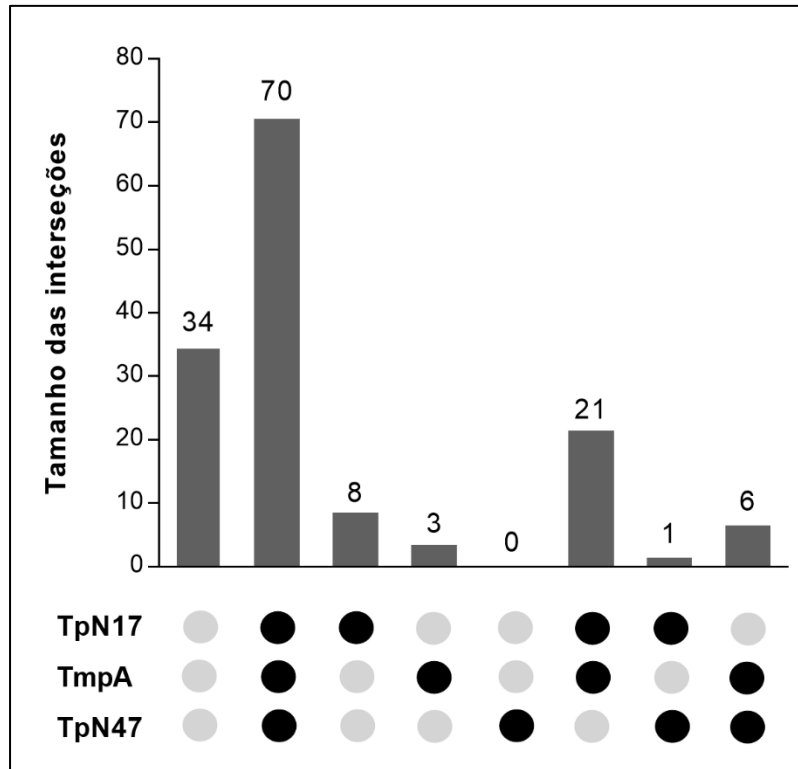


Figura 32: Análise gráfica da avaliação combinatória usando os antígenos treponêmicos para as amostras positivas

Fonte: O autor.

6 DISCUSSÃO

6.1 PADRONIZAÇÃO DO ELISA INDIRETO

A padronização do ELISA indireto foi realizada através de diluições seriadas dos antígenos, dos *pools* de amostras séricas positivas e negativas para anticorpos anti-treponêmicos e do conjugado anti-IgG humano. As melhores condições destes componentes para a otimização dos ensaios e obtenção da maior diferença do sinal entre as amostras positivas e negativas, foram de 100 ng (TpN17 e TpN47) e 200 ng (TmpA) do antígeno, diluição séria de 1:25 (TpN17, TpN47 TmpA) e diluição de 1:10.000 (TmpA) e 1:20.000 (TpN17 e TpN47) do conjugado anti-IgG humano. A molécula TpN15 foi desconsiderada deste estudo por não ter sido possível padronizá-la, provavelmente devido à problemas de expressão e purificação, pois foi possível observar a presença de três bandas inespecíficas. As condições de antígeno, soro e conjugado utilizadas em outros estudos com o ELISA, variaram significativamente quando comparadas com a nossa padronização. De fato, Gerber; Krell; Morenz (1997) utilizaram 1 µg/mL (100 ng/cavidade) do antígeno (TpN47, TpN17 e TmpA) para sensibilização das placas. O soro foi usado em uma diluição de 1:400 e conjugado de 1:4.000. Comparada a outro trabalho, a TmpA na mesma condição de 1 µg/mL, teve melhor desempenho com o soro menos diluído (1:100) e o conjugado menos concentrado (1:25.000) (IJSELUIDEN *et al.*, 1989a). Já a TmpA e TpN47, quando utilizadas na mesma concentração de 1 µg/mL, tiveram a diluição do soro reduzida para 1:5. Neste mesmo estudo, a TpN17 foi a única molécula usada na concentração de 5 µg/mL (500 ng/cavidade) e mesma condição de soro (ROSTOPIRA *et al.*, 2003).

Considerando outras condições, Martin *et al.* (2008) utilizaram 4 µg/mL (400 ng/cavidade) para TmpA e TpN47 e 2 µg/mL (200 ng/cavidade) para TpN17. A diluição do soro variou de acordo com o antígeno, sendo de 1:500 para TmpA e TpN47 e 1:1000 para a TpN17. Nestas condições, o conjugado foi usado na diluição de 1:2.000. Quando empregada na concentração de 2 µg/mL (200 ng/cavidade), a TpN17 apresentou melhor resultado com uma menor diluição do soro (1:100), mas com o conjugado mais diluído (1:3.000) (VOORHIS *et al.*, 2003). Na concentração de 5 µg/mL por poço (500 ng/cavidade), os antígenos TpN17, TmpA e TpN47 mostram melhores resultados quando o soro foi diluído 1.000 vezes, mas comparada ao estudo de Rostopira *et al.* (2003), a diluição do soro para a TpN17 foi 200 vezes maior (FUJIMURA *et al.*, 1997). Ambos os estudos não relataram a concentração usada de

conjugado que pudessem justificar a diferença na padronização. Sun *et al.* (2009) avaliaram a TpN17 e TpN47 utilizando 50 µg/mL (5.000 ng/cavidade) do antígeno, 1:400 de soro para a TpN47 e 1:600 para a TpN17. Neste estudo, os autores usaram o soro na diluição de 1:3.000.

Comparadas ao nosso estudo, a maioria das padronizações encontradas para as 3 proteínas (TpN17, TpN47 e TmpA), utilizaram sensibilização *overnight* e agentes bloqueadores peptídicos, como leite desnatado ou BSA. Todo este processamento torna o ensaio mais laborioso e onera o custo de produção. Nós utilizamos como reagente o WellChampion™ (lote 130703; Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca), que funciona como agente bloqueador e estabilizante, além de reduzir o tempo de sensibilização, a quantidade de resíduos, os custos da produção e remover duas etapas de lavagem. Além disto, grande parte dos estudos utilizaram quantidades maiores de antígeno por poço e, em sua grande totalidade, todos tiveram que empregar soros mais diluídos, ao contrário da nossa diluição de 1:25. Em relação a isto, é mais vantajoso reduzir em quantidade de antígeno, do que no soro que pode ser obtido em quantidades maiores com maior facilidade. Já para o conjugado, a maioria dos autores também utilizou grandes concentrações, com exceção de Ijsselmuiden *et al.* (1989b) que utilizaram o anticorpo conjugado mais diluído (1:25.000), em condições similares à nossa. Com soros cada vez mais diluídos, a tendência é aumentar a concentração do conjugado, como visto nos estudos acima.

6.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DIAGNÓSTICO

6.2.1 Estudo de fase I

Comparado ao primeiro estudo de fase I realizado por Oliveira (2014), o desempenho diagnóstico das proteínas, neste trabalho, não foi tão elevado. Foram observados valores de sensibilidade de 69,9% (IC% 62-76,8) para TpN17, 69,9% (IC% 62-76,8) para TmpA e 53,8% (IC% 45,7-61,8) para TpN47, e especificidade de 100% (IC% 98,7-100) para TpN17 e TmpA e 99,7% (IC% 98,1-99,9) para TpN47, possivelmente devidos à mudança do painel sorológico utilizado. Porém, apesar dos baixos valores de sensibilidade, as moléculas apresentaram diferença estatística entre as amostras positivas e negativas. Além disso, a diferença de sensibilidade analítica deve ser considerada ao comparar os nossos resultados com aqueles obtidos por Oliveira (2014), visto que o microarranjo líquido é capaz de detectar quantidade menores de anticorpos específicos quando comparado aos imunoenaios baseados em colorimetria (SONG *et al.*, 2005).

Com o objetivo de avaliar a proporção de resultados falso-negativos para cada molécula, estratificou-se as amostras positivas de acordo com a sua origem: Bahia ou Pernambuco. Na análise, foi observado que não houve diferença estatística para as três proteínas, entre as amostras positivas da Bahia e de Pernambuco. Por isto, os resultados falso-negativos não foram associados a um painel sorológico específico, excluindo a possibilidade de divergências nos resultados de acordo com a origem das amostras. Isto corrobora com os achados de que diversas cepas do *T. pallidum* possuem uma identidade de 99,57% a 99,98% com alta similaridade genômica, sem que haja variabilidade genética capaz de influenciar nos testes diagnósticos a depender da preparação antigênica utilizada (MIKALOVÁ *et al.*, 2010).

Contrao os resultados encontrados neste estudo, observou-se que a Tpn17 apresentou elevado desempenho diagnóstico, com sensibilidade que variou de 84,4% a 100% e especificidade de 100% em plataforma ELISA (FUJIMURA *et al.*, 1997; GERBER; KRELL; MORENZ, 1997; SUN *et al.*, 2009; VOORHIS *et al.*, 2003). Utilizando Western blot, a proteína obteve sensibilidade de 96% e especificidade de 100% (BACKHOUSE; NESTEROFF, 2001). Na quimiluminescência, os valores de sensibilidade e especificidade encontrados, foram de 99,2% e 99,9%, respectivamente (MARANGONI *et al.*, 2005).

Em relação à TmpA, outros estudos relataram altos valores de sensibilidade e especificidade, que variaram de 76% a 100% e 100%, respectivamente, para o ELISA (FUJIMURA *et al.*, 1997; GERBER; KRELL; MORENZ, 1997; IJSSELMUIDEN *et al.*, 1989b). Utilizando Western blot, a proteína demonstrou ser 100% sensível e 96% específica (BACKHOUSE; NESTEROFF, 2001). Também foi realizado um estudo utilizando o EIA, LIA e ELLIFA, com resultados de sensibilidade e especificidade, que variaram de 93,3% a 97% e 98% a 100%, respectivamente (IJSSELMUIDEN *et al.*, 1989^a; RODRÍGUEZ *et al.*, 2002).

Por fim, a Tpn47 foi citada em estudos com ELISA. Os resultados dos parâmetros analisados mostraram que a proteína possui sensibilidade de 82,1% a 100% e especificidade de 100% (FUJIMURA *et al.*, 1997; GERBER; KRELL; MORENZ, 1997; SUN *et al.*, 2009). Uma alta sensibilidade (100%) também já foi demonstrada em um estudo com Western blot, mas uma baixa especificidade de 20% foi relatada, contrao nossos resultados (BACKHOUSE; NESTEROFF, 2001).

Dados da literatura científica reportaram taxas superiores de sensibilidade para as três proteínas, e somente a especificidade permaneceu igual ou próxima aos nossos valores. Apesar disto, os resultados de sensibilidade encontrados nos estudos que empregaram o ELISA, foram inferiores comparados às outras metodologias. Isto se deve à diferença de sensibilidade analítica existente entre os diferentes testes. De fato, a quimiluminescência, por exemplo, é amplamente

utilizada para o diagnóstico clínico devido as inúmeras vantagens, como: não causa precipitação enzimática, apresenta elevados valores de sensibilidade e especificidade, interpretações objetivas, ampla faixa de resposta linear, alto rendimento e eficiência (BOOSCHE *et al.*, 2014; BORGES; FERNANDES; ROCHA, 2002; LIU *et al.*, 2015; QIU *et al.*, 2015; TIWARI *et al.*, 2015). Além disto, os baixos limites de detecção conferem ao método alta sensibilidade analítica, sendo capazes de detectar pequenas concentrações de anticorpos séricos (CALOKERINOS; DEFTEREOS; BAEYENS, 1995).

Não obstante, os nossos resultados foram inferiores em relação aos estudos supracitados, e é possível que a sobreposição dos IC95% dos parâmetros de desempenho e as baixas sensibilidades, tenham sido decorrentes da diferença entre o nosso painel sorológico e o dos outros estudos, principalmente em relação ao conhecimento do estágio da infecção (IJSELMUIDEN *et al.*, 1989a). Alguns estudos descreveram que os antígenos apresentam diferentes reatividades aos anticorpos a depender do estágio em que se encontra o indivíduo (MO *et al.*, 2010). Além disto, quando o ELISA é utilizado com antígenos recombinantes isolados, o teste é menos sensível que a sorologia convencional para sífilis (GERBER; KRELL; MORENZ, 1997).

6.2.2 Reprodutibilidade intraplaca

Com o objetivo de investigar a consistência dos resultados na repetição das reações, realizadas na mesma microplaca e sob as mesmas condições, conduziu-se a análise de reprodutibilidade intraplaca ou repetitividade. Na análise das três moléculas, não houve diferenças estatísticas quando os valores de AUC, sensibilidade, especificidade, exatidão, índice de Younden e IR foram comparados para as quatro medidas adotadas, tanto para o grupo de amostras positivas quanto para as negativas. Segundo Jacobson (1998), o coeficiente de variação (CV) deve ser inferior a 20% para que a reprodutibilidade seja aceitável usando o ELISA como plataforma diagnóstica. Em nosso caso, encontramos valores $\leq 1\%$ para as amostras positivas e $< 15\%$ para as negativas, indicando que os ensaios utilizando os antígenos possuem boa repetitividade.

6.2.3 Reatividade cruzada

Para a TpN17 foi observada uma reatividade de 2,9% (6/209), sendo todas as 6 amostras positivas para leptospirose. A TmpA e a TpN47 mostraram um índice de reação cruzada de

16,74% (35/209), sendo para a TmpA: 32 amostras de leptospirose, 1 de dengue, 1 de filariose e 1 de esquistossomose crônica; e a TpN47: 32 de leptospirose, 1 de filariose e 2 de HIV-1/2. Analisando outros estudos, que também avaliaram reatividade cruzada para algumas das doenças infecto-parasitárias consideradas neste trabalho, foram observados resultados contrários aos nossos, como pode ser visto no Quadro 3.

Quadro 3: Análise de reação cruzada de proteínas recombinantes do *Treponema pallidum*

| Antígeno | Metodologia | Amostra (n) | Reação cruzada | Referência |
|---------------------|--------------------|--|-----------------------------|----------------------------------|
| TpN47, TpN17 | ELISA | Leptospirose (10) | 0 | (SAMBRI <i>et al.</i> , 2001b) |
| TpN17, TmpA e TpN47 | ELISA | Hepatite B (40); Hepatite C (48) | 1 Hepatite B (TmpA) | (ROSTOPIRA <i>et al.</i> , 2003) |
| TpN17 | ELISA | Leptospirose (9) | 0 | (VOORHIS <i>et al.</i> , 2003) |
| TpN17 e TpN47 | Imunocromatografia | HIV (4); Hepatite B (90); Hepatite C (40) | 0 | (LIN <i>et al.</i> , 2010) |
| TpN47, TmpA e TpN17 | Western blot | Leptospirose (11); HIV (5); Hepatite B (5) | 2 Hepatite B (TpN47 e TmpA) | (BACKHOUSE; NESTEROFF, 2001) |
| TpN47, TpN17 e TmpA | Imunocromatografia | HIV (10); Hepatite B (10); Hepatite C (10) | 0 | (HAGEDORN <i>et al.</i> , 2002) |
| TpN17, TpN47 | Imunoslot-blot | Leptospirose (3) | 0 | (SATO <i>et al.</i> , 2004) |
| TpN47, TpN17 e TmpA | Western blot | Lepstospirose (6) | 0 | (SAMBRI <i>et al.</i> , 2001a) |
| TmpA | EIA | Leptospirose (8); HIV/AIDS (12); Hepatites (9) | 1 Hepatites; 1 HIV | (RODRÍGUEZ <i>et al.</i> , 2002) |

Fonte: O autor.

Legenda: EIA (enzyme-linked assay).

Rodríguez *et al.* (2002) relataram duas possíveis justificativas para os resultados de reatividade cruzada encontrados por eles (1 amostra positiva para hepatite e 1 amostra positiva para HIV-1/2). A primeira sugere que as amostras que positivaram, provavelmente são de indivíduos previamente infectados e tratados, mas os anticorpos permaneceram circulantes no

organismo. Porém, nós buscamos descartar a possibilidade de usar amostras que também fossem positivas para sífilis, sendo esta possibilidade rejeitada. Uma outra justificativa baseia-se na existência de algumas impurezas ou epítomos da *Escherichia coli*, como resultado de uma purificação ineficaz, o que poderia promover reações inespecíficas. A avaliação da interferência por proteínas inespecíficas também já foi descrita por Silva (2007), em um ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando antígeno recombinante para o diagnóstico da hepatite C. A falta de especificidade do teste foi relacionada aos resquícios de proteínas traduzidas da sequência gênica do vetor plasmidial, responsáveis pelas reações cruzadas.

6.2.4 Conservação das proteínas TpN17, TpN47 e TmpA de *T. pallidum*

Em relação à reação cruzada com leptospirose, resultados falso-positivos podem ser devidos à semelhança entre as proteínas de *T. pallidum* e *Leptospira interrogans*. Uma base no nível de reatividade cruzada de anticorpos com antígenos de diferentes espécies bacterianas já foi descrita em estudos anteriores (ZAJKOWSKA, 2014; KEASEY *et al.*, 2009; GOLKOCHEVA-MARKOVA *et al.*, 2008). Embora as pesquisas no Genbank não tenham revelado nenhum homólogo para essas três proteínas em *Leptospira interrogans*, foi possível observar que especialmente TpN17 e TpN47 são proteínas bastante conservadas entre bactérias, incluindo espécies patogênicas e entéricas e em algumas espécies do gênero *Leptospira*. Não está claro por que não são encontrados homólogos dessas proteínas nas sequências do genoma de *Leptospira interrogans*. Pode ser que os genomas de *Leptospira interrogans* não sejam bem anotados e os antígenos homólogos existentes ainda não tenham sido identificados. As informações recuperadas do banco de dados usando pesquisas de similaridade de sequência identificaram homólogos de TmpA apenas em espécies do gênero *Treponema* e apenas com essa informação, não é possível propor uma hipótese de reatividade cruzada com base na conservação entre a proteína TmpA de *T. pallidum* e outras espécies bacterianas. Desta forma, estes resultados não podem ser interpretados apenas como falso-positivos, mas talvez como um fato que precisa ser mais investigado.

6.2.5 Análise combinatória dos resultados positivos

Ao comparar os resultados dos estudos realizados com as proteínas TpN17, TmpA e TpN47 isoladamente, em relação às misturas antigênicas, observou-se que existe uma melhora significativa nos parâmetros de desempenho dos ensaios quando as microplacas são

sensibilizadas com misturas antigênicas. Pois, apesar das proteínas recombinantes apresentarem potencial para diagnóstico, o uso isolado destes antígenos apresentou resultados inferiores quando comparados às misturas antigênicas. Já é descrito que a combinação de dois ou mais antígenos recombinantes como preparação antigênica possibilita um aumento significativo da sensibilidade sem perda da especificidade. Considerando isto, a perda de sensibilidade ao utilizar peptídeos recombinantes isolados, permitiu a vários autores sugerir que somente uma mistura destas moléculas aumentaria a sensibilidade, igual à soma dos antígenos individuais (CAMUSSONE *et al.*, 2009; SCHMIDT, 2004). Pensando nisto, realizou-se uma análise combinatória dos resultados positivos do estudo, afim de avaliar a viabilidade de misturas equimolares dos antígenos TpmA, TpN17 e TpN15. Verificou-se que do quantitativo de 143 amostras séricas positivas para sífilis, utilizadas no estudo de fase I, 39 (27,3%) apresentaram resultados discordantes entre as proteínas, sendo 8 amostras positivas para a TpN17, 3 para a TmpA e nenhuma para a TpN47. Enquanto 21 foram positivas para a TpN17 e TmpA, 1 para TpN17 e TpN47 e 6 para TmpA e TpN47. Desta forma, todos os soros que obtiveram resultados discordantes para pelo menos uma proteína, podem melhorar os resultados se analisados por uma matriz composta pela mistura das 3 moléculas recombinantes.

Sambri *et al.* (2001a) em um estudo para avaliação de um novo ensaio imunoenzimático para diagnóstico da sífilis, relatou que ao utilizar 3 proteínas recombinantes conjuntamente (TpN47, TpN17 e TpN15), a sensibilidade do teste foi de 98,3% e especificidade de 98,9%, comprovando que os antígenos possuem alta capacidade em detectar anticorpos IgG e IgM no soro de indivíduos em todos os estágios da sífilis. Um outro estudo, baseado no princípio de imunensaio enzimático, teve como objetivo avaliar o INNO-LIA como teste confirmatório para a sífilis. Foram utilizadas as mesmas proteínas supracitadas, sendo demonstrada sensibilidade e especificidade de 100% e 99,3%, respectivamente. Os valores superaram os resultados de testes como TPHA e IgG-FTA-ABS, podendo assim ser considerado um teste confirmatório útil para a sífilis por aumentar a confiabilidade do diagnóstico em relação às técnicas convencionais atuais (HAGEDORN *et al.*, 2002). Utilizando a mesma matriz antigênica, Schmidt (2004) e Borelli *et al.* (2009) avaliaram partículas de gel sensibilizadas para detectar anticorpos anti-*T. pallidum*. O primeiro estudo obteve sensibilidade de 91,9% e especificidade de 99,8%. No segundo, a sensibilidade foi de 89,5% e especificidade 100%. Os autores concluíram que os testes obtiveram elevado desempenho diagnóstico.

Mo *et al.* (2010) encontraram sensibilidade de 100% e especificidade de 99,9% utilizando a quimiluminescência como plataforma diagnóstica, e uma taxa de concordância de 100% com TPPA. Concluiu-se que o teste é objetivo e inequívoco, podendo ser adequado para triagem em

grande escala como um teste treponêmico capaz de substituir o TPPA. Além disto, um outro estudo mostrou que os resultados de imunoreatividade para a técnica de *imuno-slot blot* baseada em antígenos recombinantes foram adequados para o uso destes ensaios no diagnóstico laboratorial da sífilis. A sensibilidade alcançou um valor de 95,1% e especificidade de 94,7% (SATO *et al.*, 2004). Por fim, Young *et al.* (1998a, 1998b) avaliaram, em dois trabalhos diferentes, os antígenos TpN17, TpN47 e TpN15 utilizando a EIA como plataforma diagnóstica. Os autores observaram sensibilidade de 100%. Contudo, quando os antígenos foram avaliados usando aglutinação de látex, a sensibilidade diminuiu para 95,6%. Em ambos os estudos a especificidade permaneceu em 99,8%. A elevada sensibilidade e especificidade do ICE Syphilis EIA, combinada com sua adequação para automação, o torna um teste de triagem ideal, assim como o *Syphilis Fast* demonstrou ser um ensaio de triagem altamente específico, simples e rápido, com sensibilidade comparável aos testes treponêmicos.

Utilizando somente TpN17 e TpN47 dois estudos foram realizados por Lin *et al.* (2011) e Lin *et al.* (2010). O primeiro avaliou um ensaio de imunocromatografia com ouro coloidal para detecção de anticorpos IgM anti-*T. pallidum* específicos como marcadores sorológicos para a recidiva e infecção da sífilis. Os resultados demonstraram sensibilidade e especificidade de 98,21% e 99,04%, respectivamente, sugerindo que o teste pode ser usado como marcador sorológico ao invés da pesquisa de IgM através do FTA-ABS. No segundo estudo, os pesquisadores avaliaram um ensaio de imunocromatografia com ouro coloidal para detectar anticorpos IgG anti-*T. pallidum* contra TpN17 e TpN47. A sensibilidade encontrada alcançou um valor de 99,38% e especificidade de 99,96%. Em virtude do alto desempenho diagnóstico, os autores sugerem que este teste pode ser usado como exame confirmatório e de triagem no lugar do FTA-ABS IgG.

