
**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)**

Amadeo Sáez-Alquézar; ¹ *Denise Albieri*, ² *Regina Helena Castanho Garrini*, ² *Waldelania Pereira Marques*, ¹ *Elaine Antunes de Lemos* ³ e *Adelson Alves* ²

RESUMO

Este estudo constitui uma análise do desempenho do teste sorológico treponêmico ELISA Recombinante Wiener lab. e de seis testes não treponêmicos (Laborclin: VDRL Bras, RPR Brás e RPR TRUST; Wama: VDRL e RPR; Wiener: USR) na triagem sorológica de doadores de sangue. Os resultados repetidamente reagentes (RR) foram confirmados por meio de três testes treponêmicos: FTA abs (Wama), WB (*in house*) e TPHA (bioMérieux). Foram analisadas 2.990 amostras de soro. O teste VDRL (USR), utilizado inicialmente na triagem sorológica, apresentou reatividade em 11 (0,4 %) amostras, com títulos variando de 1/1 até 1/32. Nos demais testes não treponêmicos, observou-se reatividade em um número de amostras que variou de 4 a 14, num total de 20 (0,7 %) amostras das 2.990 analisadas. O teste treponêmico ELISA apresentou resultados RR em 42 (1,4 %) das amostras analisadas, entre as quais 8 (0,3 %) se mostraram reagentes a, pelo menos, um teste não treponêmico. Das 42 amostras RR pelo teste ELISA submetidas aos testes confirmatórios de FTA-abs, TPHA e WB, 9 (21,4 %) foram negativas para os três testes, 8 (19,1 %) foram positivas para WB e TPHA e negativas para o FTA-abs e 25 (59,5 %) foram positivas para os três testes. A especificidade do teste ELISA atingiu 99,7%, considerando-se o WB e o TPHA como confirmatórios. As 12 amostras que apresentaram resultados não reagentes no teste ELISA, mas mostraram algum tipo de reatividade para os testes não treponêmicos, tiveram resultado negativo nos testes confirmatórios utilizados. Mesmo que o descarte de bolsas seja maior quando se utiliza teste treponêmico, essa conduta parece ser a mais segura na triagem sorológica de doadores de sangue.

DESCRIPTORIOS: Sífilis. *Treponema pallidum*. Triagem sorológica. Testes treponêmicos. Testes não treponêmicos.

1 PANEL Assessoria & Controle de Qualidade, São Paulo, Brasil.

2 Laboratório Hemo-Life, São Paulo, Brasil.

3 Laboratório de Soroepidemiologia e Imunologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Brasil.

Endereço para correspondência: Amadeo Saez Alquezar. E-mail: amadeosaez@uol.com.br

Recebido para publicação em: 23/6/2007. Revisto em: 25/8/2007. Aceito em: 2/12/2007.

INTRODUÇÃO

A sífilis é causada pela bactéria *Treponema pallidum* e pode ser classificada segundo os múltiplos estágios do estado de infecção: primária, secundária, latente (recente e tardia) e terciária (15). A carga bacteriana e, conseqüentemente, a infectividade são maiores nos estágios mais recentes: sífilis primária, secundária e latente recente (7). Embora exista tratamento simples e efetivo, até hoje não foi erradicada. É uma doença infecciosa crônica que pode ser transmitida de diferentes maneiras: contato sexual, de mãe para filho e, ocasionalmente, por transfusão de sangue e hemocomponentes, por isso são feitos testes sorológicos na triagem de doadores de sangue para interromper a transmissão. Estes testes são indiretos e podem ser agrupados em duas categorias: treponêmicos e não treponêmicos (cardiolipínicos).

Os não treponêmicos são testes de floculação capazes de detectar anticorpos inespecíficos, chamados *reaginas*, produzidos pelo organismo em resposta a antígenos fosfolipídicos presentes na superfície dos treponemas.

Todos os testes não treponêmicos utilizam como antígeno uma mistura de cardiolipina, colesterol e lecitina. O mais usado é o *Venereal Disease Research Laboratory* (VDRL), desenvolvido em 1946, que se aplica a amostras de líquido e de soro (8). Estas últimas devem ser inativadas a 56°C por trinta minutos.