As proteínas TpN15, TpN17, TpN47 e TmpA também foram avaliadas em conjunto, utilizando ELISA como plataforma diagnóstica. Valores de sensibilidade de 99,4% e especificidade de 99,7% foram encontrados por Rostopira *et al.* (2003) sugerindo a sua utilização na triagem da sífilis em laboratórios clínicos. Martin *et al.* (2008) reportaram resultados semelhantes, com sensibilidade e especificidade de 100%. Zrein *et al.* (1995) analisaram a TpN15 e TpN47 com a metodologia ELISA, e relataram valores de sensibilidade de 100% e especificidade de 99,8%. O estudo permitiu concluir que os antígenos recombinantes podem ser usados como marcadores para pesquisa e epidemiologia do tratamento da sífilis. Por outro lado, sugeriram que o ensaio é adequado para uso em triagem em bancos de sangue e que poderia substituir tanto o ensaio não-treponêmico VDRL quanto o ensaio treponêmico TPHA. Por fim, através do *Western blot*, as proteínas TpN47, TmpA, TpN37, TpN17 e TpN15 foram

analisadas em conjunto e o estudo demonstrou que os cinco antígenos podem ser usados como substitutos para os antígenos do lisado de *T. pallidum*. Com uma sensibilidade de 98,9% e especificidade de 99,3%, os antígenos utilizados permitiram ao método ser um bom teste confirmatório para a detecção de anticorpos contra no soro (SAMBRI *et al.*, 2001a). Além destes estudos, outros trabalhos utilizando outras matrizes antigênicas já foram publicados e corroboram com os achados da literatura referentes ao bom desempenho de teste que combinam dois ou mais antígenos recombinantes (Quadro 4 - Apêndice C).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Apesar dos baixos valores de sensibilidade, as proteínas TpN47, TpN17 e TmpA mostraram elevada capacidade diagnóstica em virtude dos valores de AUC encontrados;
- Todas as moléculas obtiveram alta especificidade nos painéis estudados;
- Na análise das 3 moléculas, não houve diferença estatisticamente significativa na análise da repetitividade, indicando que os ensaios utilizando os antígenos possuem elevada reprodutibilidade intra-placa
- Foram observados altos índices de reação cruzada para a TmpA e TpN47, comparadas a TpN17;
- Uma melhora na sensibilidade pode ser alcançada quando misturas antigênicas forem avaliadas, consistindo na próxima etapa de nossa investigação.

8 PERSPECTIVAS

- Avaliação das proteínas em um estudo de Fase II;
- Avaliação da reprodutibilidade inter-operadores;
- Avaliação da estabilidade dos antígenos sensibilizados por um período de 48 meses;
- Avaliação do desempenho dos antígenos TpN17 e TpN47 em misturas equimolares.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, N. C. C. DE. **Soroepidemiologia de *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* e *Treponema pallidum* em portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), no estado do Pará.** Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infeciosos e Parasitários, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.
- AVELLEIRA, J. C. R.; BOTTINO, G. Sífilis: diagnóstico, tratamento e controle. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 2, p. 111–126, 2006.
- BACKHOUSE, J. L.; NESTEROFF, S. I. *Treponema pallidum* western blot: comparison with the FTA-ABS test as a confirmatory test for syphilis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 39, n. 1, p. 9–14, Jan. 2001.
- BARSANTI, C. *et al.* Diagnóstico de sífilis congênita: comparação entre testes sorológicos na mãe e no recém-nascido. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 605–611, Nov./Dez. 1999.
- BAUGHN, R. R., MUSER, D. M. Secondary syphilitic lesions. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 18, n. 1, p. 205–216, Jan. 2005.
- BISSIO, E. *et al.* Very high incidence of syphilis in HIV-infected men who have sex with men in Buenos Aires city: a retrospective cohort study. **Sexually Transmitted Infections**, London, v. 93, n. 5, p. 323–326, Aug. 2016.
- BLANCO, D. R.; MILLER, J. N.; LOVETT, M. A. Surface antigens of the syphilis spirochete and their potential as virulence determinants. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 3, n. 1, p. 11–20, Jan./Mar. 1997.
- BORELLI, S. *et al.* Evaluation of a particle gel immunoassay as a screening test for syphilis. **Clinical and Epidemiological Study**, München, v. 37, n. 1, p. 26–28, Feb. 2009.
- BORGES, E. P. *et al.* Desenvolvimento de um dispositivo de baixo custo para medidas por quimiluminescência. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6B, p. 1191–1193, Nov./Dez. 2002.
- BOOSCHE, D. V. *et al.* Vitros 5600 syphilis TPA assay: evaluation of an automated chemiluminescence assay for detection of *Treponema pallidum* antibodies in a high prevalence setting. **Sexually Transmitted Diseases**, Philadelphia, v. 41, n. 11, p. 680–683, Nov. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico**, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Diagnóstico da Sífilis**, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Diagnóstico laboratorial de doenças sexualmente transmissíveis, incluindo o vírus da imunodeficiência humana**, 2015b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual técnico para diagnóstico da sífilis**, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para atenção integral às pessoas com infecções sexualmente transmissíveis**, 2015a.
- BRIGHI, G. *et al.* Congenital syphilis like many years ago. **Case Reports in Infectious Diseases**, London, v. 2011, July 2011.

- BRIGHT, A.; DUPS, J. Infectious and congenital syphilis notifications associated with an ongoing outbreak in northern Australia. **Communicable Diseases Intelligence Quarterly Report**, Canberra, v. 40, n. 1, p. E7-10, Mar. 2016.
- BRINKMAN, M. B. *et al.* Reactivity of antibodies from syphilis patients to a protein array representing the *Treponema pallidum* proteome. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 3, p. 888–891, Mar. 2006.
- CALOKERINOS, A. C.; DEFTEREOS, N. T.; BAEYENS, W. R. G. Chemiluminescence in drug assay. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 13, n. 9, p. 1063-1071, Aug. 1995.
- CAMUSSONE, C. *et al.* Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 16, n. 6, p. 899–905, June 2009.
- CARLSON, J. A. *et al.* The immunopathobiology of syphilis: the manifestations and course of syphilis are determined by the level of delayed-type hypersensitivity. **The American Journal Dermatopathology**, New York, v. 33, n. 5, p. 433–460, July 2011.
- CARRARA, S. **Tributo a Vênus: a luta contra a sífilis no Brasil, da passagem do século aos anos 40**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1996.
- CASAL, C. A. D.; ARAÚJO, E. D. C.; CORVELO, T. C. D. O. Aspectos imunopatogênicos da sífilis materno-fetal: revisão de literatura. **Revista Paranaense de Medicina**, Belém, v. 26, n. 2, p. 2–7, Abr./Jun. 2012.
- CASTRO, R. M. R. T. DE. **Contribuição para o estudo de infecção por *Treponema pallidum* subespécie pallidum: resposta serológica, diagnóstico molecular e genotipagem**. Dissertação (Mestrado) - Pós-graduação em Microbiologia, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2004.
- CAVAGNARO, S. M. F. *et al.* Early congenital syphilis: a case report. **Revista Chilena de Pediatría**, Santiago, v. 85, n. 1, p. 86-93, Feb. 2014.
- CHERNYADYEV, S. A. *et al.* Fournier's gangrene: Literature review and clinical cases. **Urologia Internationalis**, Basel, v. 101, n. 1, p. 91–97, June 2018.
- CLYNE, B.; JERRARD, D. A. Syphilis Testing. **The Journal of Emergency Medicine**, New York, v. 18, n. 3, p. 361–367, Oct. 2000.
- COX, D. L. *et al.* Surface immunolabeling and consensus computational framework to identify candidate rare outer membrane proteins of *Treponema pallidum*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 78. n. 12, p. 5178-5194, Dec. 2010.
- CRUZ, A. R. *et al.* Secondary syphilis in Cali, Colombia: new concepts in disease pathogenesis. **Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 5, May. 2010.
- DANG, Q. *et al.* Evaluation of specific antibodies for early diagnosis and management of syphilis. **International Journal Dermatology**, Philadelphia, v. 45, n. 10, p. 1169–1171, Oct. 2006.
- DONIACH, D. *et al.* Mitochondrial and other tissue autoantibodies in patients with biological false positive reactions for syphilis. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 6, n. 6, p. 871-884, Jun. 1970.

European centre for disease prevention and control. Sexually transmitted infections in Europe. Stockholm: ECDC, 2015.

FANFAIR, R. N.; WALLINGFORD, M.; LONG, L. L. *et al.* Acquired macrolide-resistant *Treponema pallidum* after a human bite. **Sexually Transmitted Diseases**, Philadelphia, v. 41, n. 8, p. 493-5, Aug. 2014.

FERREIRA, L. A. P. **O conceito de contágio de Girolamo Fracastoro nas teses sobre sífilis e tuberculose.** Tese (Doutorado) - Pós-Graduação em Enfermagem, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

FERREIRA, L. J. M. **Infecção por *Treponema pallidum*: análise serológica e pesquisa de DNA.** Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2013.

FICARRA, G.; CARLOS, R. Syphilis: The renaissance of an old disease with oral implications. **Head and Neck Pathology**, Secaucus, v. 3, n. 3, p. 195–206, Sept. 2009.

FIELDSTEEL, A. H.; STOUT, J. G.; BECKER, F. A. Comparative behavior of virulent strains of *Treponema pallidum* and *Treponema pertenuis* in gradient cultures of various mammalian cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 24, n. 2, p. 337–345, May. 1979.

FORRESTEL, A. K.; KOVARIK, C. L.; KATZ, K. A. Sexually acquired syphilis: Laboratory diagnosis, management, and prevention. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 82, n. 1, p. 17-28, Jan. 2020.

FRAGA, D. D. DE. **Detecção de *Treponema pallidum* em líquido cefalorraquidiano (LCR) pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em pacientes HIV positivos assintomáticos com diagnóstico de sífilis latente.** Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

FRASER, C. M. *et al.* Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. **Science**, New York, v. 281, n. 5375, p. 375–388, July 1998.

FUJIMURA, K. *et al.* Reactivity of recombinant *Treponema pallidum* (r-Tp) antigens with anti-tp antibodies in human syphilitic sera evaluated by ELISA. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 11, n. 6, p. 315–322, 1997.

GAYET-AGERON, A. *et al.* Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis: a systematic review and meta-analysis. **Sexually Transmitted Infections**, London, v. 3, n. 89, p. 251–256, May. 2013.

GERBER, A.; KRELL, S.; MORENZ, J. Recombinant *Treponema pallidum* antigens in syphilis serology. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 196, n. 5, p. 535–549, Aug. 1996-1997.

GLATZ, M. *et al.* A multicenter prospective trial to assess a new real-time polymerase chain reaction for detection of *Treponema pallidum*, Herpes simplex-1/2 and *Haemophilus ducreyi* in genital, anal and oropharyngeal ulcers. **Clinical Microbiology and Infection**, London, v. 20, n. 12, p. 1020–7, Dec. 2014.

GOH, B. T. Syphilis in adults. **Sexually Transmitted Infection**, London, v. 81, n. 6, p. 448–452, Dec. 2005.

GOLKOCHEVA-MARKOVA E. *et al.* Cross-reaction between Yersinia outer membrane proteins and anti-Borrelia antibodies in sera of patients with Lyme disease. **Clinical**

Microbiology and Infection, London, v. 14, n. 9, p. 873-875, Sep. 2008.

GREINER, M.; PFEIFFER, D.; SMITH, R. D. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 45, n. 1/2, p. 23-41, May. 2000.

HAGEDORN, H. *et al.* Evaluation of INNO-LIA syphilis assay as a confirmatory test for syphilis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 3, p. 973–978, Mar. 2002.

HESTON, S.; ARNOLD, S. Syphilis in children. **Infectious Disease Clinic of North America**, Philadelphia, v. 32, n. 1, p. 129-144, Mar. 2018.

HEYMANS, R. *et al.* Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 2, p. 497–502, Feb. 2010.

HOOK, E. W. Syphilis. **The Lancet**, London, v. 389, n. 10078, p. 1550-1557, Apr. 2017.

HU, J. *et al.* Prevalence and trends of HIV, syphilis, and HCV in migrant and resident men who have sex with men in Shandong, China: results from a serial cross-sectional study. **Public Library of Science One**, San Francisco, v. 12, n. 1, p. e0170443, Jan. 2017.

IJSSELMUIDEN, O. E. *et al.* Sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay using the recombinant DNA-derived *Treponema pallidum* protein TmpA for serodiagnosis of syphilis and the potential use of TmpA for assessing the effect of antibiotic therapy. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 27, n. 1, p. 152–157, Jan. 1989a.

IJSSELMUIDEN, O. E. *et al.* Line immunoassay and enzyme-linked line immunofiltration assay for simultaneous detection of antibody to two treponemal antigens. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 8, n. 8, p. 716–721, Aug. 1989b.

JACINTO, S. *et al.* A sífilis congénita ainda existe! Análise retrospectiva de 12 anos de uma grande maternidade. **Acta Pediátrica Portuguesa**, Lisboa, v. 38, n. 2, p. 65–68, Maio 2007.

JACOBSON, R. H. Validation des épreuves sérologiques pour le diagnostic des maladies infectieuses. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, v. 17, n. 2, p. 487–506, 1998.

JANIER, M. *et al.* 2014 European guideline on the management of syphilis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 1581–1593, June 2015.

JIANG, C. *et al.* Evaluation of the recombinant protein TpF1 of *Treponema pallidum* for serodiagnosis of syphilis. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 20, n. 10, p. 1563–1568, Oct. 2013.

JIANG, C. *et al.* Evaluation of FlaB1, FlaB2, FlaB3, and Tp0463 of *Treponema pallidum* for serodiagnosis of syphilis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 84, n. 2, p. 105–111, Feb. 2016.

JUNIOR, F. L. A. Uveíte e lesões primárias disseminadas na sífilis adquirida. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Niterói, v. 19, n. 3-4, p. 180-183, 2007.

KARTHIKEYAN, G. Minerva. **British Medical Journal**, London, v. 330, n. 7490, p. 548, Mar. 2005.

KEASEY S. L. *et al.* Extensive antibody cross-reactivity among infectious gram-negative bacteria revealed by proteome microarray analysis. **Mol Cell Proteomics**, Bethesda, v. 8, n.

5, p. 924-935, May. 2009.

KIM, H. J. *et al.* Permutation tests for joinpoint regression with applications to cancer rates. **Statistics in Medicine**, Chichester, v. 19, n. 3, p. 335–351, Jan. 2000.

KITAYAMA, K. *et al.* Syphilis in the Americas: A protocol for a systematic review of syphilis prevalence and incidence in four high-risk groups, 1980-2016. **Systematic Reviews**, London, v. 6, n. 1, p. 195-201, Oct. 2017.

KOJIMA, N. *et al.* The PICASSO cohort: baseline characteristics of a cohort of men who have sex with men and male-to-female transgender women at high risk for syphilis infection in Lima, Peru. **BioMed Central Infectious Diseases**, London, v. 17, n. 1, p. 255–262, Apr. 2017.

KOJIMA, N.; KLAUSNER, J. D. An update on the global epidemiology of syphilis. **Current Epidemiology Reports**, Switzerland, v. 5, n. 1, p. 24–38, Mar. 2018.

KUBANOV, A.; RUNINA, A.; DERYABIN, D. Novel *Treponema pallidum* recombinant antigens for syphilis diagnostics: current status and future prospects. **BioMed Research International**, New York, v. 2017, p. 1436080, Apr. 2017.

LAFOND, R. E.; LUKEHART, S. A. Biological basis for syphilis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 19, n. 1, p. 29-49, Jan. 2006

LARSEN, S. A.; STEINER, B. M.; RUDOLPH, A. H. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 8, n. 1, p. 1-21, Jan. 1995.

LASAGABASTER, M. A.; GUERRA, L. O. Sífilis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 37, n. 6, p. 398-404, Jun./July 2019.

LESIŃSKI, J.; KRACH, L.; KADZIEWICZ, E. Specificity, sensitivity, and diagnostic value of the TPHA test. **The British Journal of Venereal Diseases**, v. 50, n. 5, p. 334-340, Oct. 1974.

LIN, L. *et al.* Development of a colloidal gold-immunochromatography assay to detect immunoglobulin G antibodies to *Treponema pallidum* with TPN17 and TPN47. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 68, n. 3, p. 193–200, Nov. 2010.

LIN, L. *et al.* Evaluation of a colloidal gold immunochromatography assay in the detection of *Treponema pallidum* specific IgM antibody in syphilis serofast reaction patients: a serologic marker for the relapse and infection of syphilis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 70, n. 1, p. 10–16, May. 2011.

LIU, L. *et al.* Establishment and evaluation of a one-step microplate chemiluminescence immunoassay to detect IgG antibody against *Treponema pallidum*. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 29, n. 6, p. 493-7, Nov. 2015.

LUCKY, T. T. A. *et al.* Trends in transfusion-transmissible infections among Australian blood donors from 2005 to 2010. **Transfusion**, Arlington, v. 53, n. 11, p. 2751–2762, Nov. 2013.

MARANGONI, A. *et al.* Evaluation of LIAISON treponema screen, a novel recombinant antigen-based chemiluminescence immunoassay for laboratory diagnosis of syphilis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 12, n. 10, p. 1231–1234, Oct. 2005.

MARTIN, I. E. *et al.* Serological diagnosis of syphilis: enzyme-linked immunosorbent assay to measure antibodies to individual recombinant *Treponema pallidum* antigens. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, New York, v. 29, n. 2, p. 143–151, Mar. 2008.

MATTEI, P. L. *et al.* Syphilis: a reemerging infection. **American Family Physician**, Kansas, v. 86, n. 5, p. 433–440, Sep. 2012.

MATTHES, A. C.; LINO, A. P.; COSTA, C. A.; MENDONÇA, C. V.; BEL, D. D. Sífilis congênita: mais de 500 anos de existência e ainda uma doença em vigência. **Revista de Pediatria Moderna**, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 149-154, 2012.

MCGILL, M. A. *et al.* Characterization and serologic analysis of the *Treponema pallidum* proteome. **Infection and Immunity**, Washington, v. 78, n. 6, p. 2631–2643, June 2010.

MEHDI, T.; BASHARDOOST, N.; AHMADI, M. Kernel smoothing for ROC curve and estimation for thyroid stimulating hormone. **International Journal of Public Health Research**, Kuala Lumpur, n. 2011, p. 239-42, 2011.

METZ, C. E. Basic principles of ROC analysis. **Seminars in Nuclear Medicine**, New York, v. 8, n. 4, p. 283-298, Oct. 1978.

MIKALOVÁ, L. *et al.* Genome analysis of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* and subsp. *pertenue* strains: most of the genetic differences are localized in six regions. **Public Library of Science One**, San Francisco, v. 5, n. 12, p. e15713, Dec. 2010.

MO, X. *et al.* Evaluation of a new chemiluminescence immunoassay for diagnosis of syphilis. **European Journal of Medical Research**, Munich, v. 15, n. 2, p. 66–69, Feb. 2010.

MON'ALVEME, R. Sífilis congênita: Um olhar sobre a atenção primária. 2015. Disponível em: <https://www.slideshare.net/rodrigo-montalverne1/sfilis-cognita-rodrigo-montalverne>. Acesso em: 16 nov. 2018.

MORSLED, M. G.; SINGHB, A. E. Recent trends in the serologic diagnosis of syphilis. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 22, n. 2, p. 137–143, Feb. 2015.

MÜLLER, H. *et al.* Comparative analysis of immunohistochemistry, polymerase chain reaction and focus-floating microscopy for the detection of *Treponema pallidum* in mucocutaneous lesions of primary, secondary and tertiary syphilis. **British Journal of Dermatology**, Oxford, v. 165, n. 1, p. 50–60, July 2011.

GERALDES NETO, B. *et al.* A sífilis no século XVI - O impacto de uma nova doença. **Arquivos de Ciências da Saúde**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 127-129, July/Set. 2009.

NEWMAN, L. *et al.* Global estimates of the prevalence and incidence of four curable sexually transmitted infections in 2012 based on systematic review and global reporting. **Public Library of Science One**, San Francisco, v. 10, n. 12, p. 1–17, Dec. 2015.

NGWANYA, R. M.; KAKANDE, B.; KHUMALO, N. P. Double morphology: tertiary syphilis and acquired immunodeficiency syndrome - a rare association. **Case Reports in Dermatological Medicine**, New York, v. 2017, p. 3843174, Oct. 2017.

NIRAGIRA, O. *et al.* Benzathine penicillin G for the management of early syphilis among HIV co-infected persons: a systematic review. **Canada Communicable Disease Report**, Ottawa, v. 42, n. 2, p. 30–36, Feb. 2016.

- NORRIS, S. J.; COX, D. L.; WEINSTOCK, G. M. Biology of *Treponema pallidum*: correlation of functional activities with genome sequence data. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, Wymonham, v. 3, n. 1, p. 37–62, Jan. 2001.
- NYATSANZA, F.; TIPPLE, C. Syphilis: presentations in general medicine. **Clinical Medicine**, London, v. 16, n. 2, p. 184–188, Apr. 2016.
- O'BYRNE, P; MACPHERSON, P. Syphilis. **British Medical Association**, England, v. 366, p: I4159, July 2019.
- OLIVEIRA, U. D. DE. **Desenvolvimento de antígenos recombinantes para imunodiagnóstico de sífilis**. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- PEELING, R. W.; YE, H. Diagnostic tools for preventing and managing maternal and congenital syphilis: an overview. **Bulletin of The World Health Organization**, v. 82, n. 6, June. 2017a.
- PEELING, R. W. *et al.* Syphilis. **Nature Reviews Disease Primers**, London, v. 3, p. 17073, Oct. 2017b.
- PEREIRA, A. L.; PITA, J. R. Alexander Fleming (1881-1955): da descoberta da penicilina (1928) ao prêmio Nobel (1945). **Revista da Faculdade de Letras**, Porto, v. 6, p. 129–151, 2005.
- QIU, X. H. *et al.* Evaluation of the boson chemiluminescence immunoassay as a firstline screening test in the ECDC algorithm for syphilis serodiagnosis in a population with a high prevalence of syphilis. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 53, n. 4, p. 371-4, Jan. 2015.
- RADOLF, J. D.; LUKEHART, S. A. Pathogenic *Treponema*: molecular and cellular biology. Wymonham, UK: Caister Academic Press, 2006.
- RADOLF, J. D.; NORGARD, M. V.; SCHULZ, W. W. Outer membrane ultrastructure explains the limited antigenicity of virulent *Treponema pallidum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 86, n. 6, p. 2051–2055, Mar. 1989.
- RAMÍREZ-AMADOR, V. *et al.* Clinical spectrum of oral secondary syphilis in HIV-infected patients. **Journal of Sexually Transmitted Diseases**, New York, v. 2013, p. 892427, Dec. 2013.
- RATNAM, S. The laboratory diagnosis of syphilis. **Canadian Journal of Infections Diseases and Medical Microbioly**, Oakville, v. 16, n. 1, p. 45–51, Jan. 2005.
- RODRÍGUEZ, I. *et al.* Comparison of a recombinant-antigen enzyme immunoassay with *Treponema pallidum* hemagglutination test for serological confirmation of syphilis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 3, p. 347–349, Apr. 2002.
- ROSTOPIRA, N. R. *et al.* Elaboration of enzyme immunoassay based on recombinant antigens and intended for diagnostics of syphilis. **Folia Microbiologica**, New York, v. 48, n. 4, p. 549–553, July 2003.
- ROURK, A. R.; NOLTE, F. S.; LITWIN, C. M. Performance characteristics of the reverse syphilis screening algorithm in a population with a moderately high prevalence of syphilis. **American Society of Clinical Pathologists**, Philadelphia, v. 146, n. 5, p. 572-577, Nov.

2016.

SÁEZ-ALQUÉZAR, A. *et al.* Desempenho de testes sorológicos para sífilis, treponêmicos (ELISA) e não treponêmicos (VDRL e RPR), na triagem sorológica para doadores de sangue – confirmação dos resultados por meio de três testes treponêmicos (FTA-ABS, WB e TPHA). **Revista de Patologia Tropical**, Goiás, v. 36, n. 3, p. 215–228, Jan. 2008.

SAMBRI, V. *et al.* Western immunoblotting with five *Treponema pallidum* recombinant antigens for serologic diagnosis of syphilis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, Washington, v. 8, n. 3, p. 534–539, May. 2001a.

SAMBRI, V. *et al.* Evaluation of recomWell Treponema, a novel recombinant antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of syphilis. **Clinical Microbiology and Infection**, London, v. 7, n. 4, p. 200–205, Apr. 2001b.

SANDES, V. **Análise de nova metodologia na triagem sorológica para sífilis em doadores de sangue**. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2016.