O *Rapid Plasma Reagin* (RPR) foi desenvolvido em 1957 e se aplica a amostras de soro e plasma. Além da mistura habitual (cardiolipina-colesterol-lecitina), contém cloreto de colina, que dispensa a inativação da amostra; EDTA, que aumenta a estabilidade da suspensão antigênica, e carvão coloidal para permitir a visualização da reação a olho nu.

As modificações do VDRL são o *Unheated Serum Reagin* (USR) e o *Toluidine Red Unheated Serum Test* (TRUST). Ambos contêm tampão colina e EDTA, o que permite que a solução antigênica seja fornecida pronta para uso, sem necessidade de inativação de amostras por calor. O TRUST contém ainda o corante vermelho de toluidina que facilita a leitura final.

Os testes não treponêmicos têm baixo custo e sensibilidade entre 78% e 86% (11) na fase inicial da infecção. Apresentam como inconveniente resultados falso-positivos (RFP) biológicos, podendo também apresentar resultados falso-negativos (RFN) na presença de excesso de anticorpos na amostra analisada (fenômeno de pró-zona). Uma característica importante dos testes cardiolipínicos é que eles permitem acompanhar a terapêutica, visto que apresentam rápida resposta confirmada pela queda de títulos e mesmo pela negatificação. Modificações mais lentas e mesmo inexistentes se observam com os testes treponêmicos (4), os quais detectam a presença de anticorpos anti-*T. pallidum*.

Há métodos de imunofluorescência indireta (*fluorescent treponemal antibody absorption test* - FTA abs), hemaglutinação (*Treponema pallidum* Hemagglutination Assay - TPHA), enzimaímunoensaio (ELISA), *western blotting* (WB) e testes rápidos (partículas de látex ou imunocromatográficos).

O teste de imunofluorescência indireta é realizado após absorção ou bloqueio de anticorpos não específicos, eventualmente presentes no soro com treponemas saprófitas: treponema de Reiter. Possui elevada sensibilidade e especificidade quando comparado a testes não treponêmicos. Pode ser utilizado para a pesquisa de anticorpos das classes IgG e IgM.

A hemaglutinação indireta utiliza hemácias nucleadas de aves, recobertas por componentes antigênicos de *T. pallidum*, desse modo reduz o tempo de sedimentação das hemácias e apresenta sensibilidade e especificidade comparáveis ao teste de FTA-abs.

Os testes imunoenzimáticos utilizam suportes sensibilizados com antígenos totais de *T. pallidum* ou componentes antigênicos do microrganismo obtidos por biologia molecular ou engenharia genética. Os testes treponêmicos não são utilizados para monitorar o tratamento e têm sido pouco usados em procedimentos de triagem, sob a alegação de terem menor sensibilidade do que os não treponêmicos durante as primeiras semanas da infecção. Na verdade, os testes treponêmicos ELISA, que detectam anticorpos das classes IgG e IgM utilizando como frações antigênicas proteínas recombinantes (TpN47, TpN14 e TpN15), têm apresentado elevada sensibilidade, igual ou superior à dos testes não treponêmicos na fase inicial da infecção (12, 24, 25).

O *Western blotting* apresenta elevados índices de especificidade (100%) e sensibilidade (93,8% a 98,5%) (3, 6), sendo sugerido como teste confirmatório para sífilis por sua maior objetividade de leitura (3). O desempenho deste teste para a sífilis é semelhante ao do WB confirmatório para HIV (11, 13). A análise crítica dos resultados obtidos na padronização do método de WB, em todas as suas variáveis para pesquisa de anticorpos anti *T. pallium*, conclui que o WB-IgG apresenta sensibilidade de 100% e especificidade de 99,5%, que não difere dos índices obtidos por outros autores (2, 13, 14).

O FTA abs durante muito tempo foi considerado como teste confirmatório para o diagnóstico da sífilis, mas o WB e o teste ELISA IgM têm melhor sensibilidade. Acredita-se que a utilização adequada dos testes ELISA (IgG + IgM), que utilizam frações antigênicas recombinantes, possa substituir a associação de testes não treponêmicos e treponêmicos para o diagnóstico definitivo da sífilis (16, 17, 26).

Os anticorpos do tipo IgG produzidos contra a infecção por *T. pallidum* podem persistir por toda a vida. Desta forma, os testes ELISA conseguem detectar casos de infecções anteriores, tratadas ou não tratadas, o que leva a um percentual maior de descarte quando utilizados na triagem sorológica.