SANTOS, F. L. N. **Caracterização do potencial diagnóstico de poliantígenos para detecção do *Trypanosoma cruzi* na fase crônica da doença de Chagas**. Tese (Doutorado) - Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

SARACENI, V. *et al.* Vigilância epidemiológica da transmissão vertical da sífilis: dados de seis unidades federativas no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, v. 41, n. 1, p. e44, June 2017.

SATO, N. S. *et al.* Analysis of *Treponema pallidum* recombinant antigens for diagnosis of syphilis by western blotting technique. **Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 115–118, Mar./Apr. 1999.

SATO, N. S. *et al.* Recombinant antigen-based immuno-slot blot method for serodiagnosis of syphilis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 7, p. 949–955, July 2004.

SCHMIDT, B. L. Evaluation of a new particle gel immunoassay for determination of antibodies against *Treponema pallidum*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 6, p. 2833–2835, June 2004.

SCHULTZ, D. R. Antiphospholipid antibodies: basic immunology and assays. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, New York, v. 26, n. 5, p. 724-739, Apr. 1997.

SILVA, M. Z. O. **Padronização de um ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando uma proteína multiepítipo recombinante para produção de um kit para diagnóstico da hepatite C**. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação e Pesquisa em Ciências Ambientais e Saúde, Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2007.

SEÑA, A. C.; WHITE, B. L.; SPARLING, P. F. Novel *Treponema pallidum* serologic tests: a paradigm shift in syphilis screening for the 21st century. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 51, n. 6, p. 700–708, Sep. 2010.

SINGH, A. E.; ROMANOWSKI, B. Syphilis: review with emphasis on clinical, epidemiologic, and some biologic features. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 2, p. 187–209, Apr. 1999.

- SMITH, B. C. *et al.* New proteins for a new perspective on syphilis diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 51, n. 1, p. 105–111, Jan. 2013.
- SONG, E. Y. *et al.* Measurement of vasoactive intestinal peptide using a competitive fluorescent microsphere immunoassay or ELISA in human blood samples. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 300, n. 1-2, p. 63-73, May. 2005.
- SOUZA, E. M. DE. Há 100 anos, a descoberta do *Treponema pallidum*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 5, p. 547–548, Set./Out. 2005.
- SOUZA, J. G. DE. The social impact of syphilis: some related historical events. **Medicina Interna**, Porto, v. 3, n. 3, 1996.
- STAMM, L. V. Syphilis: antibiotic treatment and resistance. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 143, n. 8, p. 1567–1574, June 2015.
- STOLTEY, J.E.; COHEN, S.E. Syphilis transmission: a review of the current evidence. **Sexual Health**, Collingwood, v. 12, n. 2, p. 103-9, Apr. 2015.
- SUN, A. H. *et al.* Sensitive and specific ELISA coated by TpN15-TpN17-TpN47 fusion protein for detection of antibodies to *Treponema pallidum*. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, Berlin, v. 47, n. 3, p. 321–326, Feb. 2009.
- TAN, M. *et al.* Screening and identification of immunoactive FlaB protein fragments of *Treponema pallidum* for the serodiagnosis of syphilis. **Pathogens and Disease**, Oxford, v. 76, n. 2, Mar. 2018.
- TIWARI, A. K. *et al.* Evaluation of a new serological test for syphilis based on chemiluminescence assay in a tertiary care hospital. **Asian Journal of Transfusion Science**, Ahmedabad, v. 9, n. 1, p. 65-69, Jan./June 2015.
- TUDOR, M. E.; AL, A. A. M.; GOSSMAN, W. G. **Syphilis. 2019**. Disponível de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534780/>. Acesso em: 20 fev. 2020.
- VOORHIS, W. C. VAN *et al.* Serodiagnosis of syphilis: antibodies to recombinant Tp0453, Tp92, and Gpd proteins are sensitive and specific indicators of infection by *Treponema pallidum*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 8, p. 3668–3674, Aug. 2003.
- WIJESOORIYA, N. S. *et al.* Global burden of maternal and congenital syphilis in 2008 and 2012: a health systems modelling study. **The Lancet Global Health**, England, v. 4, n. 8, p. e525-33, Aug. 2016.
- XIE, Y. *et al.* Diagnostic value of recombinant Tp0821 protein in serodiagnosis for syphilis. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 62, n. 4, p. 336–343, Apr. 2016.
- XU, M. *et al.* A novel ELISA using a recombinant outer membrane protein, rTp0663, as the antigen for serological diagnosis of syphilis. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 43, p. 51–57, Feb. 2016.
- YOUNG, H. *et al.* The Architect Syphilis assay for antibodies to *Treponema pallidum*: an automated screening assay with high sensitivity in primary syphilis. **Sexually Transmitted Infections**, London, v. 5, n.1, p. 19-23, Feb. 2009.
- YOUNG, H. *et al.* Novel recombinant-antigen enzyme immunoassay for serological diagnosis of syphilis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 4, p. 913–917, Apr.

1998a.

YOUNG, H. *et al.* A new recombinant antigen latex agglutination teste (syphilis fast) for the rapid serological diagnosis of syphilis. **International Journal of STD and AIDS**, London, v. 9, n. 4, p. 196-200, Apr. 1998b.

YU, X; ZENG H. Syphilitic chancre of the lips transmitted by kissing: a case report and review of the literature. **Medicine** (Baltimore), Hagerstown, v. 95, n. 14, p. e3303, Apr. 2016.

ZAJKOWSKA, J. M. Antibody-based techniques for detection of Lyme disease: a challenging issue. **Antibody Technology Journal**, London, v. 4, n. 4, p. 33–44, July 2014.

ZHANG, X. *et al.* Study of surveillance data for class B notifiable disease in China from 2005 to 2014. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 48, n. 2016, p. 7–13, July 2016.

ZHOU, P.; QIAN, Y.; LU, H.; GUAN, Z. Nonvenereal transmission of syphilis in infancy by mouth-to-mouth transfer of prechewed food. **Sexually Transmitted Diseases**, Philadelphia, v. 36, n. 4, p. 216-7, 2009.

ZHOU, L. *et al.* Development of a multiplex real-time PCR assay for the detection of *Treponema pallidum*, HCV, HIV-1 e HBV. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, Tokyo, v. 68, n. 6, p. 481–487, 2015.

ZILHÃO, C. *et al.* Sífilis Congénita. **Nascer e Crescer**, Porto, v. 13, n. 2, p. 127–132, Jan. 2004.

ZREIN, M. *et al.* Recombinant antigen-based enzyme immunoassay for screening of *Treponema pallidum* antibodies in blood bank routine. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 3, p. 525–527, Mar. 1995.

APÊNDICE A

CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação e validação do potencial diagnóstico de proteínas recombinantes para detecção de patógenos investigados pela Hemorrede do Brasil e pela triagem pré-natal do SUS

Pesquisador: FRED LUCIANO NEVES SANTOS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 67809417.0.0000.0040

Instituição Proponente: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA

Patrocinador Principal: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.209.976

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo sobre a utilização de proteínas recombinantes ou proteínas recombinantes quiméricas produzidas a partir de regiões altamente antigênicas dos patógenos cujas infecções são monitoradas pelos programas centrais do SUS, como HIV-1/2, HTLV-1/2, HCV, HBV, doença de Chagas, sífilis, rubéola, sarampo, esquistossomose, filariose, leishmaniose, dengue e leptospirose. Os pesquisadores testarão o desempenho diagnóstico de novos métodos de diagnóstico propostos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Produzir, caracterizar e avaliar o potencial diagnóstico de proteínas recombinantes (antígenos e anticorpos) em Imunoensaios para detecção de patógenos cujas infecções são monitoradas pelos programas centrais do SUS.

Objetivo Secundário:

- 1 - Estabelecer sistemas de expressão e purificação de proteínas recombinantes para detecção de patógenos cujas infecções são monitoradas pelos programas centrais do SUS;
- 2 - Caracterizar e avaliar as propriedades estruturais de proteínas recombinantes para detecção de patógenos cujas infecções são monitoradas pelos programas centrais do SUS, quanto a sua

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121

Bairro: Candeal

CEP: 40.206-710

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3176-2327

Fax: (71)3176-2285

E-mail: cep@bahia.fiocruz.br

APÊNDICE B

| AMOSTRA | RECARACTERIZAÇÃO | | | | Índice de Reatividade (IR) | | |
|--|------------------|------|---------|-----------|----------------------------|-------|------|
| | RPR | USR | FTA-ABS | SOROLOGIA | TpN17 | TpN47 | TmpA |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 38</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,30 | 0,35 | 0,32 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 39</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,35 | 0,27 | 0,46 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 40</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,37 | 0,57 | 0,30 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 41</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,14 | 0,34 | 0,33 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 42</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,23 | 0,27 | 0,28 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 43</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,20 | 0,30 | 0,26 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 44</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,27 | 0,30 | 0,35 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 45</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,30 | 0,56 | 0,50 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 46</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,43 | 0,35 | 0,39 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 47</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,43 | 0,31 | 0,33 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 48</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,31 | 0,33 | 0,29 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 49</i> | R | R | R | POS | 0,52 | 0,22 | 0,24 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 50</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,24 | 0,34 | 0,37 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 51</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,20 | 0,33 | 0,29 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 52</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,23 | 0,29 | 0,51 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 53</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,21 | 0,32 | 0,38 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 54</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,26 | 0,22 | 0,21 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 55</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,51 | 0,41 | 0,51 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 56</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,34 | 0,30 | 0,37 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 57</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,23 | 0,26 | 0,26 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 58</i> | NF | R ++ | R | POS | 0,59 | 0,43 | 0,36 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 59</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,29 | 0,21 | 0,17 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 60</i> | NR | NR | NR | NEG | 0,18 | 0,19 | 0,19 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 61</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,16 | 0,29 | 0,25 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 62</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,26 | 0,25 | 0,25 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 63</i> | NF | NF | R | POS | 0,63 | 0,21 | 0,28 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 64</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,58 | 0,43 | 0,47 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 65</i> | NF | R + | R | POS | 0,49 | 0,66 | 0,53 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 66</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,38 | 0,24 | 0,30 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 67</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,27 | 0,49 | 0,50 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 68</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,27 | 0,40 | 0,38 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 69</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,31 | 0,27 | 0,65 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 70</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,57 | 0,19 | 0,19 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 71</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,41 | 0,35 | 0,36 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 72</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,27 | 0,32 | 0,38 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 73</i> | R | R | R | POS | 0,30 | 0,30 | 0,39 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 74</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,26 | 0,20 | 0,27 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 75</i> | NF | NF | R | POS | 0,27 | 0,34 | 0,31 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 76</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,12 | 0,19 | 0,37 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 77</i> | NF | NF | R | POS | 0,20 | 0,19 | 0,27 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 78</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,55 | 0,32 | 0,28 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 79</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,45 | 0,34 | 0,30 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 80</i> | NF | NF | R | POS | 0,31 | 0,21 | 0,27 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 81</i> | R ++ | R | R | POS | 0,26 | 0,21 | 0,35 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 82</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,21 | 0,15 | 0,25 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 83</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,39 | 0,38 | 0,43 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 84</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,21 | 0,33 | 0,36 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 85</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,22 | 0,41 | 0,46 |

| | | | | | | | |
|---|----|-----|----|-----|------|------|------|
| <i>T. pallidum-negativa amostra 86</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,49 | 0,53 | 0,38 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 87</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,32 | 0,29 | 0,46 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 88</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,34 | 0,16 | 0,23 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 89</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,48 | 0,19 | 0,24 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 90</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,54 | 0,65 | 0,58 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 91</i> | NF | N R | R | POS | 0,37 | 0,28 | 0,29 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 92</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,26 | 0,48 | 0,41 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 93</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,25 | 0,45 | 0,47 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 94</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,51 | 0,30 | 0,26 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 95</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,29 | 0,52 | 0,33 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 96</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,27 | 0,30 | 0,40 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 97</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,58 | 0,46 | 0,48 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 98</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,35 | 0,67 | 0,37 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 99</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,41 | 0,28 | 0,49 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 100</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,34 | 0,32 | 0,51 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 101</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,27 | 0,34 | 0,34 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 102</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,33 | 0,25 | 0,37 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 103</i> | NF | NF | R | POS | 0,29 | 0,30 | 0,20 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 104</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,32 | 0,27 | 0,39 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 105</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,51 | 0,37 | 0,54 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 106</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,50 | 0,44 | 0,4 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 107</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,28 | 0,3 | 0,21 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 108</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,20 | 0,23 | 0,33 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 109</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,26 | 0,33 | 0,4 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 110</i> | NF | NF | R | POS | 0,32 | 0,33 | 0,27 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 111</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,46 | 0,44 | 0,42 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 112</i> | NF | NF | R | POS | 0,33 | 0,23 | 0,34 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 113</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,39 | 0,37 | 0,38 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 114</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,36 | 0,31 | 0,53 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 115</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,22 | 0,19 | 0,4 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 116</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,24 | 0,27 | 0,22 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 117</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,31 | 0,65 | 0,7 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 118</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,23 | 0,29 | 0,37 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 119</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,70 | 0,35 | 0,69 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 120</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,22 | 0,24 | 0,44 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 121</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,37 | 0,48 | 0,71 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 122</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,33 | 0,42 | 0,55 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 123</i> | NF | NF | R | POS | 0,30 | 0,44 | 0,49 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 124</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,25 | 0,2 | 0,42 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 125</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,22 | 0,3 | 0,45 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 126</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,31 | 0,3 | 0,48 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 127</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,23 | 0,21 | 0,34 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 128</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,26 | 0,36 | 0,51 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 129</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,34 | 0,44 | 0,53 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 130</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,37 | 0,42 | 0,48 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 131</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,29 | 0,37 | 0,46 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 132</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,26 | 0,36 | 0,49 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 133</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,28 | 0,27 | 0,67 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 134</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,37 | 0,29 | 0,56 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 135</i> | NF | N R | R | POS | 0,36 | 0,25 | 0,53 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 136</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,30 | 0,35 | 0,57 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 137</i> | NF | N R | R | POS | 0,22 | 0,2 | 0,48 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 138</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,25 | 0,58 | 0,56 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 139</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,13 | 0,38 | 0,43 |

| | | | | | | | |
|---|----|----|----|-----|------|------|------|
| <i>T. pallidum-negativa amostra 140</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,15 | 0,45 | 0,63 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 141</i> | R | R | R | POS | 0,24 | 0,52 | 0,74 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 142</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,11 | 0,62 | 0,5 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 143</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,17 | 0,34 | 0,43 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 144</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,09 | 0,38 | 0,39 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 145</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,25 | 0,41 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 146</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,22 | 0,44 | 0,54 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 147</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,14 | 0,5 | 0,38 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 148</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,14 | 0,53 | 0,34 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 149</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,11 | 0,41 | 0,26 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 150</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,15 | 0,36 | 0,44 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 151</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,74 | 0,44 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 152</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,13 | 0,55 | 0,61 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 153</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,61 | 0,42 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 154</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,05 | 0,42 | 0,31 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 155</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,22 | 0,21 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 156</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,43 | 0,34 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 157</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,85 | 0,42 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 158</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,35 | 0,38 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 159</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,47 | 0,37 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 160</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,12 | 0,63 | 0,55 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 161</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,47 | 0,27 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 162</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,49 | 0,3 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 163</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,14 | 0,1 | 0,54 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 164</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,09 | 0,61 | 0,39 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 165</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,62 | 0,64 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 166</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,35 | 0,23 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 167</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,09 | 0,76 | 0,57 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 168</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,11 | 0,61 | 0,61 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 169</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,63 | 0,38 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 170</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,46 | 0,24 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 171</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,09 | 0,54 | 0,38 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 172</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,10 | 0,63 | 0,43 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 173</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,46 | 0,49 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 174</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,53 | 0,45 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 175</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,53 | 0,36 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 176</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,18 | 1,04 | 0,81 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 177</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,05 | 0,31 | 0,28 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 178</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,43 | 0,33 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 179</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,48 | 0,33 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 180</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,67 | 0,4 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 181</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,10 | 0,43 | 0,6 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 182</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,78 | 0,53 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 183</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,10 | 0,69 | 0,59 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 184</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,69 | 0,51 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 185</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,59 | 0,38 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 186</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,62 | 0,33 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 187</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,42 | 0,45 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 188</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,43 | 0,26 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 189</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,09 | 0,41 | 0,38 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 190</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,37 | 0,36 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 191</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,09 | 0,29 | 0,27 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 192</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,37 | 0,47 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 193</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,09 | 0,5 | 0,4 |

| | | | | | | | |
|---|----|----|----|-----|------|------|------|
| <i>T. pallidum-negativa amostra 194</i> | NR | NR | NR | NEG | 0,06 | 0,32 | 0,22 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 195</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,22 | 0,33 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 196</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,05 | 0,2 | 0,19 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 197</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,27 | 0,3 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 198</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,59 | 0,37 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 199</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,53 | 0,38 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 200</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,27 | 0,46 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 201</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,29 | 0,33 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 202</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,11 | 0,48 | 0,7 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 203</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,39 | 0,32 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 204</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,12 | 0,51 | 0,56 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 205</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,42 | 0,32 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 206</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,09 | 0,69 | 0,72 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 207</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,05 | 0,3 | 0,43 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 208</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,12 | 0,47 | 0,51 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 209</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,13 | 0,61 | 0,44 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 210</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,11 | 0,39 | 0,36 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 211</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,09 | 0,44 | 0,48 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 212</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,41 | 0,35 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 213</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,32 | 0,47 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 214</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,37 | 0,59 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 215</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,09 | 0,61 | 0,43 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 216</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,56 | 0,44 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 217</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,4 | 0,41 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 218</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,44 | 0,41 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 219</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,10 | 0,46 | 0,45 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 220</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,27 | 0,29 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 221</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,09 | 0,52 | 0,38 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 222</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,05 | 0,33 | 0,29 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 223</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,44 | 0,33 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 224</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,57 | 0,45 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 225</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,09 | 0,46 | 0,52 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 226</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,68 | 0,3 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 227</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,09 | 0,47 | 0,67 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 228</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,35 | 0,29 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 229</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,6 | 0,47 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 230</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,3 | 0,32 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 231</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,71 | 0,34 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 232</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,39 | 0,49 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 233</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,47 | 0,33 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 234</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,05 | 0,4 | 0,34 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 235</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,61 | 0,55 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 236</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,64 | 0,63 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 237</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,05 | 0,47 | 0,32 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 238</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,45 | 0,25 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 239</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,29 | 0,16 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 240</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,35 | 0,22 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 241</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,41 | 0,41 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 242</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,49 | 0,38 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 243</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,58 | 0,55 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 244</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,12 | 0,45 | 0,63 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 245</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,11 | 0,4 | 0,97 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 246</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,10 | 0,49 | 0,74 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 247</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,39 | 0,37 |

| | | | | | | | |
|---|----|----|----|-----|------|------|------|
| <i>T. pallidum-negativa amostra 248</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,72 | 0,37 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 249</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,46 | 0,43 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 250</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,52 | 0,45 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 251</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,05 | 0,32 | 0,31 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 252</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,11 | 0,53 | 0,52 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 253</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,42 | 0,52 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 254</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,2 | 0,31 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 255</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,09 | 0,35 | 0,61 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 256</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,62 | 0,3 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 257</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,03 | 0,14 | 0,15 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 258</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,38 | 0,44 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 259</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,10 | 0,19 | 0,3 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 260</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,3 | 0,37 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 261</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,2 | 0,39 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 262</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,10 | 0,56 | 0,57 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 263</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,09 | 0,33 | 0,47 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 264</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,12 | 0,33 | 0,44 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 265</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,11 | 0,52 | 0,38 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 266</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,01 | 0,43 | 0,44 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 267</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,31 | 0,41 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 268</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,10 | 0,33 | 0,5 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 269</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,37 | 0,59 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 270</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,33 | 0,55 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 271</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,05 | 0,22 | 0,36 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 272</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,41 | 0,4 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 273</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,05 | 0,35 | 0,3 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 274</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,03 | 0,34 | 0,33 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 275</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,43 | 0,46 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 276</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,05 | 0,31 | 0,48 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 277</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,25 | 0,89 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 278</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,03 | 0,18 | 0,28 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 279</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,42 | 0,59 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 280</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,34 | 0,51 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 281</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,4 | 0,58 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 282</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,05 | 0,22 | 0,27 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 283</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,41 | 0,59 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 284</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,42 | 0,34 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 285</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,52 | 0,45 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 286</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,36 | 0,32 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 287</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,05 | 0,23 | 0,56 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 288</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,42 | 0,41 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 289</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,3 | 0,35 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 290</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,45 | 0,43 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 291</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,77 | 0,39 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 292</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,46 | 0,46 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 293</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,05 | 0,18 | 0,2 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 294</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,09 | 0,36 | 0,7 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 295</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,03 | 0,17 | 0,45 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 296</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,41 | 0,67 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 297</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,04 | 0,41 | 0,38 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 298</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,66 | 0,48 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 299</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,19 | 0,38 | 0,33 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 300</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,05 | 0,29 | 0,36 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 301</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,43 | 0,64 |

| | | | | | | | |
|---|------|-------|----|-----|------|------|------|
| <i>T. pallidum-negativa amostra 302</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,29 | 0,3 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 303</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,07 | 0,31 | 0,26 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 304</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,11 | 0,49 | 0,4 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 305</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,05 | 0,32 | 0,26 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 306</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,06 | 0,49 | 0,51 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 307</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,10 | 0,31 | 0,47 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 308</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,16 | 0,57 | 0,54 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 309</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,13 | 0,46 | 0,44 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 310</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,10 | 0,36 | 0,44 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 311</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,16 | 0,52 | 0,42 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 312</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,10 | 0,45 | 0,36 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 313</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,19 | 0,5 | 0,48 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 314</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,11 | 0,45 | 0,37 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 315</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,15 | 0,59 | 0,46 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 316</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,12 | 0,38 | 0,39 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 317</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,15 | 0,53 | 0,58 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 318</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,16 | 0,41 | 0,42 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 319</i> | NR | NR | NR | NEG | 0,11 | 0,52 | 0,49 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 320</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,08 | 0,34 | 0,52 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 321</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,10 | 0,32 | 0,31 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 322</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,10 | 0,36 | 0,26 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 323</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,09 | 0,32 | 0,42 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 324</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,16 | 0,46 | 0,78 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 325</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,09 | 0,33 | 0,27 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 326</i> | NF | NR | R | POS | 0,17 | 0,5 | 0,44 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 327</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,12 | 0,54 | 0,78 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 328</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,13 | 0,39 | 0,6 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 329</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,14 | 0,39 | 0,64 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 330</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,15 | 0,48 | 0,58 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 331</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,09 | 0,29 | 0,31 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 332</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,25 | 0,78 | 0,85 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 333</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,12 | 0,28 | 0,5 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 334</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,18 | 0,45 | 0,57 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 335</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,15 | 0,72 | 0,44 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 336</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,10 | 0,23 | 0,29 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 337</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,17 | 0,34 | 0,51 |
| <i>T. pallidum-negativa amostra 338</i> | NF | NF | R | POS | 0,23 | 0,85 | 0,3 |
| | R | | | | | | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 100</i> | +++ | R | NF | POS | 1,67 | 1,62 | 2,32 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 101</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,30 | 0,75 | 0,92 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 102</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,32 | 0,74 | 0,96 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 103</i> | NF | R +++ | R | POS | 1,36 | 1,44 | 1,15 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 104</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,63 | 1,1 | 1,3 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 105</i> | NF | NF | R | POS | 2,20 | 1,41 | 1,85 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 106</i> | R | R | R | POS | 0,57 | 0,79 | 0,99 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 107</i> | R | R | R | POS | 0,94 | 1,76 | 2,39 |
| | R | | | | | | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 108</i> | +++ | R | NF | POS | 2,02 | 3,7 | 4,06 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 109</i> | R ++ | R | R | POS | 1,58 | 0,72 | 2,5 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 110</i> | R | R | R | POS | 0,75 | 0,88 | 1,47 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 111</i> | R | R | R | POS | 0,42 | 4,27 | 5,88 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 112</i> | R ++ | R | R | POS | 2,29 | 0,95 | 2,39 |
| | R | | | | | | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 113</i> | +++ | R | NF | POS | 2,73 | 1,78 | 2,07 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 114</i> | R | R | R | POS | 1,13 | 0,89 | 1,07 |

| | | | | | | | |
|---|------|-----|----|-----|------|------|------|
| <i>T. pallidum-positiva amostra 115</i> | R | R | NF | POS | 1,45 | 1,24 | 1,88 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 116</i> | R ++ | R | R | POS | 3,56 | 0,75 | 1,92 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 117</i> | R | | | | | | |
| | +++ | R | R | POS | 1,11 | 0,8 | 2,88 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 118</i> | R | | | | | | |
| | +++ | R | NF | POS | 3,23 | 3,44 | 4,09 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 119</i> | R | | | | | | |
| | +++ | R | R | POS | 1,45 | 0,4 | 1,02 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 120</i> | R | | | | | | |
| | +++ | R | NF | POS | 3,82 | 4,62 | 6,51 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 121</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,26 | 0,42 | 0,28 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 122</i> | R | | | | | | |
| | +++ | R | NF | POS | 3,49 | 1,72 | 2,42 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 123</i> | R | R | R | POS | 0,43 | 0,31 | 0,68 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 124</i> | R ++ | R | R | POS | 0,64 | 1,13 | 1,29 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 125</i> | NF | NF | R | POS | 1,18 | 1,21 | 1,5 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 126</i> | R | | | | | | |
| | +++ | R | NF | POS | 1,62 | 2,92 | 4,36 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 127</i> | R ++ | R | NF | POS | 4,68 | 5,92 | 6,83 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 128</i> | R ++ | R | R | POS | 1,44 | 0,76 | 1,38 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 129</i> | R | | | | | | |
| | +++ | R | R | POS | 0,74 | 4,7 | 5,43 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 130</i> | R ++ | R | NF | POS | 3,95 | 5,13 | 5,71 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 131</i> | R ++ | R | NF | POS | 4,16 | 1,64 | 2,48 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 132</i> | R | | | | | | |
| | +++ | R | NF | POS | 4,41 | 1,64 | 2,02 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 133</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,52 | 0,46 | 0,43 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 134</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,24 | 0,44 | 0,49 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 135</i> | R | | | | | | |
| | +++ | R | NF | POS | 1,60 | 1,82 | 2,03 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 136</i> | R | R | NF | POS | 1,67 | 2,23 | 2,88 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 137</i> | R ++ | R | R | POS | 1,69 | 0,79 | 1,34 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 138</i> | R ++ | R | NF | POS | 3,51 | 1,49 | 2,84 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 139</i> | R | | | | | | |
| | +++ | R | NF | POS | 1,69 | 3,94 | 5,47 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 140</i> | R | | | | | | |
| | +++ | R | NF | POS | 2,79 | 2,23 | 3,8 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 141</i> | R ++ | R | NF | POS | 1,45 | 3,16 | 4,7 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 142</i> | R | R | NF | POS | 2,49 | 1,57 | 5,12 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 143</i> | NF | N R | R | POS | 0,86 | 1,74 | 1,37 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 144</i> | R | | | | | | |
| | +++ | R | NF | POS | 2,22 | 2,9 | 5,11 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 145</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,30 | 0,41 | 0,42 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 146</i> | R | R | R | POS | 1,51 | 0,7 | 1,01 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 147</i> | R | R | NF | POS | 0,55 | 0,38 | 0,4 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 148</i> | R | | | | | | |
| | +++ | R | NF | POS | 2,71 | 1,59 | 1,95 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 149</i> | R | R | NF | POS | 1,57 | 1,23 | 2 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 150</i> | R | R | NF | POS | 1,66 | 1,31 | 2,28 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 151</i> | R | R | NF | POS | 2,81 | 1,53 | 2,71 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 152</i> | R | R | R | POS | 1,13 | 0,72 | 1,49 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 153</i> | R | R | NF | POS | 2,73 | 3,93 | 4,52 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 154</i> | R | | | | | | |
| | +++ | R | NF | POS | 2,58 | 1,31 | 1,87 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 155</i> | R | | | | | | |
| | +++ | R | NF | POS | 2,93 | 4,85 | 6,72 |

| | | | | | | | | |
|---|------|---------|----|-----|------|------|------|--|
| | R | | | | | | | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 156</i> | +++ | R | NF | POS | 3,13 | 3,12 | 5,58 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 157</i> | R ++ | R | NF | POS | 2,16 | 2,02 | 4,31 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 158</i> | R | R | R | POS | 2,26 | 3,19 | 4,26 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 159</i> | R | R | NF | POS | 1,79 | 1,61 | 3,09 | |
| | R | | | | | | | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 160</i> | +++ | R | NF | POS | 1,52 | 3,91 | 5,3 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 161</i> | +++ | R | NF | POS | 1,53 | 3,2 | 5,48 | |
| | R | | | | | | | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 162</i> | +++ | R | NF | POS | 1,79 | 2,7 | 7,19 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 163</i> | R | R | R | POS | 1,36 | 0,91 | 1,99 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 164</i> | R ++ | R | NF | POS | 1,74 | 1,6 | 3,75 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 165</i> | R ++ | R | NF | POS | 1,55 | 3,42 | 6,41 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 166</i> | R | R | NF | POS | 1,23 | 1,3 | 1,71 | |
| | R | | | | | | | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 167</i> | +++ | R | NF | POS | 1,66 | 3,81 | 5,29 | |
| | R | | | | | | | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 168</i> | +++ | R | NF | POS | 1,73 | 2,76 | 5,36 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 169</i> | R ++ | R | NF | POS | 1,85 | 4,38 | 6,32 | |
| | R | | | | | | | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 170</i> | +++ | R | NF | POS | 1,92 | 3,45 | 3,25 | |
| | R | | | | | | | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 171</i> | +++ | R | NF | POS | 1,60 | 3,28 | 4,55 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 172</i> | R ++ | R | NF | POS | 1,79 | 1,58 | 3,71 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 173</i> | R | R FRACO | R | POS | 2,30 | 1,08 | 2,37 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 31</i> | NF | NF | NF | POS | 3,43 | 1,71 | 2,3 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 32</i> | NF | NF | R | POS | 0,44 | 0,18 | 0,44 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 33</i> | NF | NF | R | POS | 0,99 | 0,14 | 0,57 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 34</i> | NF | N R | R | POS | 0,79 | 0,45 | 1,39 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 35</i> | NF | NF | R | POS | 1,14 | 0,29 | 0,82 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 36</i> | NF | R +++ | NF | POS | 3,54 | 3,16 | 5,53 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 37</i> | NF | N R | R | POS | 0,56 | 0,42 | 0,83 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 38</i> | NF | | NF | POS | 3,14 | 1,27 | 4,35 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 39</i> | R | R | R | POS | 0,86 | 0,91 | 0,86 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 40</i> | NF | NF | R | POS | 0,63 | 0,59 | 0,75 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 41</i> | NF | NF | R | POS | 0,44 | 0,33 | 0,51 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 42</i> | NF | NF | R | POS | 1,28 | 0,32 | 0,42 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 43</i> | NF | NF | R | POS | 0,63 | 0,66 | 0,88 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 44</i> | NF | NF | R | POS | 0,23 | 0,74 | 0,46 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 45</i> | NF | R +++ | NF | POS | 1,05 | 0,51 | 0,83 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 46</i> | NF | N R | R | POS | 0,38 | 0,25 | 0,45 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 47</i> | R ++ | R | R | POS | 1,13 | 0,67 | 1,14 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 48</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,33 | 0,27 | 0,5 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 49</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,59 | 0,29 | 1,11 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 50</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,37 | 0,23 | 0,57 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 51</i> | NF | R +++ | NF | POS | 2,03 | 1,26 | 1,46 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 52</i> | NF | NF | NF | POS | 2,96 | 1,95 | 2,92 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 53</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,27 | 0,17 | 0,39 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 54</i> | NF | NF | R | POS | 0,83 | 0,49 | 0,76 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 55</i> | NF | R +++ | R | POS | 3,70 | 0,86 | 4,54 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 56</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,22 | 0,23 | 0,33 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 57</i> | NF | R +++ | R | POS | 2,48 | 0,66 | 2,02 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 58</i> | R | R | R | POS | 1,36 | 0,49 | 1,67 | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 59</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,20 | 0,33 | 0,69 | |

| | | | | | | | |
|--|------|-------|----|-----|------|------|------|
| <i>T. pallidum-positiva amostra 60</i> | NF | R +++ | R | POS | 0,79 | 0,49 | 0,67 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 61</i> | NF | NF | R | POS | 1,84 | 0,24 | 1,66 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 62</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,29 | 0,21 | 0,37 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 63</i> | NF | N R | R | POS | 0,86 | 0,6 | 0,89 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 64</i> | NF | NF | R | POS | 1,05 | 0,99 | 1,49 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 65</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,23 | 0,1 | 0,3 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 66</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,36 | 0,31 | 0,38 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 67</i> | R ++ | R | NF | POS | 1,18 | 0,19 | 1,46 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 68</i> | NF | R +++ | NF | POS | 1,90 | 0,92 | 1,33 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 69</i> | NF | R ++ | NF | POS | 1,86 | 1,91 | 1,21 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 70</i> | NR | NR | NF | NEG | 0,17 | 0,2 | 0,3 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 71</i> | NF | NF | R | POS | 0,40 | 0,17 | 0,36 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 72</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,49 | 0,25 | 0,64 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 73</i> | NF | NR | NF | NEG | 0,31 | 0,26 | 0,66 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 74</i> | R | R | NF | POS | 2,34 | 1,21 | 1,81 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 75</i> | R | R | NF | POS | 2,88 | 2,36 | 2,39 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 76</i> | R | R | NF | POS | 1,38 | 1,35 | 1,33 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 77</i> | R | R | R | POS | 1,10 | 0,56 | 0,47 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 78</i> | R | R | NF | POS | 2,64 | 2,06 | 4,73 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 79</i> | R | R | NF | POS | 2,38 | 3,13 | 3,44 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 80</i> | R | R | R | POS | 2,87 | 0,56 | 1,25 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 81</i> | R | R | R | POS | 1,44 | 0,59 | 0,85 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 82</i> | R | R | NF | POS | 2,08 | 1,12 | 1,81 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 83</i> | R | R | NF | POS | 2,26 | 2,98 | 3,52 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 84</i> | R | R | R | POS | 1,35 | 1,28 | 0,96 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 85</i> | R | R | NF | POS | 2,08 | 2,08 | 2,99 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 86</i> | R | R | R | POS | 0,94 | 0,58 | 0,44 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 87</i> | R | R | NF | POS | 2,49 | 1,14 | 1,48 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 88</i> | NF | NF | R | POS | 1,36 | 0,39 | 0,34 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 89</i> | NF | R +++ | R | POS | 1,13 | 0,46 | 0,46 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 90</i> | R | R | R | POS | 1,97 | 0,48 | 1,24 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 91</i> | R | R | NF | POS | 3,32 | 3,54 | 4,69 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 92</i> | R ++ | R | NF | POS | 1,23 | 2,57 | 1,98 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 93</i> | R | R | NF | POS | 2,14 | 1,39 | 1,43 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 94</i> | R | R | NF | POS | 1,80 | 1,21 | 1,95 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 95</i> | R | R | R | POS | 1,76 | 1,04 | 1,42 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 96</i> | R | R | R | POS | 1,24 | 0,27 | 0,94 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 97</i> | R | R | NF | POS | 3,50 | 2,71 | 3,54 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 98</i> | R | R | NF | POS | 1,68 | 1,39 | 1,12 |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 99</i> | R | | | | | | |
| <i>T. pallidum-positiva amostra 99</i> | +++ | R | NF | POS | 6,11 | 3,73 | 3,26 |
| <i>Doenças de Chagas 1</i> | NF | NF | NF | NR | 0,07 | 0,57 | 0,53 |
| <i>Doenças de Chagas 2</i> | NF | NF | NF | NR | 0,08 | 0,43 | 0,51 |
| <i>Doenças de Chagas 3</i> | NF | NF | NF | NR | 0,08 | 0,46 | 0,35 |
| <i>Doenças de Chagas 4</i> | NF | NF | NF | NR | 0,10 | 0,41 | 0,38 |
| <i>Doenças de Chagas 5</i> | NF | NF | NF | NR | 0,10 | 0,39 | 0,37 |
| <i>Doenças de Chagas 6</i> | NF | NF | NF | NR | 0,10 | 0,49 | 0,64 |
| <i>Doenças de Chagas 7</i> | NF | NF | NF | NR | 0,11 | 0,55 | 0,53 |
| <i>Doenças de Chagas 8</i> | NF | NF | NF | NR | 0,12 | 0,42 | 0,53 |
| <i>Doenças de Chagas 9</i> | NF | NF | NF | NR | 0,15 | 0,44 | 0,59 |
| <i>Doenças de Chagas 10</i> | NF | NF | NF | NR | 0,19 | 0,35 | 0,49 |
| <i>Dengue 1</i> | NF | NF | NF | NR | 0,07 | 0,39 | 0,28 |
| <i>Dengue 2</i> | NF | NF | NF | NR | 0,07 | 0,76 | 0,86 |
| <i>Dengue 3</i> | NF | NF | NF | NR | 0,09 | 0,35 | 0,51 |

| | | | | | | | |
|---------------|----|----|----|----|------|------|------|
| Dengue 4 | NF | NF | NR | NR | 0,09 | 0,39 | 1,30 |
| Dengue 5 | NF | NF | NF | NR | 0,09 | 0,38 | 0,37 |
| Dengue 6 | NF | NF | NF | NR | 0,10 | 0,35 | 0,35 |
| Dengue 7 | NF | NF | NF | NR | 0,12 | 0,59 | 0,54 |
| Dengue 8 | NF | NF | NF | NR | 0,12 | 0,53 | 0,59 |
| Dengue 9 | NF | NF | NF | NR | 0,12 | 0,39 | 0,55 |
| Dengue 10 | NF | NF | NF | NR | 0,34 | 0,22 | 0,52 |
| Hepatite B 1 | NF | NF | NF | NR | 0,06 | 0,55 | 0,45 |
| Hepatite B 2 | NF | NF | NF | NR | 0,06 | 0,55 | 0,41 |
| Hepatite B 3 | NF | NF | NF | NR | 0,06 | 0,51 | 0,27 |
| Hepatite B 4 | NF | NF | NF | NR | 0,06 | 0,41 | 0,31 |
| Hepatite B 5 | NF | NF | NF | NR | 0,06 | 0,38 | 0,35 |
| Hepatite B 6 | NF | NF | NF | NR | 0,07 | 0,41 | 0,45 |
| Hepatite B 7 | NF | NF | NF | NR | 0,07 | 0,73 | 0,32 |
| Hepatite B 8 | NF | NF | NF | NR | 0,07 | 0,41 | 0,47 |
| Hepatite B 9 | NF | NF | NF | NR | 0,07 | 0,35 | 0,36 |
| Hepatite B 10 | NF | NF | NF | NR | 0,08 | 0,63 | 0,60 |
| Hepatite B 11 | NF | NF | NF | NR | 0,09 | 0,33 | 0,30 |
| Hepatite B 12 | NF | NF | NF | NR | 0,09 | 0,43 | 0,49 |
| Hepatite B 13 | NF | NF | NF | NR | 0,09 | 0,45 | 0,35 |
| Hepatite B 14 | NF | NF | NF | NR | 0,11 | 0,60 | 0,40 |
| Hepatite B 15 | NF | NF | NF | NR | 0,12 | 0,59 | 0,48 |
| Hepatite B 16 | NF | NF | NR | NR | 0,12 | 0,79 | 0,97 |
| Hepatite B 17 | NF | NF | NF | NR | 0,12 | 0,31 | 0,22 |
| Hepatite B 18 | NF | NF | NF | NR | 0,13 | 0,43 | 0,34 |
| Hepatite B 19 | NF | NF | NF | NR | 0,13 | 0,52 | 0,37 |
| Hepatite B 20 | NF | NF | NF | NR | 0,13 | 0,34 | 0,45 |
| Hepatite C 1 | NF | NF | NF | NR | 0,05 | 0,45 | 0,40 |
| Hepatite C 2 | NF | NF | NF | NR | 0,06 | 0,47 | 0,34 |
| Hepatite C 3 | NF | NF | NF | NR | 0,07 | 0,38 | 0,33 |
| Hepatite C 4 | NF | NF | NF | NR | 0,07 | 0,71 | 0,55 |
| Hepatite C 5 | NF | NF | NF | NR | 0,07 | 0,65 | 0,64 |
| Hepatite C 6 | NF | NF | NF | NR | 0,07 | 0,66 | 0,51 |
| Hepatite C 7 | NF | NF | NF | NR | 0,07 | 0,54 | 0,36 |
| Hepatite C 8 | NF | NF | NF | NR | 0,07 | 0,53 | 0,40 |
| Hepatite C 9 | NF | NF | NF | NR | 0,07 | 0,53 | 0,44 |
| Hepatite C 10 | NF | NF | NF | NR | 0,07 | 0,65 | 0,43 |
| Hepatite C 11 | NF | NF | NF | NR | 0,09 | 0,29 | 0,30 |
| Hepatite C 12 | NF | NF | NF | NR | 0,09 | 0,43 | 0,34 |
| Hepatite C 13 | NF | NF | NF | NR | 0,09 | 0,71 | 0,70 |
| Hepatite C 14 | NF | NF | NF | NR | 0,09 | 0,44 | 0,27 |
| Hepatite C 15 | NF | NF | NF | NR | 0,10 | 0,18 | 0,45 |
| Hepatite C 16 | NF | NF | NF | NR | 0,10 | 0,65 | 0,25 |
| Hepatite C 17 | NF | NF | NF | NR | 0,10 | 0,50 | 0,39 |
| Hepatite C 18 | NF | NF | NF | NR | 0,10 | 0,56 | 0,26 |
| Hepatite C 19 | NF | NF | NF | NR | 0,10 | 0,51 | 0,34 |
| Hepatite C 20 | NF | NF | NF | NR | 0,11 | 0,52 | 0,20 |
| HIV 1 | NF | NF | NR | NR | 0,04 | 1,15 | 0,61 |
| HIV 2 | NF | NF | NF | NR | 0,07 | 0,73 | 0,49 |
| HIV 3 | NF | NF | NF | NR | 0,09 | 0,63 | 0,56 |
| HIV 4 | NF | NF | NR | NR | 0,10 | 0,92 | 0,89 |
| HIV 5 | NF | NF | NF | NR | 0,10 | 0,83 | 0,66 |
| HIV 6 | NF | NF | NR | NR | 0,11 | 0,84 | 0,85 |
| HIV 7 | NF | NF | NF | NR | 0,11 | 0,64 | 0,31 |

| | | | | | | | |
|-----------------------|----|----|----|----|------|------|------|
| <i>HIV 8</i> | NF | NF | NR | NR | 0,12 | 0,99 | 0,63 |
| <i>HIV 9</i> | NF | NF | NF | NR | 0,12 | 0,58 | 0,42 |
| <i>HIV 10</i> | NF | NF | NF | NR | 0,12 | 0,45 | 0,32 |
| <i>HIV 11</i> | NF | NF | NR | NR | 0,13 | 1,03 | 0,75 |
| <i>HIV 12</i> | NF | NF | NF | NR | 0,14 | 0,54 | 0,45 |
| <i>HIV 13</i> | NF | NF | NR | NR | 0,14 | 0,88 | 0,52 |
| <i>HIV 14</i> | NF | NF | NR | NR | 0,16 | 0,83 | 0,61 |
| <i>HIV 15</i> | NF | NF | NF | NR | 0,16 | 0,78 | 0,6 |
| <i>HIV 16</i> | NF | NF | NF | NR | 0,17 | 0,6 | 0,22 |
| <i>HIV 17</i> | NF | NF | NF | NR | 0,17 | 0,68 | 0,4 |
| <i>HIV 18</i> | NF | NF | NF | NR | 0,18 | 0,72 | 0,59 |
| <i>HIV 19</i> | NF | NF | NF | NR | 0,18 | 0,61 | 0,44 |
| <i>HIV 20</i> | NF | NF | NF | NR | 0,19 | 0,78 | 0,56 |
| <i>HTLV 1</i> | NF | NF | NF | NR | 0,06 | 0,56 | 0,45 |
| <i>HTLV 2</i> | NF | NF | NF | NR | 0,10 | 0,49 | 0,38 |
| <i>HTLV 3</i> | NF | NF | NF | NR | 0,12 | 0,78 | 0,7 |
| <i>HTLV 4</i> | NF | NF | NF | NR | 0,06 | 0,79 | 0,56 |
| <i>HTLV 5</i> | NF | NF | NF | NR | 0,07 | 0,7 | 0,65 |
| <i>HTLV 6</i> | NF | NF | NF | NR | 0,07 | 0,61 | 0,31 |
| <i>HTLV 7</i> | NF | NF | NF | NR | 0,07 | 0,69 | 0,47 |
| <i>HTLV 8</i> | NF | NF | NF | NR | 0,08 | 0,57 | 0,36 |
| <i>HTLV 9</i> | NF | NF | NF | NR | 0,08 | 0,63 | 0,68 |
| <i>HTLV 10</i> | NF | NF | NF | NR | 0,09 | 0,64 | 0,62 |
| <i>HTLV 11</i> | NF | NF | NF | NR | 0,09 | 0,57 | 0,41 |
| <i>HTLV 12</i> | NF | NF | NF | NR | 0,09 | 0,73 | 0,37 |
| <i>HTLV 13</i> | NF | NF | NF | NR | 0,09 | 0,35 | 0,28 |
| <i>HTLV 14</i> | NF | NF | NF | NR | 0,10 | 0,52 | 0,34 |
| <i>HTLV 15</i> | NF | NF | NF | NR | 0,10 | 0,22 | 0,27 |
| <i>HTLV 16</i> | NF | NF | NF | NR | 0,10 | 0,62 | 0,31 |
| <i>HTLV 17</i> | NF | NF | NF | NR | 0,10 | 0,33 | 0,43 |
| <i>HTLV 18</i> | NF | NF | NF | NR | 0,12 | 0,3 | 0,27 |
| <i>HTLV 19</i> | NF | NF | NF | NR | 0,13 | 0,5 | 0,29 |
| <i>HTLV 20</i> | NF | NF | NF | NR | 0,14 | 0,48 | 0,51 |
| <i>Schisto 1</i> | NF | NF | NF | NR | 0,19 | 0,68 | 0,55 |
| <i>Schisto 2</i> | NF | NF | NF | NR | 0,21 | 0,66 | 0,73 |
| <i>Schisto 3</i> | NF | NF | NF | NR | 0,14 | 0,53 | 0,65 |
| <i>Schisto 4</i> | NF | NF | NF | NR | 0,15 | 0,48 | 0,58 |
| <i>Schisto 5</i> | NF | NF | NR | NR | 0,15 | 0,76 | 1,14 |
| <i>Schisto 6</i> | NF | NF | NF | NR | 0,12 | 0,68 | 0,56 |
| <i>Schisto 7</i> | NF | NF | NF | NR | 0,12 | 0,52 | 0,54 |
| <i>Schisto 8</i> | NF | NF | NF | NR | 0,08 | 0,43 | 0,41 |
| <i>Schisto 9</i> | NF | NF | NF | NR | 0,19 | 0,55 | 0,32 |
| <i>Schisto 10</i> | NF | NF | NF | NR | 0,22 | 0,57 | 0,59 |
| <i>Filariose 1</i> | NF | NF | NF | NR | 0,14 | 0,49 | 0,42 |
| <i>Filariose 2</i> | NF | NF | NF | NR | 0,16 | 0,56 | 0,56 |
| <i>Filariose 3</i> | NF | NF | NF | NR | 0,12 | 0,36 | 0,56 |
| <i>Filariose 4</i> | NF | NF | NF | NR | 0,23 | 0,62 | 0,47 |
| <i>Filariose 5</i> | NF | NF | NF | NR | 0,22 | 0,57 | 0,61 |
| <i>Filariose 6</i> | NF | NF | NR | NR | 0,33 | 1,75 | 1,28 |
| <i>Filariose 7</i> | NF | NF | NF | NR | 0,25 | 0,44 | 0,38 |
| <i>Filariose 8</i> | NF | NF | NF | NR | 0,05 | 0,53 | 0,37 |
| <i>Filariose 9</i> | NF | NF | NF | NR | 0,07 | 0,51 | 0,42 |
| <i>Filariose 10</i> | NF | NF | NF | NR | 0,28 | 0,61 | 0,52 |
| <i>Leptospirose 1</i> | NF | NF | NR | NR | 0,15 | 0,78 | 0,87 |