O objetivo do presente trabalho foi o de comparar o desempenho de testes sorológicos treponêmicos e não treponêmicos numa triagem sorológica para doadores de sangue, confirmando-se os resultados repetidamente reagentes com três testes treponêmicos (FTA abs, WB e TPHA).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram utilizadas, durante o período de março a maio de 2005, 2.990 amostras de soro, provenientes de uma triagem sorológica de doadores de sangue, com faixa etária variando de 18 a 65 anos, sendo 60% do sexo masculino e 40% do sexo feminino (Lab. Hemo-Life). Na triagem sorológica para sífilis, recorreu-se ao teste VDRL (USR) Wiener lab.

Testes sorológicos utilizados

1. Não treponêmicos

Todas as informações referentes aos testes não treponêmicos utilizados constam na Tabela 1.

2. Treponêmicos:

- a) ELISA recombinante, Wiener lab. (lote 408617): antígenos recombinantes Tp15 e Tp17, detecta anticorpos das classes IgG e IgM;
- b) TPHA Hemapallidum, bioMérieux (lote 40405): suspensão de hemácias de aves sensibilizadas com componentes solúveis de *Treponema pallidum*, usando como diluente uma solução PBS 0,01 M e pH 7,2;
- c) *Western blotting, In house*: fitas de nitrocelulose contendo antígenos semipurificados de *T.pallidum*. A positividade do teste foi verificada visualmente pela presença de bandas de proteínas do *T. pallidum* nas regiões Tp15, Tp17 ou Tp47 (13). Foram usados como critérios de interpretação: reação positiva - presença de bandas para qualquer uma das proteínas na região de massa molecular Tp15, Tp17 e Tp47; reação negativa - ausência de bandas na região de massa molecular Tp15, Tp17 e Tp47. O WB utilizado tem 100% de sensibilidade e 99,5% de especificidade;
- d) Imuno com FTA abs, Wama (lote 4038011): lâminas com suspensão de *T. pallidum*; anti gamaglobulina G humana marcada com isotiocianato de fluoresceína; tampão fosfato-salino; glicerina tamponada; solução absorvente (*Treponema cepa Reiter*).

Procedimentos

Para a realização do teste VDRL Bras Laborclin, os soros foram previamente inativados em banho-maria a 56°C por 30 minutos. Para os demais testes treponêmicos e não treponêmicos, eles não foram inativados.

Tabela 1. Características dos testes não treponêmicos utilizados na triagem de 2990 amostras de soros.

Testes não treponêmicos		VDRL			RPR	
Nome comercial	VDRL Brás	VRDRL - USR	VDRL	RPR Brás	RPR TRUST	RPR / Sífilis
Empresa fabricante	Laborclin	Wiener Lab	Wama	Laborclin	Laborclin	Wama
Lotes utilizados	40922008	40814 410553 410542 410553 412712 410592	504026 410091A	40910011 41001003	41202001	403031B
Composição do antígeno	Mistura de cardioliipina, lecitina e colesterol em etanol absoluto. Adicionar a uma Solução de salina Tamponada	Suspensão aquosa de antígeno de cardioliipina e lecitina purificados em tampão fosfato com cloreto de colina e EDTA	Não fornecida	Suspensão antigênica constituída por uma mistura de cardioliipina, lecitina e colesterol, estabilizada em tampão	Suspensão antigênica constituída por uma mistura de cardioliipina, lecitina e colesterol, estabilizada em tampão colina e corada com vermelho de toluidina	Não fornecida
Apresentação	Preparada no momento do uso	Pronta para uso	Pronta para uso	Pronta para uso	Pronta para uso	Pronta para uso
Amostra	Inativada	Sem inativação	Sem inativação	Sem inativação	Sem inativação	Sem inativação
Leitura final	Microscópio (10 X)	Microscópio (10 X)	Microscópio (10 X)	Microscópio (10 X)	Olho nu	Microscópio (10 X)

Na realização dos testes não treponêmicos, foi usado um agitador orbital do tipo Klein, pelo tempo descrito por cada fabricante.