| | | | | | | | |
|-----------------|----|----|----|----|------|------|------|
| Leptospirose 2 | NF | NF | NF | NR | 0,07 | 0,7 | 0,31 |
| Leptospirose 3 | NF | NF | NR | NR | 0,19 | 0,71 | 0,86 |
| Leptospirose 4 | NF | NF | NF | NR | 0,12 | 0,57 | 0,45 |
| Leptospirose 5 | NF | NF | NR | NR | 0,55 | 1,57 | 1,65 |
| Leptospirose 6 | NF | NF | NF | NR | 0,07 | 0,37 | 0,65 |
| Leptospirose 7 | NF | NF | NF | NR | 0,16 | 0,36 | 0,58 |
| Leptospirose 8 | NF | NF | NF | NR | 0,29 | 0,59 | 0,36 |
| Leptospirose 9 | NF | NF | NF | NR | 0,32 | 0,56 | 0,46 |
| Leptospirose 10 | NF | NF | NF | NR | 0,15 | 0,65 | 0,42 |
| Leptospirose 11 | NF | NF | NF | NR | 0,08 | 0,51 | 0,39 |
| Leptospirose 12 | NF | NF | NF | NR | 0,04 | 0,33 | 0,27 |
| Leptospirose 13 | NF | NF | NF | NR | 0,11 | 0,71 | 0,69 |
| Leptospirose 14 | NF | NF | NF | NR | 0,06 | 0,31 | 0,79 |
| Leptospirose 15 | NF | NF | NR | NR | 0,37 | 1,11 | 1,3 |
| Leptospirose 16 | NF | NF | NF | NR | 0,16 | 0,65 | 0,5 |
| Leptospirose 17 | NF | NF | NR | NR | 0,61 | 1,94 | 2,25 |
| Leptospirose 18 | NF | NF | NR | NR | 0,24 | 0,88 | 1,02 |
| Leptospirose 19 | NF | NF | NR | NR | 0,17 | 1,03 | 1,01 |
| Leptospirose 20 | NF | NF | NF | NR | 0,06 | 0,37 | 0,31 |
| Leptospirose 21 | NF | NF | NF | NR | 0,23 | 0,46 | 0,57 |
| Leptospirose 22 | NF | NF | NF | NR | 0,11 | 0,58 | 0,69 |
| Leptospirose 23 | NF | NF | NF | NR | 0,14 | 0,73 | 0,53 |
| Leptospirose 24 | NF | NF | NF | NR | 0,16 | 0,72 | 0,74 |
| Leptospirose 25 | NF | NF | NR | NR | 0,33 | 0,78 | 1 |
| Leptospirose 26 | NF | NF | NF | NR | 0,12 | 0,25 | 0,33 |
| Leptospirose 27 | NF | NF | NF | NR | 0,15 | 0,42 | 0,5 |
| Leptospirose 28 | NF | NF | NR | NR | 0,23 | 0,71 | 0,82 |
| Leptospirose 29 | NF | NF | NR | NR | 0,20 | 0,87 | 0,81 |
| Leptospirose 30 | NF | NF | NR | NR | 0,34 | 0,79 | 0,97 |
| Leptospirose 31 | NF | NF | NF | NR | 0,18 | 0,7 | 0,63 |
| Leptospirose 32 | NF | NF | NR | NR | 0,42 | 1,68 | 1,78 |
| Leptospirose 33 | NF | NF | NR | NR | 0,54 | 2,19 | 2,6 |
| Leptospirose 34 | NF | NF | NR | NR | 0,53 | 1,72 | 1,9 |
| Leptospirose 35 | NF | NF | NR | NR | 0,36 | 1,4 | 1,34 |
| Leptospirose 36 | NF | NF | NR | NR | 0,68 | 1,87 | 2,26 |
| Leptospirose 37 | NR | NR | NR | RC | 1,93 | 6,11 | 6,58 |
| Leptospirose 38 | NF | NF | NR | NR | 0,29 | 1,49 | 1,16 |
| Leptospirose 39 | NF | NF | NR | NR | 0,76 | 2,59 | 2,39 |
| Leptospirose 40 | NF | NF | NR | NR | 0,30 | 1,47 | 1,22 |
| Leptospirose 41 | NF | NF | NR | NR | 0,28 | 1,18 | 0,97 |
| Leptospirose 42 | NF | NF | NF | NR | 0,20 | 0,76 | 0,8 |
| Leptospirose 43 | NF | NF | NF | NR | 2,20 | 0,57 | 0,04 |
| Leptospirose 44 | NF | NF | NR | NR | 0,16 | 0,77 | 0,03 |
| Leptospirose 45 | NF | NF | NR | NR | 0,22 | 1,23 | 0,02 |
| Leptospirose 46 | NF | NF | NR | NR | 0,45 | 2,18 | 0,06 |
| Leptospirose 47 | NF | NF | NR | NR | 0,42 | 1,84 | 0,12 |
| Leptospirose 48 | NF | NF | NF | NR | 0,47 | 1,76 | 0,02 |
| Leptospirose 49 | NF | NF | NR | NR | 0,22 | 0,79 | 0,02 |
| Leptospirose 50 | NF | NF | NR | NR | 0,21 | 0,64 | 0,01 |
| Leptospirose 51 | NF | NF | NF | NR | 0,48 | 1,17 | 0,03 |
| Leptospirose 52 | NF | NF | NR | NR | 0,06 | 0,57 | 0,01 |
| Leptospirose 53 | NF | NF | NR | NR | 0,34 | 1,22 | 0,02 |
| Leptospirose 54 | NF | NF | NF | NR | 0,49 | 2,12 | 0,01 |
| Leptospirose 55 | NF | NF | NR | NR | 0,08 | 0,65 | 0,02 |

| | | | | | | | |
|------------------------|----|----|----|----|------|------|------|
| <i>Leptospirose 56</i> | NF | NR | NF | RC | 0,24 | 1,28 | 0,01 |
| <i>Leptospirose 57</i> | NF | NF | NF | NR | 1,92 | 1,08 | 0,01 |
| <i>Leptospirose 58</i> | NF | NF | NR | NR | 0,10 | 0,59 | 0,02 |
| <i>Leptospirose 59</i> | NF | NF | NR | NR | 0,23 | 0,8 | 0,02 |
| <i>Leptospirose 60</i> | NF | NF | NR | NR | 0,39 | 0,98 | 0,02 |
| <i>Leptospirose 61</i> | NF | NF | NR | NR | 0,56 | 0,92 | 0,02 |
| <i>Leptospirose 62</i> | NF | NF | NR | NR | 0,35 | 1,21 | 0,02 |
| <i>Leptospirose 63</i> | NF | NF | NF | NR | 0,27 | 1,03 | 0,01 |
| <i>Leptospirose 64</i> | NR | NR | NR | RC | 0,11 | 0,61 | 0,01 |
| <i>Leptospirose 65</i> | NF | NF | NR | NR | 1,87 | 3,85 | 0,03 |
| <i>Leptospirose 66</i> | NF | NF | NF | NR | 0,74 | 1,57 | 0,01 |
| <i>Leptospirose 67</i> | NF | NF | NR | NR | 0,31 | 0,63 | 0,01 |
| <i>Leptospirose 68</i> | NF | NF | NR | RC | 0,64 | 1,3 | 0,01 |
| <i>Leptospirose 69</i> | NF | NF | NR | NR | 2,69 | 2,51 | 0,01 |
| <i>Leptospirose 70</i> | NF | NR | NF | RC | 0,45 | 0,96 | 0,01 |
| <i>Leptospirose 71</i> | NF | NF | NF | NR | 1,23 | 2,52 | 0,01 |
| <i>Leptospirose 72</i> | NF | NF | NR | NR | 0,31 | 0,77 | 0,01 |
| <i>Leptospirose 73</i> | NF | NF | NR | NR | 0,43 | 1,04 | 0,01 |
| <i>Leptospirose 74</i> | NF | NF | NF | NR | 0,35 | 0,88 | 0,01 |
| <i>Leptospirose 75</i> | NF | NF | NR | NR | 0,32 | 0,48 | 0,01 |
| <i>Leptospirose 76</i> | NF | NF | NF | NR | 0,38 | 0,67 | 0,01 |
| <i>Leptospirose 77</i> | NF | NF | NF | NR | 0,54 | 0,73 | 0,02 |
| <i>Leptospirose 78</i> | NF | NF | NF | NR | 0,31 | 0,48 | 0,02 |
| <i>Leptospirose 79</i> | NF | NF | NF | NR | 0,08 | 0,34 | 0,73 |
| <i>Leptospirose 80</i> | NF | NF | NF | NR | 0,12 | 0,48 | 0,01 |
| <i>Leptospirose 81</i> | NF | NF | NR | RC | 1,88 | 2,23 | 0,01 |
| <i>Leishmaniose 1</i> | NF | NF | NF | NR | 0,06 | 0,23 | 0,02 |
| <i>Leishmaniose 2</i> | NF | NF | NF | NR | 0,04 | 0,33 | 0,04 |
| <i>Leishmaniose 3</i> | NF | NF | NR | NR | 0,16 | 0,75 | 0,02 |
| <i>Leishmaniose 4</i> | NF | NF | NF | NR | 0,08 | 0,58 | 0,01 |
| <i>Leishmaniose 5</i> | NF | NF | NR | NR | 0,15 | 0,85 | 0,01 |
| <i>Leishmaniose 6</i> | NF | NF | NF | NR | 0,10 | 0,27 | 0,04 |
| <i>Leishmaniose 7</i> | NF | NF | NF | NR | 0,07 | 0,31 | 0,01 |
| <i>Leishmaniose 8</i> | NF | NF | NF | NR | 0,11 | 0,42 | 0,01 |
| <i>Leishmaniose 9</i> | NF | NF | NF | NR | 0,09 | 0,22 | 0,01 |

Legenda: (R) Reagente, (NR) Não Reagente, (NF) Não Fez, (RC) Reação Cruzada, (POS) Positivo, (NEG) Negativo.

APÊNDICE C

Quadro 4: Parâmetros de desempenho diagnóstico de proteínas recombinantes usadas no diagnóstico laboratorial da sífilis.





| Proteínas recombinantes | Metodologia | SEN (%) / ESP (%) | Referência |
|-------------------------|--------------|---|------------------------------------|
| Tp0868 | ELISA | 95,4 / 98,9 | (JIANG <i>et al.</i> , 2016) |
| Tp0792 | | 92,6 / 95,8 | |
| Tp0870 | | 95,1 / 95,8 | |
| Tp0463 | | 39,2 / 93,7 | |
| Tp0751 | | 92,6 / 97,9 | |
| Tp1038 | | 95,9 / 98,9 | |
| rTp0663 | ELISA | 98,83 / 100 | (XU <i>et al.</i> , 2016) |
| Tp0155 | ELISA | 28-42 / ND | (VOORHIS <i>et al.</i> , 2003) |
| Tp0483 | | | |
| Tp0751 | | | |
| Tp92 (Tp0326) | | | |
| Gpd (Tp0257) | LIA | 98 / 97 | (IJSELUIDEN <i>et al.</i> , 1989b) |
| TmpA | | 91 / 93 | |
| | ELLIFA | 97 / 98 | |
| | ELISA | 93,3 (SP), 100 (SS), 100 (SL), 100 (SC) / 100 | (JIANG <i>et al.</i> , 2013) |
| TpF1 | Western blot | 100 / 100 | |
| Tp0326 | ELISA | 86 / 99 | (SMITH <i>et al.</i> , 2013) |
| Tp0453 | | 98 / 100 | |
| Tp0453-Tp0326 | | 98 / 99 | |
| B1N | ELISA | 94,4 / 78,4 | (TAN <i>et al.</i> , 2018) |
| B1M | | 92,7 / 96,1 | |
| B1C | | 92,2 / 71,2 | |
| B2N | | 95 / 75,2 | |
| B2M | | 91,6 / 94,8 | |
| B2C | | 93,9 / 64,1 | |
| B3N | | 94,4 / 73,2 | |
| B3M | | 95 / 100 | |
| B3C | | 91,1 / 74,5 | |
| Tp0821 | ELISA | 91 / 94,3 (IgM) 98,3 / 100 (IgG) | (XIE <i>et al.</i> , 2016) |
| rTp0663 | ELISA | 98,83 / 100 | (XU <i>et al.</i> , 2016) |

Fonte: O autor.

Legenda: QML (quimiluminescência); ELLIFA (*enzyme-linked line immunofiltration assay*); LIA (*line immunoassay*); EIC (ensaio imunocromatográfico); Sen (Sensibilidade); Esp (Especificidade); SP (sífilis primária); SS (sífilis secundária); SLP (sífilis latente primária).

RESEARCH ARTICLE

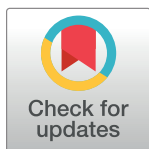
Performance of *Treponema pallidum* recombinant proteins in the serological diagnosis of syphilis

Ângelo Antônio Oliveira Silva¹ , Ueriton Dias de Oliveira² , Larissa de Carvalho Medrado Vasconcelos¹, Leonardo Foti³, Leonardo Maia Leony¹, Ramona Tavares Daltro¹, Amanda Leitolis² , Fernanda Washington de Mendonça Lima⁴, Marco Aurélio Krieger^{3,5}, Nilson Ivo Tonin Zanchin³, Fred Luciano Neves Santos¹ *

1 Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz-BA), Salvador, Bahia, Brazil, **2** Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil, **3** Carlos Chagas Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz-PR), Curitiba, Paraná, Brazil, **4** Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil, **5** Molecular Biology Institute of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

 These authors contributed equally to this work.

* fred.santos@fiocruz.br



Abstract

Syphilis serodiagnosis is challenging because distinct clinical forms of the infection may influence serological performance and discordant results between tests make clinical decisions difficult. Several recombinant *Treponema pallidum*-proteins have already been tested for syphilis diagnosis and they are critical to achieve high accuracy in serological testing. Our aim was to assess the varied performance of *T. pallidum*-recombinant proteins TmpA, TpN17 and TpN47 for syphilis serodiagnosis. The proteins were evaluated using sera of 338 *T. pallidum*-negative, 173 *T. pallidum*-positive individuals and 209 sera from individuals infected with unrelated diseases. The diagnostic potential was validated by analysis of ROC curves. In the liquid microarray analyses, the ROC curve varied from 99.0% for TmpA and TpN17 to 100% for TpN47. The sensitivity score yielded values of up to 90% for TpN17, 100% for TpN47 and 80.0% for TmpA. The lowest and highest specificity values were presented by TpN47 (91.9%) and TmpA antigens (100%), respectively. TpN47 showed the highest accuracy score (95.5%) among all the recombinant proteins assayed. For the ELISA, the ROC curve was 97.2%, 91.8% and 81.6% for TpN17, TmpA and TpN47, respectively. TpN17 and TmpA yielded a sensitivity of 69.9%, while TpN47 obtained a value of 53.8%. Specificity was almost 100% for all three proteins. No cross-reaction was observed for TpN17 in the serum samples from non-bacterial infections. Regarding leptospirosis-positive samples, cross-reactivity score was varied from 8.6 to 34.6%. This is most probably due to conservation of the epitopes in these proteins across bacteria. The use of recombinant proteins in immunoassays for syphilis diagnosis was showed provide greater reliability to results of the treponemal assays. Despite the low sensitivity, the proteins showed high diagnostic capacity due to the AUC values found. However, an improvement in sensitivity could be achieved when antigenic mixtures are evaluated.

OPEN ACCESS

Citation: Silva ÂAO, de Oliveira UD, Vasconcelos LdCM, Foti L, Leony LM, Daltro RT, et al. (2020) Performance of *Treponema pallidum* recombinant proteins in the serological diagnosis of syphilis. PLoS ONE 15(6): e0234043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234043>

Editor: Paulo Lee Ho, Instituto Butantan, BRAZIL

Received: March 3, 2020

Accepted: May 18, 2020

Published: June 18, 2020

Copyright: © 2020 Silva et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The author(s) received no specific funding for this work.

Competing interests: No authors have competing interests.

Introduction

Syphilis is a human multisystemic infection caused by a spirochete bacterium called *Treponema pallidum*, subspecies *pallidum* (order Spirochaetales). Most cases of syphilis are due to sexual contact, hence the infection is considered a sexually transmitted infectious disease—STI [1]. Congenital syphilis occurs when pregnant women are infected and remains prevalent in many parts of the world [2]. It has been reported that cases of infection are also acquired through blood transfusion, needle sharing, contact with open lesions, organ transplantation, or occupational and other exposures [3–6]. Despite the existence of effective antibiotic therapy, the global burden of syphilis infection has increased drastically throughout the world in the last decades, with an estimated 10.6 million cases yearly, becoming a global health concern [7].

After initial contact with skin or mucous membranes, spirochetes replicate locally eliciting an inflammatory response and disseminating through blood vessels and lymphatics [8]. A distinctive painless, usually solitary, clean-based, indurated ulcer (chancere) typically appears three weeks after exposure. In penicillin-treated individuals, the ulcer begins to resolve within a few days, while in untreated individuals, primary lesions spontaneously resolve without scarring within 3–6 weeks. By this time, spirochetes disseminate from the primary site of infection to several organ tissues, mainly the skin, setting a new stage known as secondary syphilis [9]. This stage presents a broad range of mucocutaneous manifestations as well as systemic signs and symptoms within 4–10 weeks of the initial contact with *T. pallidum*. A robust cellular and humoral immune responses are present in an individual with secondary syphilis; however, one-third of untreated individuals develop potentially devastating forms of recrudescence referred to as tertiary syphilis, characterized as neurosyphilis, cardiovascular syphilis, or gummatous cutaneous syphilis [9].

Laboratory diagnosis of syphilis includes treponemal and non-treponemal tests. Non-treponemal tests, such as the VDRL (venereal disease research laboratory) and RPR (rapid plasma reagin), are employed to screen the infection and to monitor the therapeutic effect. Usually, they are easy-to-use, inexpensive and widely available; but further confirmatory screening tests are required for the detection of IgG anti-*T. pallidum*- antibodies by treponemal methods, including chemiluminescence, *T. pallidum* particle agglutination (TPPA) assay, *T. pallidum* hemagglutination (TPHA) assay, fluorescent treponemal antibody absorption test (FTA-ABS), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunochromatography. Nevertheless, these tests are more expensive and labor-intensive compared to non-treponemal tests [10]. Furthermore, some of them are highly operator-dependent. Among treponemal tests, ELISA is the most commonly used in syphilis diagnosis due to its simplicity, low cost and ease of automation. In addition, ELISA presents usually higher diagnostic performance compared to non-treponemal assays [11]. However, its performance depends on the antigens employed to detect the anti-*T. pallidum* antibodies presence and on the clinical stage of the infection [12].

Despite the existence of serological tests, the diagnosis of syphilis is still a challenge. Since there is no *T. pallidum* culture in axenic medium, serological tests are used as final diagnosis. Additionally, the distinct clinical forms of the infection may influence serological performance [13]. Therefore, clinical decisions have been impacted when serum samples from patients are confirmed as treponemal test reactive, yet non-treponemal nonreactive [14]. Several recombinant and native *T. pallidum*-proteins have already been tested as antigens in diagnostic tests for syphilis. Promising results were found using various diagnostic platforms [15–25]. However, there is no consensus on which antigens have the best serodiagnostic performance for syphilis. Accordingly, evaluation of recombinant *T. pallidum*-antigens is essential to develop accurate serological diagnostic tests for syphilis. Therefore, our aim was to assess the

performance of *T. pallidum*-recombinant proteins TmpA, TpN17, TpN47 and TpN15 for syphilis serodiagnosis using distinct tools to antigen-antibody detection.

Materials and methods

Ethical statements

This study was approved by the Institutional Review Board (IRB) for Human Research at the Gonçalo Moniz Institute of the Oswaldo Cruz Foundation (IGM-FIOCRUZ), Salvador, Bahia-Brazil (CAAE: 67809417.0.0000.0040). To protect patient privacy, the IRB required that all samples be coded to mask patient identification, thereby avoiding the need for verbal or written consent. The data of all patients were fully anonymized before the researchers accessed the human sera samples.

Recombinant proteins synthesis

Optimized synthetic genes for *E. coli* expression of *T. pallidum* subsp. *pallidum* Nichols strain were acquired from a commercial supplier (GenScript, Piscataway-NJ, USA). The synthetic genes purchased in pUC57 were subcloned in-house into the pET28a expression vector. Expression of the recombinant proteins was performed in *E. coli* strain BL21-Star (DE3) [26]. For this purpose, bacterial cells transformed with the respective expression vectors were first incubated for 16 h at 37°C in Luria-Bertani broth containing kanamycin (50 µg/ml). The culture was then diluted at 1:20 in fresh medium and reincubated at 37°C until an optical density ranging from 0.6–0.8 was attained, measured at 600 nm (OD₆₀₀). Expression was induced by adding IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) to a final concentration of 500 µM and incubating for 4 h at 37°C. Bacterial cell disruption was performed using either a microfluidizing processor (Microfluidics Model M-110L, Hyland Scientific, Stanwood-WA, USA) or by chemical methods, and the resulting recombinant proteins were purified by affinity and ion-exchange chromatography. Proteins were quantified by fluorometric assay (Qubit12.0, Invitrogen Technologies, Carlsbad-CA, USA) and purity was verified by SDS-PAGE stained with CBB-G250 [27].

Sampling

The human sera used in this study were divided into two panels. Panel 1 consisted of 338 *T. pallidum*-negative and 173 *T. pallidum*-positive samples obtained from the panel of the Blood Bank Screening and Hemotherapy Quality Control Program (AEQ-MS; Fiocruz/RJ, Brazil) (28), Pernambuco State Blood Bank (HEMOPE), Bahia State Blood Bank (HEMOBA), Clinical and Toxicological Analysis Laboratory of the Faculty of Pharmacy of Federal University of Bahia (LACTFAR-UFBA), Federal University of Goiás (UFG), Central Laboratory of Pernambuco (LACEN/PE) and Aggeu Magalhães Institute (FIOCRUZ/PE). Samples from the state of Bahia were acquired from December 2017 to April 2019, and from the states of Goiás and Pernambuco from June 2014 to December 2016. Initially, the ability of the recombinant antigens to distinguish *T. pallidum*-positive from negative samples was evaluated by liquid microarray (LMA) using the well-characterized sample set from the AEQ Panel. The antigens showing the highest diagnostic performance by LMA were then assayed by ELISA using samples from *T. pallidum*-infected and non-infected individuals living in the states of Bahia and Pernambuco. Panel 2, containing 209 samples from individuals infected with unrelated diseases previously diagnosed by parasitological or serological methods, was employed to evaluate cross-reactivity. This panel included chronic Chagas disease (n = 10), dengue (n = 10), filariasis (n = 10), hepatitis B virus (n = 20), hepatitis C virus (n = 20), HIV-1/2 (n = 20), HTLV-1/2 (n = 20),

Leishmania spp. (n = 09) and leptospirosis (n = 80). All serum samples were serologically retested for non-specific *T. pallidum* antibodies using the RPR-BRAS (Laborclin LTDA, Curitiba-PR, Brazil), Immutrep[®] USR Antigen (Omega Diagnostics LTD., Alva-Scotland, United Kingdom) assays or anti-*Treponema pallidum* IIFT (IgG) test (Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, Germany). All testing was strictly performed according to manufacturer instructions. Any samples that returned discordant or inconclusive results were excluded. A unique identifier code was assigned to each sample to ensure a blinded analysis.

Laboratory assays

The ability of recombinant antigens to efficiently differentiate between *T. pallidum*-positive and negative samples was evaluated by LMA, using a well-characterized set of samples obtained from the AEQ panel [28], and by ELISA, using samples of *T. pallidum*-infected and non-infected sera obtained from the HEMOBA, HEMOPE, LACTFAR-UFBA, UFG, LACEN/PE and FIOCRUZ/PE.

Liquid microarray. Coupling of *T. pallidum* antigens to paramagnetic carboxylated microspheres (Luminex Corp, Austin-TX, USA) was performed using the manufacturer's protocol. Briefly, a suspension of 1×10^6 microspheres was sonicated in an ultrasound bath (Cole-Parmer ultrasonic cleaner, Cole-Parmer Instruments Company, Vernon Hills-IL, USA) and horizontal agitation (IKA vortex genius 3 VG3S32, IKA do Brasil, Campinas-SP, Brazil) to ensure homogeneous distribution of the suspension. After two washes, the microspheres were suspended in 400 μ l of activation buffer (100 mM sodium phosphate, pH 6.3). Solutions (50 μ l of each) of N-hydroxysulfosuccinimide (Pierce, Rockford-IL, USA) and 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (Pierce), both diluted to 50 mg/ml in double-distilled water (dH₂O), were added to chemically activate the microspheres. After mixing, the microspheres were incubated for 20 min in the dark at 25°C at 250 rpm lateral agitation. The activated microspheres were subsequently washed twice with coupling buffer, after which 200 μ l of antigen was diluted in the coupling buffer at the chosen concentration. These suspensions were incubated at 250 rpm horizontal agitation for 2 hours at 37°C. After incubation, the microspheres were washed three times with washing buffer (PBS, containing 1% BSA, 0.05% Tween 20). The final microsphere suspensions were counted (Beckman Coulter Z3, Kendall-FL, USA) and adjusted to a concentration of 4×10^4 microspheres/ml in storage buffer (PBS containing 1% BSA and 0.02% sodium azide) and stored, protected from light at 2–8°C in low binding tubes (#0030 108.116, Eppendorf, Hamburg, Germany) for 24 hours. The buffer conditions and antigen concentration for coupling were as follows: TpN17 and TpN15 in PBS pH 7.2 at 25 μ g/ml, TpN47 in PBS pH 7.2 at 50 μ g/ml and TmpA in PBS pH 7.2 at 80 μ g/ml. These conditions correspond to the higher signal to noise ratios and the best ROC curve (definition in S1 Text) after assaying them against a set of positive and negative serum samples. The LMA immunoassays were performed using serum samples diluted to 1:100 in assay buffer (PBS containing 1% BSA, 0.05% Tween 20). Fifty μ l of microsphere suspension (~2,500) and 50 μ l of diluted serum were mixed in each well of a 96-well plate and incubated for 15 min in the dark at 37°C with horizontal rotation at 600 rpm. The microspheres were then washed twice with 100 μ l of wash buffer in Hydroflex plate washer with magnetic plate support (TECAN, Durham-NC, USA). Goat anti-human IgG conjugated to phycoerythrin (GTIG-001, Moss substrates, Pasadena-MD, USA) diluted 1:1,000 in assay buffer was added and microspheres were incubated for 15 min in the dark at 37°C with horizontal rotation at 600 rpm. The microspheres were washed twice with 200 μ l of wash buffer and once with Sheath Fluid 1x (Luminex Corp, Austin-TX, USA). The results, expressed as median fluorescence intensity (MFI), was determined with a Luminex 200 device.

ELISA

The optimal antigen coating and antibody-enzyme conjugate (HRP) dilutions, as well as serum dilutions, were determined by checkerboard titration. Final conditions were selected based on maximum divergence in average optical density (OD) values by comparing values of positive and negative samples plus three standard deviations (SD). Results were considered acceptable when positive samples presented an average OD above 1.0 and negative samples were below 0.25. After optimization, the recombinant proteins were added to transparent flat-bottom polystyrene microplates (Microtest Plate 96 Well, F—Sarstedt, Germany) at 100 ng (TpN17 and TpN47) and 200 ng (TmpA) per well in coating buffer (0.05 M carbonate-bicarbonate, pH 9.6). TpN15 protein was not available for testing using indirect ELISA. The microplates were then blocked with WellChampion™ (Ken-En-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Denmark) synthetic blocking buffer according to the manufacturer's instructions. Serum samples (100 µl) were loaded at 1:25 in 0.05 M phosphate-buffered saline—PBS (pH 7.4). Following incubation for 60 min at 37°C, the microplates were washed in 0.05% Tween-20 in PBS buffer (PBS-T) to remove any unbound antibodies. HRP-conjugated goat anti-human IgG (Bio-Manguinhos, Fiocruz/RJ, Brazil) (100 µl/well) was diluted at 1:10,000 (TmpA) or 1:20,000 (TpN17 and TpN47) in PBS and added to each well, followed by incubation for 30 min at 37°C and washing with PBS-T. For detection of the immunocomplexes, 100 µl of TMB Plus solution (tetramethyl-benzidine; Ken-En-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Denmark) was added to each well. Following 15 min of incubation at RT in the dark, the reaction was stopped with 50 µl 0.3 M H₂SO₄, and absorbance was measured at 450 nm in a microplate spectrophotometer (SPECTRAMax 340PC[®], California, USA).

Within-run imprecision assessment

Within-run imprecision (or repeatability), using ELISA as a diagnostic platform, was estimated by evaluating a set of sera (22 *T. pallidum*-positive and 10 negative samples randomly chosen) in quadruplicate within the same run. The results were analyzed considering arithmetic means of the RI, as well as standard deviation and coefficient of variation determinations.

Statistical analysis

Statistical tests were performed using scatter computer graphic software (GraphPad Prism version 7, San Diego-CA, USA). The variables were analyzed through descriptive measures such as arithmetic and geometric means, standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV). The geometric means were calculated with a confidence interval of 95% CI. Shapiro-Wilk test was applied for testing the data normality. When rejecting the null hypothesis, the Wilcoxon-Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test was used. When the normality of the data was confirmed, the Student's T-test was employed. All conclusions were taken at a significance level of $p < 0.05$. The absence of overlapping of the 95% CI values was considered as statistical significance. Cut-off (CO) values were established based on the area under ROC curve analysis. The results were normalized by calculating the reactivity index (RI) that denotes the ratio between the OD of the samples and the CO. Samples that resulted in $RI \geq 1.0$ were considered positive. If a sample's RI value fell within $\pm 10\%$ of 1.0, it was classified as inconclusive (grey zone). To assess global accuracy for each antigen, areas under the ROC curve (AUC) were calculated and interpreted as outstanding (1.0), elevated (0.82–0.99), moderate (0.62–0.81) or low (0.51–0.61) [29]. LMA and ELISA performance parameters were determined and compared regarding sensitivity (Sen), specificity (Spe) and accuracy (acc). The agreement strength between the standard tests and the LMA or ELISA was established by Cohen's kappa (κ) analysis, which was interpreted as follows: $1.0 \leq \kappa \leq 0.81$ (almost perfect agreement), $0.80 \leq \kappa \leq 0.61$

(substantial agreement), $0.60 \leq \kappa \leq 0.80$ (moderate agreement), $0.40 \leq \kappa \leq 0.60$ (fair agreement), $0.20 \leq \kappa \leq 0.40$ (slight agreement), and $\kappa = 0$ (poor agreement) [30]. A checklist (S1 Table) are provided according to the Standards for the Reporting of Diagnostic accuracy studies (STARD) guidelines. A list of abbreviation and definition for ROC curve, AUC, 95%CI, RI, sensitivity, specificity, accuracy, CV, SD and CO is available in S1 Text.

Results

Acquisition of recombinant proteins

After cell-disruption and centrifugation, recombinant proteins were recovered from the supernatant, with purity estimated at over 95% (Fig 1; raw image in S1 Raw Image). As satisfactory protein purity was not obtained through one-step purification, two chromatographic steps were necessary as described above. Satisfactory recovery yield ranged from 1.7 to 2 mg/l of culture volume, with TpN47 being the least productive. The recombinant proteins presented predicted molecular masses of 17, 47, 49 and 15 kDa for TpN17, TpN47, TmpA and TpN15, respectively.

Sera characterization

A total of 938 serum samples were employed in the present study (Fig 2). All samples were initially re-assayed for non-specific *T. pallidum* antibodies assays or anti-*T. pallidum* using non-

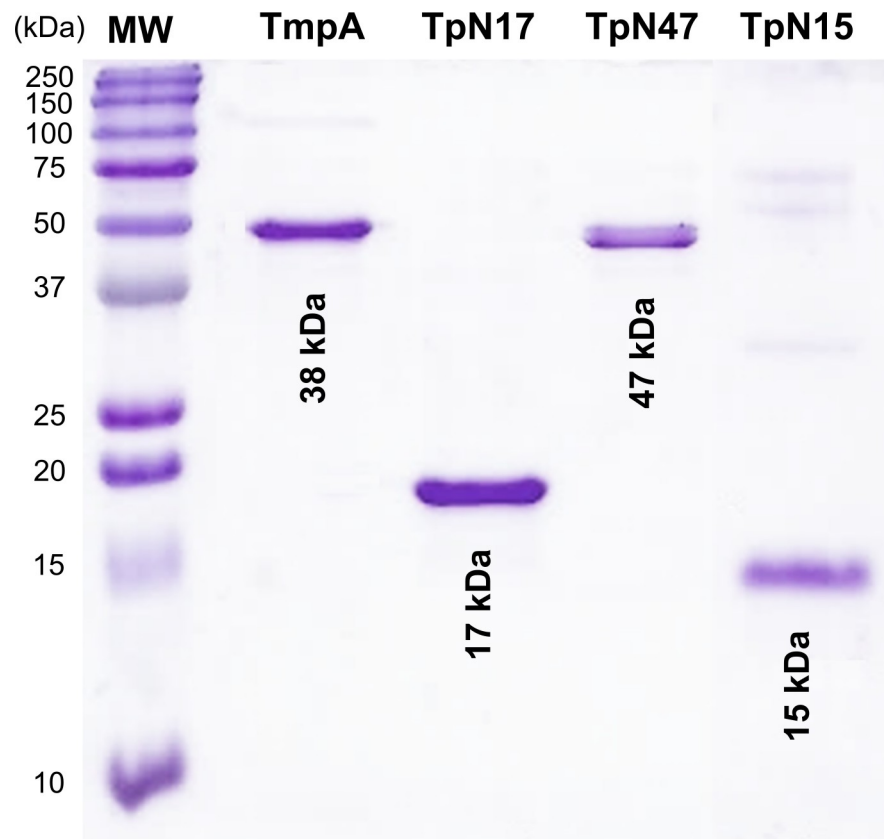


Fig 1. SDS-PAGE stained with coomassie brilliant blue. Recombinant proteins: 1 μ g of each antigen was loaded per lane. Antigens are identified at the top of each lane. kDa: Kilodaltons; MW: molecular weight.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234043.g001>

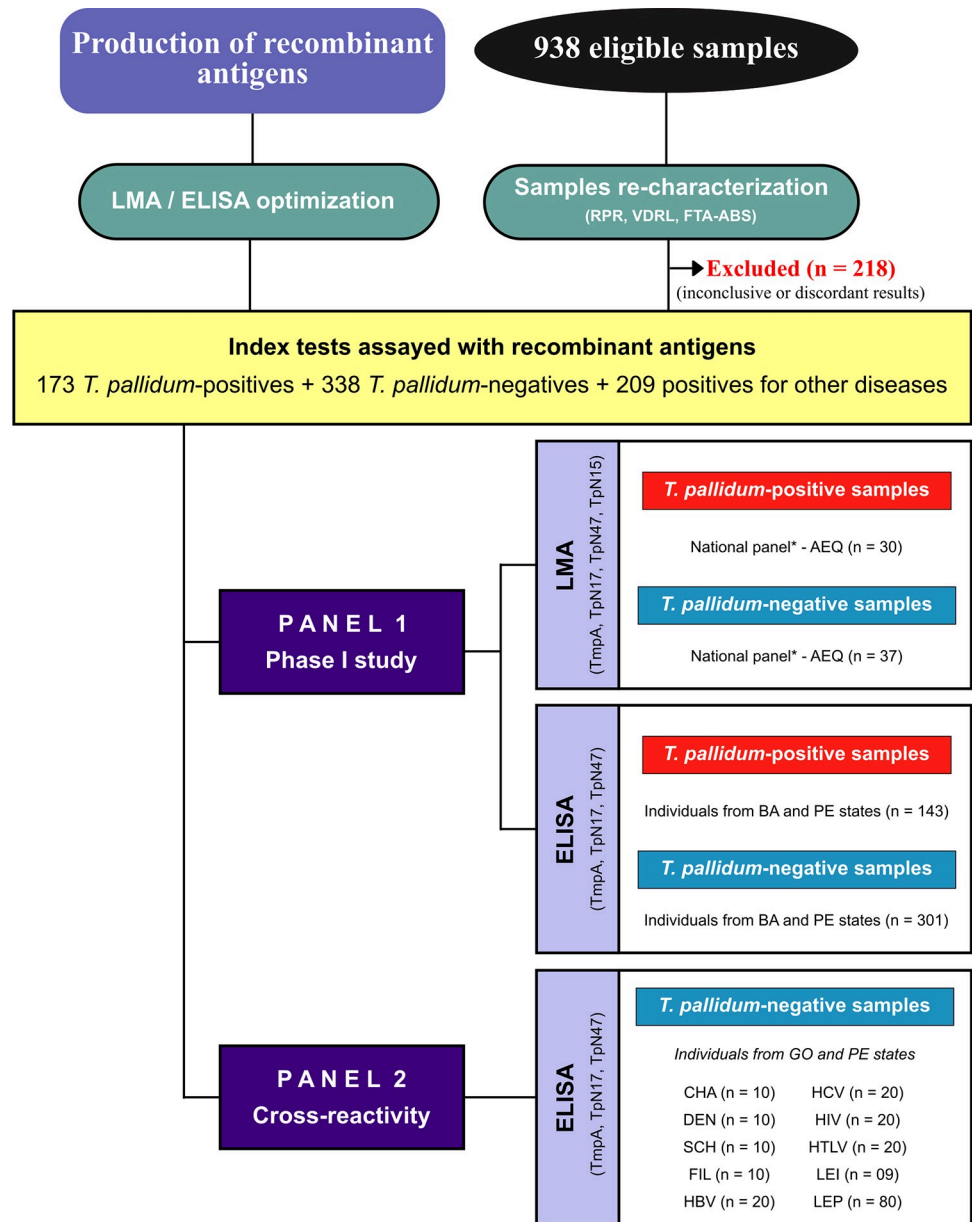


Fig 2. Flowchart detailing diagnostic performance evaluations of recombinant antigens used in the serological diagnosis of syphilis. Reference Standards Tests: RPR (Rapid Plasma Reagin), USR (Unheated Serum Reagin) and IIFT (indirect immunofluorescence—IgG). BA (Bahia); GO (Goiás); PE (Pernambuco); CHA (chronic Chagas disease); DEN (dengue), SCH (chronic schistosomiasis), FIL (filariasis); HBV (hepatitis B); HCV (hepatitis C); HIV (human immunodeficiency virus); HTLV (human T cell lymphotropic virus); LEI (leishmaniasis); LEP (leptospirosis); LMA (Liquid microarray); ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234043.g002>

treponemal or treponemal tests, respectively. Any samples that returned discordant or inconclusive results were excluded (n = 218; ~ 23%). The present study was performed using two distinct serological panels. Panel 1 was composed of sera from AEQ-panel (LMA analysis; n = 67) and samples from patients living in Bahia and Pernambuco states (ELISA analysis; n = 444), whereas panel 2 was formed by sera from individuals infected with unrelated diseases (n = 209).

LMA performance

Initially, 67 serum samples from the AEQ panel were assayed by LMA using four *T. pallidum*-recombinant proteins (Fig 3; S2 Table). Based on the total number of samples, the area under ROC (AUC) varied from 99.0% for TmpA, TpN15 and TpN17 proteins to 100% for TpN47, demonstrating excellent diagnostic accuracy for all *T. pallidum*-recombinant proteins. In the LMA analyses, the sensitivity score yielded values higher than 90% for TpN17 and TpN15 and 100% for TpN47. TmpA yielded the lowest sensitivity value (80.0%). Global analysis of negative serum samples revealed that the lowest and highest specificity values were presented by TpN47 (91.9%) and by TmpA (100%), respectively. The accuracy of the *T. pallidum*-recombinant proteins was also assessed. As shown in Fig 3, TpN47 and TpN15 revealed the best accuracy (95.5%) among the four recombinant proteins assayed, while accuracy values for TmpA and TpN17 were 91.0% and 92.5%, respectively. The strength of agreement between the LMA results and the reference tests was almost perfect for all proteins. At 95% CI, the sensitivity, specificity and accuracy scores showed no difference among the antigens tested by LMA. For positive samples, the TpN17 antigen displayed the highest RI (17.6 ± 4.2) followed by TpN47 (4.6 ± 1.9), TmpA (2.8 ± 1.4) and TpN15 (2.6 ± 0.8). With respect to the negative samples, RI values were lower than 0.15 for all *T. pallidum*-recombinant proteins. Considering the RI analysis, discrimination between positive and negative samples was highly significant ($p < 0.0001$). Based on the AUC and accuracy results described above, all four proteins were eligible for phase 1 study using the ELISA platform except TpN15, as there was not enough protein to continue the study.

ELISA performance

Considering the pre-established criteria (OD < 0.25 for negative samples and OD > 1.00 for positive samples) and the highest difference between the arithmetic mean OD for positive and negative plus three standard deviations (DP), antigen concentration were established at 100 ng (TpN17 and TpN47) and 200 ng (TmpA), antibody-enzyme conjugate diluted at 1:10.000 (TmpA) and 1:20.000 (TpN17 and TpN47), and serum samples diluted at 1:25. ROC curves were generated from 143 *T. pallidum*-positive samples and 301 negative samples assayed by ELISA (Fig 4; S3 Table). The AUC values were 91.8% for TmpA, 97.2% for TpN17 and 81.6% for TpN47. Considering these values, *T. pallidum*-recombinant proteins exhibited excellent (TmpA and TpN17) and good (TpN47) discrimination power and high diagnostic values. The TmpA and TpN17 *T. pallidum*-recombinant proteins produced a sensitivity of 69.9% followed by TpN47 (53.8%). The differences in sensitivity are statistically significant for the values obtained for TmpA and TpN17 relative to the values obtained for TpN47. The maximum value of specificity was obtained with TmpA and TpN17 (100%). Assays with TpN47 exhibited a specificity value of 99.7% (Fig 4). Accuracy achieved the maximum value when the samples were assayed with TmpA and TpN17 (90.3%). A lower value was found for TpN47. However, at 95% CI, accuracy scores showed no difference among the three antigens. Differences in sensitivity, specificity and accuracy between serological panels from Bahia and Pernambuco states are not statistically significant (data not shown). Kappa values showed substantial (TmpA and TpN17) and moderate (TpN47) agreement with the reference tests. Considering the inconclusive zone (RI = $1.0 \pm 10\%$), few positive samples yielded inconclusive results, being 14 (4.67%) inconclusive for TpN17 testing, 12 (4%) for TmpA and 11 (3.67%) and for TpN47. No negative sample fell inside the inconclusive space when tested using TpN17. However, one negative sample presented inconclusive results when assayed with TmpA and TpN47. With respect to the *T. pallidum*-positive samples, TmpA showed the highest RI value (1.62 ± 0.38), followed by TpN17 (1.28 ± 0.35) and TpN47 (1.02 ± 0.41). No significant difference was observed between

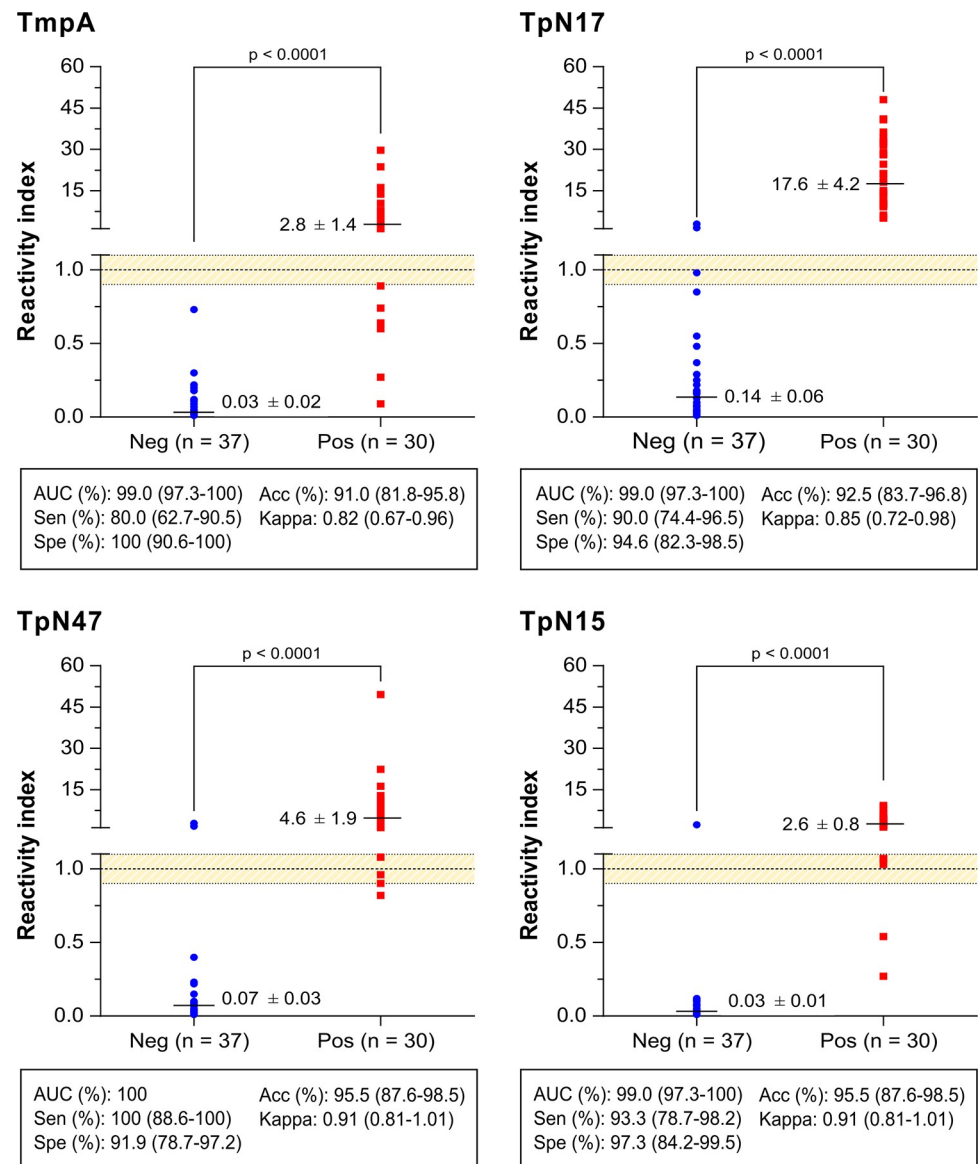


Fig 3. Anti-*Treponema pallidum* IgG level in serum samples from AEQ panel by liquid microarray. The cut-off is set at the reactivity index value = 1.0 and the orange shadowed area represents the grey zone (RI = 1.0 \pm 0.10). Horizontal lines and numbers for each result group represent the geometric means (\pm 95% CI). Acc (Accuracy); AEQ (Blood Bank Screening and Hemotherapy Quality Control Program); AUC (Area Under Curve); Neg (negative); Pos (positive); Sen (Sensitivity); Spe (Specificity).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234043.g003>

the three proteins. For *T. pallidum*-negative samples, RI value was lower for TpN17 (0.13 ± 0.32), followed by TpN47 (0.38 ± 0.14) and TmpA (0.40 ± 1.6). Similarly, to positive samples, no significant difference was observed between the three proteins, except when TpN47 was compared to TmpA ($p = 1.005$).