Para o teste ELISA, foram utilizados equipamentos básicos: lavadora de microplacas Tecan, estufa Solidef C2 e leitora de microplacas Tecan Spectra.

Após a triagem sorológica, que incluía o teste de VDRL (USR) Wiener lab., as 2.990 amostras foram analisadas pelo teste treponêmico ELISA rec. Wiener lab. e pelos testes não treponêmicos (VDRL e RPR).

Com todas as amostras inicialmente reagentes (IR) pelo teste treponêmico ELISA foi repetido o teste.

As amostras IR pelos testes não treponêmicos, incluindo o VDRL da triagem, foram tituladas de acordo com as especificações contidas nas instruções técnicas de cada *kit*. Todas as amostras com resultados repetidamente reagentes (RR) também foram analisadas pelos testes treponêmicos FTA abs, *western blotting* e TPHA.

RESULTADOS

Num total de 2.990 amostras estudadas, observou-se reatividade em 54 (1,8 %). Essa resposta deveu-se aos testes treponêmicos ou não treponêmicos feitos isoladamente ou com a associação de ambos (Tabela 2).

Testes não treponêmicos

Observou-se reatividade para os testes não treponêmicos em 20 (0,6 %) das 2.990 amostras analisadas, entre elas 12 (0,4 %) foram reagentes somente para os não treponêmicos e 8 (0,3 %) também para os testes treponêmicos.

O teste VDRL (USR) Wiener lab., utilizado na triagem sorológica, apresentou reatividade em 11 (0,4 %) das 2.990 amostras, com títulos variando de 1/1 até 1/32.

Os demais testes não treponêmicos utilizados apresentaram reatividade em um número de amostras que variou de 4 a 14.

A distribuição desses resultados pode ser visualizada na Tabela 3.

Testes treponêmicos

1. Teste ELISA Recombinante Wiener lab.

Apresentou resultado inicialmente reagente em 52 (1,7 %) das 2.990 amostras analisadas e repetidamente reagente em 42 (1,4 %). Em 34 (1,1 %) dessas amostras se observou reatividade apenas para o teste ELISA e, em 8 (0,3 %), houve também reatividade a pelo menos um teste não treponêmico (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados obtidos com os testes treponêmicos e não treponêmicos em 2.990 amostras de doadores de sangue.

		Não Treponêmicos													
		Treponêmicos						Não Treponêmicos							
ELISA	FTA-abs	WB	HAI	VDRL	USR	USR	USR	TRUST	USR	RPR	N			%	
Wiener	Wama	In House	bioMérieux	Laborclin	Wiener	Wama	Laborclin	Laborclin	Laborclin	Wama		Wama			
Reag.	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	9	NR	NR	0,30	
Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	18	NR	NR	0,60	
Reag.	NR	Reag.	Reag.	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	7	NR	NR	0,23	
Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	2	Reag.	Reag.	0,07	
Reag.	NR	Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	1	Reag.	Reag.	0,03	
Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	NR	Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	1	Reag.	Reag.	0,03	
Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	NR	Reag.	Reag.	2	NR	NR	0,07	
Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	NR	NR	NR	NR	NR	NR	1	NR	NR	0,03	
Reag.	Reag.	Reag.	Reag.	NR	Reag.	Reag.	NR	NR	Reag.	NR	1	Reag.	NR	0,03	
NR	NR	NR	NR	NR	Pos	NR	NR	NR	NR	NR	1	NR	NR	0,03	
NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Reag.	NR	2	NR	NR	0,07	
NR	NR	NR	NR	Reag.	Reag.	Reag.	NR	NR	Reag.	NR	2	NR	NR	0,07	
NR	NR	NR	NR	Reag.	Reag.	NR	NR	NR	NR	NR	1	NR	NR	0,03	
NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Reag.	Reag.	NR	NR	1	NR	NR	0,03	
NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Reag.	NR	NR	5	NR	NR	0,17	
NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	2936	NR	NR	98,19	
Total											2990	NR	100,0		

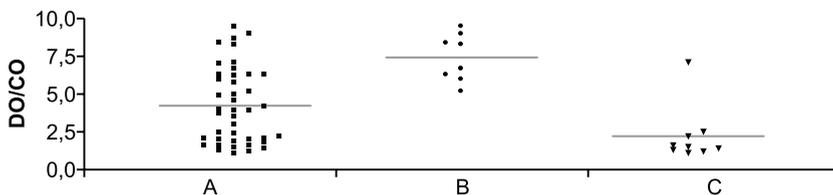
Reag.: Reagente; NR: Não reagente

Tabela 3. Títulos observados em 20 amostras para os testes não treponêmicos.