Within-run imprecision assessment

The assays were performed using 22 *T. pallidum*-positive samples and 10 negative samples. Each sample was analyzed in quadruplicate, named replicate 1, replicate 2, replicate 3 and replicate 4 (Fig 5; S4 Table). According to the performance parameters, each one of the four

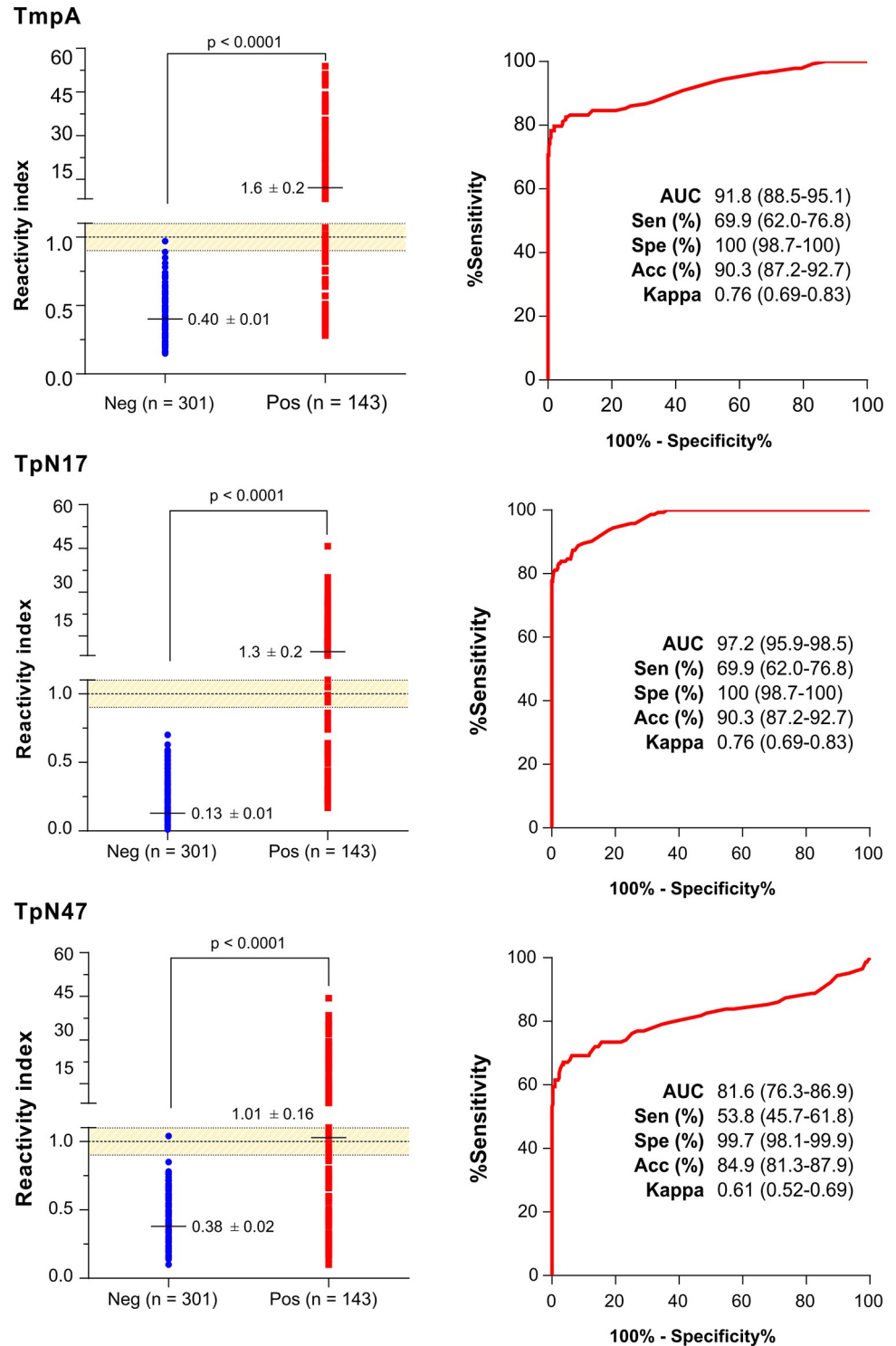
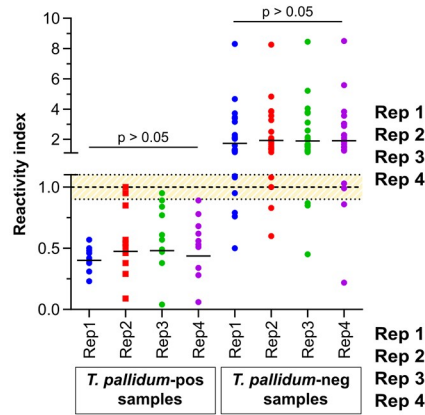


Fig 4. Reactivity index and diagnostic performance parameters obtained with *Treponema pallidum*-positive and negative serum samples. The cut-off is set at the reactivity index value = 1.0 and the shadowed area represents the grey zone (RI = 1.0 ± 0.10). Horizontal lines and numbers for each result group represent the geometric means (± 95% CI). AUC (Area Under Curve); Sen (Sensitivity); Spe (Specificity); Neg (negative); Pos (positive).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234043.g004>

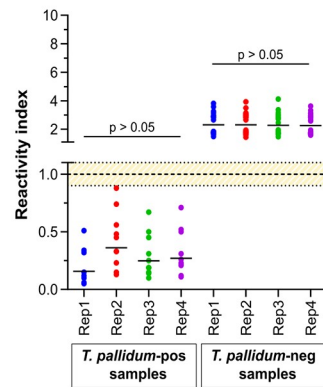
TmpA



| <i>T. pallidum</i> -positive samples | | | | |
|--------------------------------------|-------------|-------|-------------|------------------|
| Mean RI (95%CI) | SD | CV | SEN (95%CI) | |
| Rep 1 | 1.74 ± 0.53 | 1.767 | 1.02 | 81.8 (61.5-92.7) |
| Rep 2 | 1.93 ± 0.54 | 1.733 | 0.90 | 90.9 (72.2-97.5) |
| Rep 3 | 1.90 ± 0.57 | 1.817 | 0.96 | 86.4 (66.7-95.3) |
| Rep 4 | 1.91 ± 0.64 | 1.806 | 0.95 | 86.4 (66.7-95.3) |

| <i>T. pallidum</i> -negative samples | | | | |
|--------------------------------------|-------------|-------|-------------|------------------|
| Mean RI (95%CI) | SD | CV | SPE (95%CI) | |
| Rep 1 | 0.40 ± 0.08 | 0.098 | 0.24 | 100 (72.2-100) |
| Rep 2 | 0.47 ± 0.25 | 0.292 | 0.62 | 90.0 (59.6-98.2) |
| Rep 3 | 0.48 ± 0.34 | 0.276 | 0.57 | 100 (72.2-100) |
| Rep 4 | 0.44 ± 0.26 | 0.246 | 0.56 | 100 (72.2-100) |

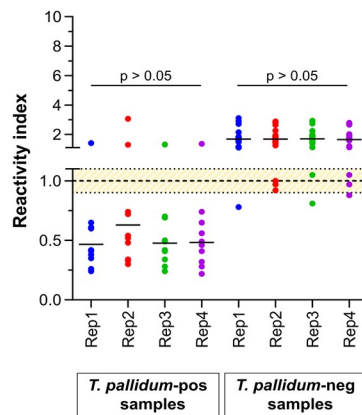
TpN17



| <i>T. pallidum</i> -positive samples | | | | |
|--------------------------------------|-------------|-------|-------------|----------------|
| Mean RI (95%CI) | SD | CV | SEN (95%CI) | |
| Rep 1 | 2.30 ± 0.31 | 0.731 | 0.32 | 100 (85.1-100) |
| Rep 2 | 2.31 ± 0.32 | 0.730 | 0.32 | 100 (85.1-100) |
| Rep 3 | 2.23 ± 0.30 | 0.721 | 0.32 | 100 (85.1-100) |
| Rep 4 | 2.27 ± 0.29 | 0.682 | 0.30 | 100 (85.1-100) |

| <i>T. pallidum</i> -negative samples | | | | |
|--------------------------------------|-------------|-------|-------------|----------------|
| Mean RI (95%CI) | SD | CV | SPE (95%CI) | |
| Rep 1 | 0.16 ± 0.09 | 0.154 | 0.98 | 100 (72.2-100) |
| Rep 2 | 0.36 ± 0.17 | 0.246 | 0.68 | 100 (72.2-100) |
| Rep 3 | 0.25 ± 0.11 | 0.187 | 0.75 | 100 (72.2-100) |
| Rep 4 | 0.27 ± 0.12 | 0.195 | 0.72 | 100 (72.2-100) |

TpN47



| <i>T. pallidum</i> -positive samples | | | | |
|--------------------------------------|-------------|-------|-------------|------------------|
| Mean RI (95%CI) | SD | CV | SEN (95%CI) | |
| Rep 1 | 1.69 ± 0.24 | 0.559 | 0.33 | 95.5 (78.2-99.2) |
| Rep 2 | 1.68 ± 0.23 | 0.531 | 0.32 | 90.9 (72.2-97.5) |
| Rep 3 | 1.70 ± 0.22 | 0.480 | 0.28 | 95.5 (78.2-99.2) |
| Rep 4 | 1.65 ± 0.23 | 0.515 | 0.31 | 90.9 (72.2-97.5) |

| <i>T. pallidum</i> -negative samples | | | | |
|--------------------------------------|-------------|-------|-------------|------------------|
| Mean RI (95%CI) | SD | CV | SPE (95%CI) | |
| Rep 1 | 0.47 ± 0.18 | 0.343 | 0.74 | 90.0 (59.6-98.2) |
| Rep 2 | 0.63 ± 0.33 | 0.836 | 1.33 | 80.0 (49.0-94.4) |
| Rep 3 | 0.48 ± 0.17 | 0.314 | 0.66 | 90.0 (59.6-98.2) |
| Rep 4 | 0.48 ± 0.19 | 0.331 | 0.69 | 90.0 (59.6-98.2) |

Fig 5. Reactivity index and coefficient of variation in the within-run imprecision assessment. The cut-off is set at the reactivity index value = 1.0 and the shadowed area represents the grey zone (RI = 1.0 ± 0.10). Horizontal lines and numbers for each result group represent the geometric means. CI (confidence interval); CV (coefficient of variation); Neg (negative); Pos (positive); SEN (Sensitivity); SPE (Specificity); Rep (replicate); RI (reactivity index); SD (Standard Deviation).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234043.g005>

repetitions reached high sensitivity and specificity values. Performance parameters assessed did not present statistically significant differences among all repetitions for the same serum

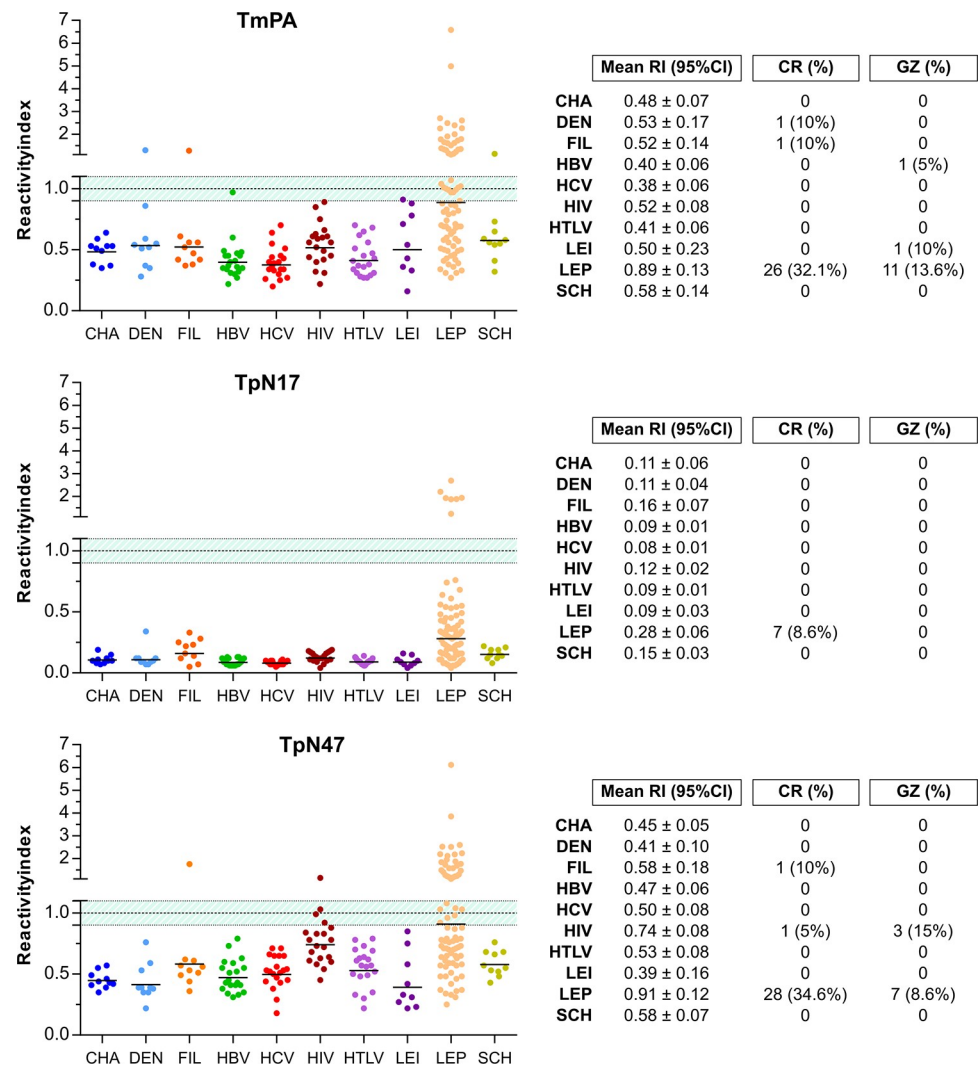


Fig 6. Analysis of the cross-reactivity of the *Treponema pallidum*-recombinant proteins to sera from non-bacterial unrelated diseases. The cut-off value is reactivity index = 1.0 and the shadowed area represents the grey zone (RI = 1.0 ± 0.10). CHA (chronic Chagas disease); DEN (dengue), SCH (chronic schistosomiasis), FIL (filariasis); HBV (hepatitis B); HCV (hepatitis C); HIV (human immunodeficiency virus); HTLV (human T cell lymphotropic virus); LEI (leishmaniasis).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234043.g006>

sample. Similarly, no statistical difference in reactivity index was observed considering the 95% CI values overlapping of each measurement. The coefficient of variation (CV) was also considered in the within-run imprecision assessment, which was within a 10% range for each antigen, indicating adequate reproducibility.

Assessment of cross-reactivity

With non-bacterial unrelated infectious diseases. The panel composed of 129 serum samples was employed to assess cross-reactivity of antibodies produced against several infectious parasitic and viral diseases. As shown in Fig 6 (S5 Table), no cross-reaction was observed when serum samples were assayed using TpN17. The incidence of cross-reactivity using TmpA and TpN47 antigens was negligible; only three (dengue, filariasis and schistosomiasis) and two (filariasis and HIV) positive samples produced a false-positive result, respectively.

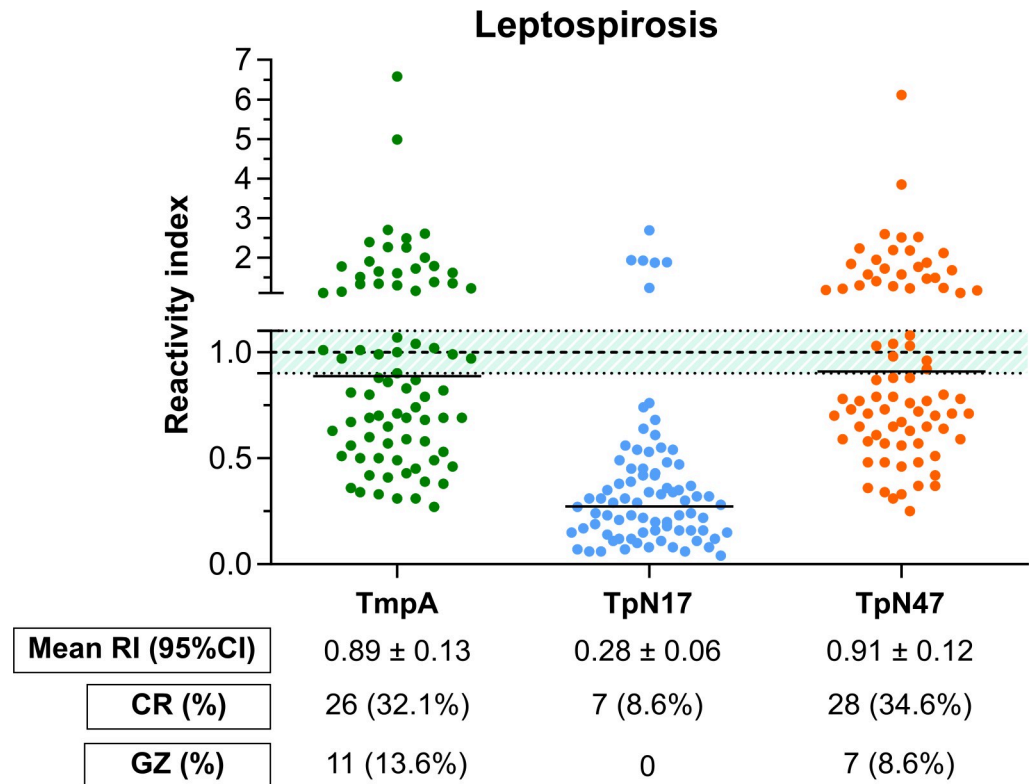


Fig 7. Analysis of the cross-reactivity of the *Treponema pallidum*-recombinant proteins to sera from leptospirosis patients. The cut-off value is reactivity index = 1.0 and the shadowed area represents the grey zone (RI = 1.0 ± 0.10). LEP (leptospirosis).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234043.g007>

Considering the grey zone (RI values of 1.0 ± 0.10), relatively few samples were considered inconclusive: one positive sample for HBV and *Leishmania* ssp. in the TmpA assay, 3 HIV-positive samples in the TpN47 assay. No sample was inconclusive when assayed using the TpN17 antigen and all other samples produced relatively low RI intensities (<0.80).

With leptospirosis. The panel composed of 80 serum samples was employed to assess cross-reactivity of antibodies produced against leptospirosis. As shown in Fig 7 (individual data points are available in the S5 Table), a surprisingly high number of leptospirosis-positive samples assayed using TmpA (32.1%) and TpN47 (34.6%) presented positive results. TpN17 also presented undesirable results when leptospirosis-positive samples were assayed, but to a lesser extent (8.6%). Considering the grey zone (RI values of 1.0 ± 0.10), 13.6% and 8.6% of leptospirosis-positive samples fell inside the inconclusive space when assayed using TmpA and TpN47, respectively. No sample was inconclusive when assayed using the TpN17 antigen.

Conservation of the *T. pallidum* TpN17, TpN47 and TmpA proteins

An initial hypothesis to explain the high cross-reactivity results of the *T. pallidum* antigens observed in serum samples of leptospirosis patients can be the conservation of the protein sequences among bacteria. Therefore, we have evaluated amino acid sequence conservation of these antigens using the BLASTP and PSI-BLAST tools and searching the Genbank database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). TpN17 belongs to the lipoprotein NlpE protein family and TpN17 homologues are found in a wide range of bacteria including pathogenic and enteric species. For TpN17, amino acid identity was found in the range of 34–39% and

similarity in the 49–57% range. A search limited to Leptosiraceae identified four proteins showing 35–40% identity over a segment of 50–60 amino acids (*Leptonema illini* putative glycolipid-binding domain-containing protein, sequence ID: WP_002775996.1; *Leptospira broomii* 4Fe-4S binding protein sequence ID: WP_010568632.1; *Leptospira fletcheri* type I 3-dehydroquinate dehydratase, sequence ID: WP_135767117.1; *Leptospira inadai* 4Fe-4S binding protein, sequence ID: WP_020988179.1). TpN47 homologues were also found pathogenic and enteric bacterial species although the number of species in the Genbank containing TpN47 homologues seems to be smaller than for TpN17. TpN47 homologues share approximately 27–28% amino acid identity and 40–42% similarity. A search limited to Leptosiraceae identified three proteins showing ~30% identity over a segment of 109 amino acids (alpha/beta hydrolase, sequence ID: WP_108927162.1 and PGAP1-like domain protein, sequence ID: GBF37386.1 in *Leptospira johnsonii* and TetR/AcrR family transcriptional regulator, sequence ID: WP_109022509.1 in *Leptospira kobayashii*). Genbank searches returned TmpA homologues only for species from the genus *Treponema* with amino acid identity and similarity in the range of 30% and 50%, respectively. A search for TmpA homologues limited to Leptosiraceae did not retrieve any sequence.

Discussion

Here, we assessed the diagnostic performance of four recombinant proteins (TpN17, TmpA and TpN47) for detecting specific anti-*T. pallidum* antibodies in serum of syphilis-positive individuals. Initially, the ability of recombinant antigens to differentiate *T. pallidum*-positive from negative samples was assessed by liquid microarray (LMA). All four proteins showed AUC and accuracy values above 99% and 91%, respectively (Fig 3). Similar results were described in other studies [31–33]. In fact, studies using the BioPlex 2200 syphilis IgG assay revealed a sensitivity from 95.8% to 100% and specificity from 89.7% to 99.4% for the proteins TpN15, TpN17 and TpN47 assayed together [31–33]. On the other hand, BioPlex 2200 syphilis IgM assay showed a sensitivity of 80% and specificity of 97.9% [32]. The diagnostic performance of TpN17 and TmpA was also evaluated in multiplex bead assay for the detection of specific-*T. pallidum* IgG antibodies using TPPHA or RPR as reference tests. Compared to TPPA/TPHA, TpN17 and TmpA revealed a sensitivity of 90.1% and 67.5%, respectively, while the specificity values were 97.6% and 99.2%, respectively. In the case of RPR as reference test, sensitivity and specificity values were 94.8% and 92.7% for TpN17 and 79.9% and 98.2% for TmpA, respectively [34]. The results this study highlighted the higher efficiency of TpN17 and TpN47 for the detection of syphilis infection as compared to TmpA. Based on the AUC and accuracy values, our results are consistent with previous studies but due to the non-availability of TpN15 in the study, only three proteins were assessed for the phase I study by ELISA.

Similarly to LMA results, ELISA also showed high AUC (81.6% to 97.2%) and accuracy values (84.9% to 90.3%) for TpN17, TmpA and TpN47. No difference in performance was observed between samples from distinct Brazilian endemic settings (Bahia and Pernambuco), suggesting that all three antigens can be used regardless of geographical area. Indeed, *T. pallidum* strains have a high genomic similarity, ranging from 99.57 to 99.98%, without significant genetic variability capable of influencing diagnostic tests [35]. Related studies have already evaluated the diagnostic performance of recombinant proteins for the diagnosis of syphilis by ELISA but have obtained results divergent from our findings [17, 36–38]. Indeed, studies assessing the performance of TpN17 revealed sensitivities of 84.4% [17], 88.9% [37] and 100% [36, 38]. Regarding specificity, TpN17 was described as 100% specific [17, 36–38]. In the present study, we have found ~70% of sensitivity for this antigen in ELISA analysis. With respect to TmpA, high sensitivity and specificity values of 83.3% and 100% [37] and 89.6% and 100%

[36], respectively, have also been reported. Considering the infection clinic stage, the TmpA protein showed a sensitivity of 76% for primary syphilis, 100% for secondary syphilis and 98% for early latent syphilis with specificity values of 100% for all [39]. Finally, TpN47 showed a diagnostic sensitivity of 82.1% [17], 87.8% [36] and 88.9% [37] and specificity of 100% [17, 36, 37]. However, the low sensitivity values showed here were possibly due to the serological panel, whose samples have not been classified according to the stage of infection for each individual [39]. Recombinant antigens may have different antibody reactivities depending on the individual's stage of *T. pallidum* infection [38], and when ELISA is used with isolated recombinant antigens, the test was shown to be less sensitive than serological tests with antigenic mixtures [40]. Although not evaluated by the ELISA, TpN15 has already been described with 90.24% [36] and 100% [24] sensitivity and 100% [24, 36] specificity on that same diagnostic platform.

Compared to non-treponemic tests, treponemics perform better and are more useful in reverse screening. This new protocol for the diagnosis of syphilis provides greater confidence in the results because allows diagnoses cases of latent syphilis that may not have been detected by traditional screening, besides in addition to reducing the rates of false positive results associated others infectious disease with hepatitis, mononucleosis, viral pneumonia, chickenpox, measles, malaria, as well as vaccinations, pregnancy and a technical error in the execution of the tests [10]. Studies evaluating the reverse algorithm for syphilis screening have shown its higher sensitivity in comparison with the traditional screening algorithm due to its capacity to detect cases unlikely to be diagnosed by nonspecific tests. Thus, the treponemal antigens used as an antigenic matrix in these tests allow a better performance of the diagnostic platform used [41–46]. Indeed, a study showed that after the introduction of the reverse algorithm the percentage of false positive test results in Brazilian blood donors decreased from 60.7 to 25.6%. Furthermore, the discrepancy between initial chemiluminescence result and subsequent VDRL test result was reduced to 25.9%, as compared with 36.6% before its introduction [47].

Differences in sensitivity between LMA and ELISA may have been influenced by the differences in characteristics inherent in each diagnostic platform used. In LMA, the median fluorescence intensity (MFI) of the detection antibody corresponds to an average of 100 bead readings; that is, a single serum sample is analyzed 100 times per antigen, whereas in ELISA the sample is analyzed only once. This level of accuracy improves the detection limit by LMA assays [48, 49]. Despite the advantages offered by LMA-based technology, the need for a more complex laboratory infrastructure, well-trained workforce, and substantial financial investment [50] did not allow the study to be conducted using this diagnostic methodology alone.

In order to investigate the consistency of the results in the repetition of reactions, the analysis of intraplate reproducibility or repeatability was performed. In the analysis of the three molecules, there were no statistically significant differences in terms of AUC, sensitivity and specificity and RI values. For reproducibility to be acceptable, the coefficient of variation (CV) must be less than 20% [51]. In our case, we found values $\leq 1\%$ for positive samples and $< 2.19\%$ for negative samples, indicating that antigen assays have good repeatability. In a study for evaluation of the Elecsys Syphilis Immunoassay (double-antigen sandwich), the analytical performance was also assessed for within-run repeatability. The SD for negative pools ($IR < 1.0$) ranged from 0.01 to 0.02, and the SD for positive pools ($IR \geq 1.0$) ranged from 0.01 to 0.13. All the human serum pools met for the CV expected target, indicating good repeatability [52].

In the present study, cross-reaction was evaluated against serological samples from individuals with unrelated non-bacterial diseases, such as chronic Chagas disease, dengue, hepatitis B, hepatitis C, HIV-1/2, chronic schistosomiasis, HTLV-1/2, filariasis, cutaneous and visceral leishmaniasis and with the bacterial disease leptospirosis. All samples were reevaluated for the

presence of syphilis coinfection, to rule out the possibility of false positives due to presence of IgG anti-*T. pallidum*. Except for leptospirosis for which all proteins showed high cross-reactivity, TpN17 did not false-positive results and a small number of cross-reactive samples were observed for the other two proteins. TmpA false-positive samples were observed for dengue, filariasis and chronic schistosomiasis and TpN47 false-positives were detected for filariasis and HIV-1/2. A previous study using 40 hepatitis B positive samples reported only one false-positive result for TmpA [53]. Conversely, a second study identified two hepatitis B samples as positive for TpN47 and TmpA [24], while a third study reported only 1 hepatitis B and 1 HIV positive sample for TmpA [20]. In all cases, there was no clear hypothesis to explain the cross-reactions found.

With regards to leptospirosis cross-reaction, false-positive results could be due to similarity among proteins of *T. pallidum* and *Leptospira interrogans*. A basis on the level of antibody cross-reactivity with antigens from different bacterial species has already been described in previous studies [54–56]. Searches in the Genbank database did not identify any homologue of these three proteins in *Leptospira interrogans*. However, homologues of TpN17 and TpN47 are found in bacterial genomes, including in pathogenic and enteric species, as well as in some other species of the genus *Leptospira*. It is unclear why homologues of these proteins are not found in *Leptospira interrogans* genome sequences. This is most probably due to conservation of the epitopes in proteins across bacteria. The case of TmpA is even more intriguing. The information retrieved from the database using sequence similarity searches identified TmpA homologues only in species from the genus *Treponema*. With this information only, it is not possible to propose a hypothesis for cross-reactivity based on conservation of between *T. pallidum* TmpA and other bacterial species. These results cannot then be interpreted only as false-positive, but perhaps as a fact that needs to be further investigated. Two other possible explanations for our findings have been proposed previously. For a possible nonspecific reaction, it is likely that individuals with positive samples for unrelated diseases also had been previously treated syphilis, but antibodies remained circulating in the body [20]. However, we sought to rule out the possibility of using samples that were also positive for syphilis by retesting all serum samples with two reference test and excluding all that were not negative for these two assays. We cannot exclude also the possibility that some false-positive results might be due to the existence of some *Escherichia coli* impurities or epitopes with the recombinant antigen as a result of poor purification, which could promote nonspecific cross-reactions. One such interference caused by nonspecific proteins has already been evaluated in an ELISA using a recombinant antigen and the lack of specificity of the test has been related to protein residues translated from the plasmid vector gene sequence responsible for cross-reactions [20].

The main limitation of this study was the use of two non-treponemal tests as a reference test to recharacterized several samples, which might not have a good correlation with treponemal tests, and the impossibility of using immunofluorescence throughout the serological panel. Thus, the diagnostic performance of recombinant antigens may have been compromised due to the inefficiencies of the reference tests. Another limitation was the impossibility of obtaining clinically well-defined serological samples. Nevertheless, we conclude that despite the low sensitivity values in ELISA, the proteins showed high diagnostic capacity due to the AUC values found. However, an improvement in sensitivity can be achieved when antigenic mixtures are evaluated.

Supporting information

S1 Table. STARD checklist. Standards for the Reporting of Diagnostic Accuracy Studies (STARD) checklist for reporting of studies of diagnostic accuracy. (DOCX)

S2 Table. Reactivity index for by LMA diagnostic performance assessment.
(XLSX)

S3 Table. Reactivity index for by ELISA diagnostic performance assessment.
(XLSX)

S4 Table. Within-run imprecision assessment.
(XLSX)

S5 Table. Reactivity Index for cross-reactivity assessment.
(XLSX)

S1 Text. A list of abbreviation and definition for ROC curve, AUC, 95%CI, RI, sensitivity, specificity, accuracy, CV, SD and CO.
(PDF)

S1 Raw Image. SDS-PAGE stained with coomassie brilliant blue. Recombinant proteins: 1 µg of each antigen was loaded per lane. Antigens are identified below each lane. Different lots of TpN17 and TpN15 were evaluated. “X” indicates lanes not included in the final Fig 1. kDa: Kilodaltons.
(TIF)

Acknowledgments

We express our gratitude to Andris K. Walter for providing English language revision and manuscript copyediting assistance.

Author Contributions

Conceptualization: Ângelo Antônio Oliveira Silva, Ueriton Dias de Oliveira, Marco Aurélio Krieger, Nilson Ivo Tonin Zanchin, Fred Luciano Neves Santos.

Data curation: Ângelo Antônio Oliveira Silva, Fred Luciano Neves Santos.

Formal analysis: Ângelo Antônio Oliveira Silva, Ueriton Dias de Oliveira, Fred Luciano Neves Santos.

Funding acquisition: Fred Luciano Neves Santos.

Investigation: Ângelo Antônio Oliveira Silva, Ueriton Dias de Oliveira, Larissa de Carvalho Medrado Vasconcelos, Leonardo Foti, Fernanda Washington de Mendonça Lima, Fred Luciano Neves Santos.

Methodology: Ângelo Antônio Oliveira Silva, Ueriton Dias de Oliveira, Larissa de Carvalho Medrado Vasconcelos, Ramona Tavares Daltro, Amanda Leitolis, Fred Luciano Neves Santos.

Project administration: Fred Luciano Neves Santos.

Resources: Marco Aurélio Krieger, Nilson Ivo Tonin Zanchin.

Supervision: Fred Luciano Neves Santos.

Validation: Ângelo Antônio Oliveira Silva, Ueriton Dias de Oliveira, Nilson Ivo Tonin Zanchin, Fred Luciano Neves Santos.

Visualization: Ângelo Antônio Oliveira Silva, Fred Luciano Neves Santos.

Writing – original draft: Ângelo Antônio Oliveira Silva, Ueriton Dias de Oliveira, Larissa de Carvalho Medrado Vasconcelos, Leonardo Foti, Leonardo Maia Leony, Ramona Tavares Daltro, Fernanda Washington de Mendonça Lima, Nilson Ivo Tonin Zanchin, Fred Luciano Neves Santos.

Writing – review & editing: Ângelo Antônio Oliveira Silva, Ueriton Dias de Oliveira, Leonardo Maia Leony, Ramona Tavares Daltro, Fernanda Washington de Mendonça Lima, Marco Aurélio Krieger, Nilson Ivo Tonin Zanchin, Fred Luciano Neves Santos.

References

1. Giacani L, Lukehart SA. The endemic treponematoses. *Clin Microbiol Rev.* 2014; 27:89–115. <https://doi.org/10.1128/CMR.00070-13> PMID: 24396138.
2. De Santis M, De Luca C, Mappa I, Spagnuolo T, Licameli A, Straface G, et al. Syphilis infection during pregnancy: fetal risks and clinical management. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2012; 2012: 430585. <https://doi.org/10.1155/2012/430585> Epub 2012 Jul 4. PMID: 22829747.
3. Yu X, Zheng H. Syphilitic chancre of the lips transmitted by kissing: A case report and review of the literature. *Medicine.* 2016; 95(14): e3303. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003303> PMID: 27057901.
4. Epstein E. Extragenital syphilis in physicians. *Calif Med.* 1952; 77(2): 149–150. PMID: 12978898.
5. Zhou P, Qian Y, Lu H, Guan Z. Nonvenereal transmission of syphilis in infancy by mouth-to-mouth transfer of prechewed food. *Sex Transm Dis.* 2009; 36(4): 216–217. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0b013e3181901c79> PMID: 19265744.
6. Oh Y, Ahn S, Hong SP, Bak H, Ahn SK. A case of extragenital chancre on a nipple from a human bite during sexual intercourse. *Int J Dermatol.* 2008; 47(9): 978–980. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2008.03617.x> PMID: 18318701.
7. World Health Organization. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections—2008. WHO Press. 2012. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/75181/9789241503839_eng.pdf?sequence=1
8. LaFond RE, Lukehart SA. Biological basis for syphilis. *Clin Infect Dis.* 2006; 19(1): 29–49. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.29-49.2006> PMID: 16418521.
9. Hook EW. Syphilis. *Lancet.* 2017; 389(10078): 1550–1557. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32411-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32411-4) Epub 2016 Dec 18. PMID: 27993382.
10. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin Infect Dis.* 1995; 8(1): 1–21. PMID: 7704889.
11. Park IU, Fakile YF, Chow JM, Gustafson KJ, Jost H, Schapiro JM, et al. Performance of treponemal tests for the diagnosis of syphilis. *Clin Infect Dis.* 2019; 68(6): 913–918. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy558> PMID: 29986091.
12. Liu W, Deng M, Xiaohong Zhang, Yin W, Zhao T, Zeng T, et al. Performance of novel infection phase-dependent antigens in syphilis serodiagnosis and treatment efficacy determination. *Clin Chim Acta.* 2019; 488: 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.10.017> Epub 2018 Oct 13. PMID: 30326217.
13. Xu M, Xie Y, Jiang C, Xiao Y, Kuang X, Zhao F, et al. A novel ELISA using a recombinant outer membrane protein, rTp0663, as the antigen for serological diagnosis of syphilis. *Int J Infect Dis.* 2016; 43: 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.12.013> Epub 2015 Dec 31. PMID: 26747418.
14. Rourk AR, Nolte FS, Litwin CM. Performance characteristics of the reverse syphilis screening algorithm in a population with a moderately high prevalence of syphilis. *Am J Clin Pathol.* 2016; 146(5): 572–577. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqw182> PMID: 27773873.
15. Sambri V, Marangoni A, Eyer C, Reichhuber C, Soutschek E, Negosanti M, et al. Western immunoblotting with five *Treponema pallidum* recombinant antigens for serologic diagnosis of syphilis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001; 8(3): 534–539. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.3.534-539.2001> PMID: 11329453.
16. Sato NS, Hirata MH, Hirata RD, Zerbini LC, Silveira EP, de Melo CS, et al. Analysis of *Treponema pallidum* recombinant antigens for diagnosis of syphilis by western blotting technique. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1999; 41(2): 115–118. <https://doi.org/10.1590/s0036-46651999000200009> PMID: 10413959.
17. Sun AH, Mao YF, Hu Y, Sun Q, Yan J. Sensitive and specific ELISA coated by TpN15-TpN17-TpN47 fusion protein for detection of antibodies to *Treponema pallidum*. *Clin Chem Lab Med.* 2009; 47(3): 321–326. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2009.071> PMID: 19676144.

18. Xie Y, Xu M, Wang C, Xiao J, Xiao Y, Jiang C, et al. Diagnostic value of recombinant Tp0821 protein in serodiagnosis for syphilis. *Lett Appl Microbiol*. 2016; 62(4): 336–343. <https://doi.org/10.1111/lam.12554> PMID: 26853900.
19. Jiang C, Zhao F, Xiao J, Zeng T, Yu J, Ma X, et al. Evaluation of the recombinant protein TpF1 of *Treponema pallidum* for serodiagnosis of syphilis. *Clin Vaccine Immunol*. 2013; 20(10): 1563–1568. <https://doi.org/10.1128/CVI.00122-13> Epub 2013 Aug 14. PMID: 23945159.
20. Rodríguez I, Alvarez EL, Fernández C, Miranda A. Comparison of a recombinant-antigen enzyme immunoassay with *Treponema pallidum* hemagglutination test for serological confirmation of syphilis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(3): 347–349. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762002000300012> PMID: 12048563.
21. Young H, Moyes A, Seagar L, Mcmillan A. Novel recombinant-antigen enzyme immunoassay for serological diagnosis of syphilis. *J Clin Microbiol*. 1998; 36(4): 913–917. PMID: 9542908.
22. Mo X, Jin Y, Yang Y, Hu W, Gu W. Evaluation of a new chemiluminescence immunoassay for diagnosis of syphilis. *Eur J Med Res*. 2010; 15(2): 66–69. <https://doi.org/10.1186/2047-783x-15-2-66> PMID: 20452886.
23. Smith BC, Simpson Y, Morshed MG, Cowen LLE, Hof R, Wetherell C, et al. New proteins for a new perspective on syphilis diagnosis. *J Clin Microbiol*. 2013; 51(1): 105–111. <https://doi.org/10.1128/JCM.01390-12> PMID: 23100335.
24. Backhouse JL, Nesteroff SI. *Treponema pallidum* western blot: comparison with the FTA-ABS test as a confirmatory test for syphilis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001; 39(1): 9–14. [https://doi.org/10.1016/s0732-8893\(00\)00213-3](https://doi.org/10.1016/s0732-8893(00)00213-3) PMID: 11173185
25. Sambri V, Marangoni A, Simone MAA, Antuono AD, Negosanti M, Cevenini R, et al. Evaluation of recomWell *Treponema*, a novel recombinant antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of syphilis. *Clin Microbiol Infect*. 2001; 7(4): 200–205. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2001.00232.x> PMID: 11422242.
26. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 1983; 166(4): 557–580. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(83)80284-8) PMID: 6345791
27. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0> PMID: 5432063.
28. Fleury MK, Menezes ME, Correa JA. Implementation of the external quality assessment program in Brazil. *Biochemia Medica*. 2017; 27(1): 93–96. <https://doi.org/10.11613/BM.2017.012> PMID: 28392731.
29. Swets JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science*. 1988; 240(4857): 1285–1293. <https://doi.org/10.1126/science.3287615> PMID: 3287615.
30. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977; 33(1): 159–174. PMID: 843571.
31. Fakile YF, Jost H, Hoover KW, Gustafson KJ, Novak-Weekley SM, Schapiro JM, et al. Correlation of treponemal immunoassay signal strength values with reactivity of confirmatory treponemal testing. *J Clin Microbiol*. 2018; 56(1): e01165–17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01165-17> Print 2018 Jan. PMID: 29046410.
32. Gomez E, Jespersen DJ, Harring JA, Binnicker MJ. Evaluation of the Bio-Rad BioPlex 2200 syphilis multiplex flow immunoassay for the detection of IgM- and IgG-class antitreponemal antibodies. *Clin Vaccine Immunol*. 2010; 17(6): 966–968. <https://doi.org/10.1128/CVI.00086-10> Epub 2010 Apr 28. PMID: 20427627.
33. Marangoni A, Nardini P, Foschi C, Moroni A, D'Antuono A, Reggiani LB, et al. Evaluation of the BioPlex 2200 syphilis system as a first-line method of reverse-sequence screening for syphilis diagnosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2013; 20(7): 1084–1088. <https://doi.org/10.1128/CVI.00316-13> Epub 2013 May 22. PMID: 23697575.
34. Cooley GM, Mitja O, Goodhew B, Pillay A, Lammie PJ, Castro A, et al. Evaluation of multiplex-based antibody testing for use in large-scale surveillance for yaws: a comparative study. *J Clin Microbiol*. 2016; 54(5): 1321–1325. <https://doi.org/10.1128/JCM.02572-15> Epub 2016 Mar 9. PMID: 26962086.
35. Mikalová L, Strouhal M, Čejková D, Zobaníková M, Pospíšilová P, Norris SJ, et al. Genome analysis of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* and subsp. *pertenue* strains: most of the genetic differences are localized in six regions. *PLoS One*. 2010; 5(12): e15713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015713> PMID: 21209953.
36. Fujimura K, Ise N, Ueno E, Hori T, Fujii N, Okada M. Reactivity of recombinant *Treponema pallidum* (r-Tp) antigens with anti-Tp antibodies in human syphilitic sera evaluated by ELISA. *J Clin Lab Anal*. 1997; 11(6): 315–322. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2825\(1997\)11:6<#x0003c;315::AID-JCLA1>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2825(1997)11:6<#x0003c;315::AID-JCLA1>3.0.CO;2-4) PMID: 9406049.

37. Gerber A, Krell S, Morenz J. Recombinant *Treponema pallidum* antigens in syphilis serology. *Immunobiology*. 1997; 196(5): 535–549. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(97\)80070-8](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(97)80070-8)
38. Van Voorhis WC, Barrett LK, Lukehart SA, Schmidt B, Schriefer M, Cameron CE. Serodiagnosis of syphilis: antibodies to recombinant Tp0453, Tp92, and Gpd proteins are sensitive and specific indicators of infection by *Treponema pallidum*. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(8): 3668–3674. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.8.3668-3674.2003> PMID: 12904373.
39. Ijsselmuiden OE, Schouls LM, Stolz E, Aelbers GN, Agterberg CM, Top J, et al. Sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay using the recombinant DNA-derived *Treponema pallidum* protein TmpA for serodiagnosis of syphilis and the potential use of TmpA for assessing the effect of antibiotic therapy. *J Clin Microbiol*. 1989; 27(1): 152–157. <https://doi.org/10.1128/JCM.27.1.152-157.1989> PMID: 2643617
40. Ijsselmuiden OE, Beelaert G, Schouls LM, Tank B, Stolz E, van der Groen G. Line immunoassay and enzyme-linked line immunofiltration assay for simultaneous detection of antibody to two treponemal antigens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1989; 8(8): 716–721. <https://doi.org/10.1007/BF01963758> PMID: 2506039.
41. Totten YR, Hardy BM, Bennett B, Rowlinson MC, Crowe S. Comparative performance of the reverse algorithm using Architect Syphilis TP versus the traditional algorithm using rapid plasma reagin in Florida's public health testing population. *Ann Lab Med*. 2019; 39(4): 396–399. <https://doi.org/10.3343/alm.2019.39.4.396> PMID: 30809986.
42. Peng J, Lu Y, Yu H, Wu S, Li T, et al. Analysis of 2 reverse syphilis testing algorithms in diagnosis of syphilis: a large-cohort prospective study. *Clin Infect Dis*. 2018; 67(6): 947–953. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy198> PMID: 30059969.
43. Sanfilippo AM, Freeman K, Schmitz JL. Analytical comparison of the Architect Syphilis TP and Liaison *Treponema* automated chemiluminescent immunoassays and their performance in a reverse syphilis screening algorithm. *J Clin Microbiol*. 2018; 56(8): e00215–18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00215-18> PMID: 29769276.
44. Binnicker MJ. Which algorithm should be used to screen for syphilis?. *Curr Opin Infect Dis*. 2012; 25(1): 79–85. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32834e9a3c> PMID: 22156894.
45. Dunseth CD, Ford BA, Krasowski MD. Traditional versus reverse syphilis algorithms: a comparison at a large academic medical center. *Pract Lab Med*. 2017; 8: 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2017.04.007> PMID: 28856228.
46. Rourk AR, Nolte FS, Litwin CM. Performance characteristics of the reverse syphilis screening algorithm in a population with a moderately high prevalence of syphilis. *Am J Clin Pathol*. 2016; 146(5): 572–577. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqw182> PMID: 27773873.
47. Baião AM, Kupek E, Petry A. Reverse algorithm for syphilis screening more than halved false positive test results in Brazilian blood donors. *Transfus Med*. 2014; 24(1): 64–6. <https://doi.org/10.1111/tme.12095> PMID: 24329733.
48. Hoare R, Thompson KD, Herath T, Collet B, Bron JE, Adams A. Development, characterization and application of monoclonal antibodies for the detection and quantification of infectious salmon anaemia virus in plasma samples using Luminex bead array technology. *PLoS One*. 2016; 11(7): e0159155. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159155> eCollection 2016. PMID: 27434377.
49. Kuller L, Watanabe R, Anderson D, Grant R. 2005. Development of a whole-virus multiplex flow cytometric assay for antibody screening of a specific pathogen-free primate colony. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005; 53(3): 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2005.05.012> Epub 2005 Oct 21. PMID: 16243475.
50. Santos FLN, Celedon PAF, Zanchin NIT, Leitolis A, Crestani S, Foti L, et al. Performance assessment of a *Trypanosoma cruzi* chimeric antigen in multiplex liquid microarray assays. *J Clin Microbiol*. 2017; 55(10): 2934–2945. <https://doi.org/10.1128/JCM.00851-17> Epub 2017 Jul 19. PMID: 28724556.
51. Jacobson RH. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev Sci Tech*. 1998; 17(2): 469–526. <https://doi.org/10.20506/rst.17.2.1119> PMID: 9713892.
52. Christenson RH, Lessig M, Miles G, Luebcke S, Stillions C, Jones P. Evaluation of the Elecsys Syphilis Immunoassay for detection of syphilis in populations at risk of disease in the US and Argentina. *J Appl Lab Med*. 2018; 3(1): 89–99. <https://doi.org/10.1373/jalm.2017.024943>
53. Rostopira N, Tkáčiková L, Rayevska G, Plypylenko V, Mikula I, Spivak M. Elaboration of enzyme immunoassay based on recombinant antigens and intended for diagnostics of syphilis. *Folia Microbiol (Praha)*. 2003; 48(4): 549–553. <https://doi.org/10.1007/bf02931339> PMID: 14533489.
54. Keasey SL, Schmid KE, Lee MS, Meegan J, Tomas P, Minto M, et al. Extensive antibody cross-reactivity among infectious gram-negative bacteria revealed by proteome microarray analysis. *Mol Cell Proteomics*. 2009; 8(5): 924–935. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800213-MCP200> Epub 2008 Dec 27. PMID: 19112181.

55. Zajkowska JM. Antibody-based techniques for detection of Lyme disease: a challenging issue. *Antibody Technology Journal*. 2014; 4: 33–44. <https://doi.org/10.2147/ANTI.S39718>
56. Golkocheva-Markova E, Christova I, Stoilov R, Najdenski H. Cross-reaction between *Yersinia* outer membrane proteins and anti-*Borrelia* antibodies in sera of patients with Lyme disease. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14(9): 873–875. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02051.x> PMID: 18844689.