Amostras	VDRL				RPR	
	Laborclin	Wiener (USR)	Wama (USR)	Laborclin Bras (USR)	Laborclin (TRUST)	Wama
1	1/4	1/32	1/8	1/8	1/2	1/4
2	1/2	1/4	1/2	Reagente	Reagente	1/2
3	1/2	1/4	1/2	1/2	1/4	1/2
4	NR	1/8	1/8	1/4	1/2	1/2
5	1/2	1/2	1/2	1/1	NR	NR
6	1/1	1/1	1/1	1/1	NR	NR
7	1/2	1/2	1/1	1/1	NR	NR
8	1/1	1/1	1/1	1/1	NR	NR
9	NR	1/1	1/1	1/1	NR	NR
10	1/1	1/2	NR	NR	NR	NR
11	1/1	NR	NR	NR	NR	NR
12	1/1	NR	NR	NR	NR	NR
13	1/1	NR	NR	NR	NR	NR
14	1/1	NR	NR	NR	NR	NR
15	1/1	NR	NR	NR	NR	NR
16	1/1	NR	NR	NR	NR	NR
17	NR	NR	NR	1/1	NR	NR
18	NR	NR	NR	1/1	NR	NR
19	NR	1/1	NR	NR	NR	NR
20	NR	NR	NR	NR	1/1	NR
Total	14	11	9	11	5	4

NR: Não Reagente; Reagente: Material insuficiente para titulação

Para as amostras reagentes pelo teste ELISA, a relação DO/CO variou de 1,1 até 9,5 nas amostras reagentes para os testes treponêmicos; para os não treponêmicos, de 5,2 a 9,5 e, nas amostras reagentes apenas para o teste ELISA, de 1,1 a 2,5 com exceção de uma com relação 7,1 (Figura 1).



A: Total de amostras ELISA repetidamente reagentes.

B: Amostras ELISA reagentes, TPHA e WB reagentes e testes não treponêmicos reagentes. (n=8)

C: Amostras somente ELISA reagentes. WB, TPHA e testes não treponêmicos não reagentes (n=9)

Figura 1. Valores da relação DO/CO observados em 42 amostras repetidamente reagentes para o teste treponêmico ELISA rec (IgG/IgM) Wiener Lab.

A especificidade do teste ELISA utilizando como testes confirmatórios WB e TPHA, foi 99,7% (IC 95%: 99,4 – 99,9%). [Vassarstats clinical calculator 1. Intervalo de Confiança de 95%, calculado de acordo com o efficient-score method (<http://faculty.vassar.edu/lowry/clin1.html>)].

2. Testes FTA abs, Western blotting e TPHA

As 42 amostras RR pelo teste ELISA foram submetidas aos testes FTA abs, WB e TPHA, entre elas 9 (21,4 %) foram negativas para os três testes, 8 (19,1 %) foram positivas para o WB e TPHA e negativas para o FTA abs e 25 (59,5 %) foram positivas para os três testes (Figura 2). As 12 amostras que apresentaram resultados não reagentes no teste ELISA, mas mostraram algum tipo de reatividade para os testes não treponêmicos, tiveram resultado negativo nos testes de FTA abs, WB e TPHA (Tabela 2).

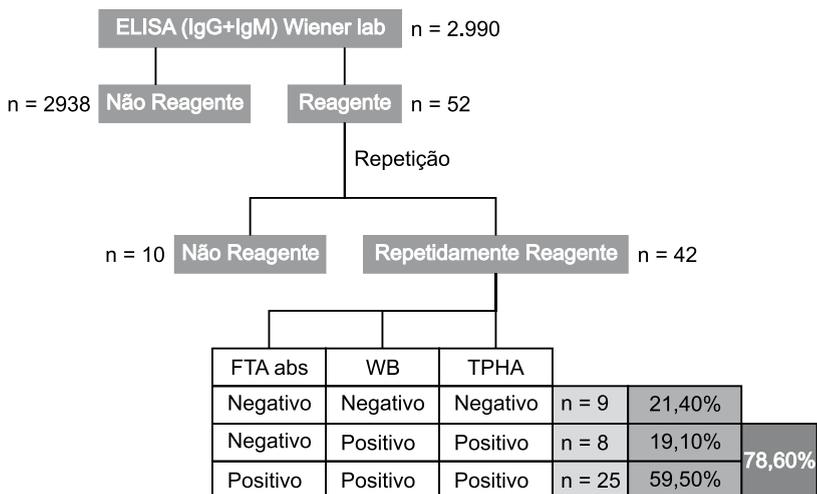


Figura 2. Algoritmo utilizado para confirmar as amostras repetidamente reagentes no teste ELISA (IgG+IgM) aplicado em 2990 amostras de doadores de sangue.

No teste de WB, de 33 amostras 26 (78,8 %) apresentaram as bandas TpN15 e TpN47; 4 (12,1 %), as bandas TpN15, TpN17 e TpN47; 1 (3,0 %), a banda TpN15 e 2 (6,0 %), a banda TpN47. Em nenhuma amostra foi observada a presença isolada do conjunto de bandas TpN15 e TpN17 ou TpN17 e TpN47, ou somente a banda TpN17 (Figura 3).

DISCUSSÃO

A triagem sorológica para sífilis em doadores de sangue vem sendo realizada desde a década de 1950. Na maioria dos países as recomendações oficiais não especificam que tipo de teste sorológico deve ser empregado.

Alguns autores acreditam ser desnecessária essa triagem porque o *Treponema pallidum* se torna inviável depois de 72 horas que as bolsas contendo citrato foram armazenadas em temperatura de 4° a 8°C. Parece que o tempo de inativação do treponema, nessas condições, depende da carga bacteriana, ou seja, quanto maior a carga, maior precisaria ser o tempo de estocagem, podendo chegar até cinco dias (10, 21, 22, 23).

O argumento de que a triagem sorológica para sífilis poderia corresponder também a um marcador indireto para prevenir a transmissão transfusional do HIV foi desconsiderado no final dos anos 90 (9).

Apesar dessas considerações, de não ter sido detectado nenhum caso de transmissão transfusional desde 1966 (5) e de não ter sido confirmada a presença do DNA do *T. pallidum* em amostras positivas e confirmadas de doadores de sangue (16), até hoje a maioria dos países continua realizando a triagem sorológica para sífilis em doadores de sangue (20).

No caso das plaquetas, cujo prazo para a utilização é menor, a concentração de citrato é mais baixa e a temperatura de armazenamento é de 22° C, portanto o risco de transmissão é maior.

No Brasil, é obrigatório o uso de um teste sorológico na triagem de doadores (1), não havendo especificação quanto ao tipo de teste, se treponêmico ou não treponêmico. A grande maioria dos serviços de hemoterapia utiliza um teste não treponêmico (VDRL, RPR) por dois fatores: menor custo e menor percentual de descarte de bolsas.

No presente trabalho fica evidente que o descarte de 11 (0,4 %) amostras do total de 2.990, devido à utilização do teste não treponêmico VDRL (USR) utilizado na triagem, foi inferior à reatividade observada com o teste treponêmico ELISA - 42/2.990 (1,4 %). Na verdade, os testes treponêmicos conseguem detectar casos de infecções passadas e tratadas.

É importante assinalar que, quando foram realizados os cinco testes não treponêmicos adicionais nas 2.990 amostras de soro, os resultados observados mostraram-se discrepantes. Em 20 amostras houve reatividade a pelo menos um dos testes e apenas três foram reagentes para todos os testes não treponêmicos empregados.

O número de amostras reagentes em cada um dos testes não treponêmicos variou de 4 (0,1 %) a 14 (0,5 %), conforme mostra a Tabela 3. Com exceção das três amostras nas quais se verificou reatividade em todos os testes não treponêmicos e de uma amostra que mostrou reatividade em todos menos um (5/6), com títulos variando de 1/2 até 1/32, nas demais amostras os títulos observados foram baixos

(1/1 e 1/2) e o teste ELISA foi não reagente, o que sugere que poderiam ser resultados falso-positivos biológicos.

Com base nesses dados, podemos dizer que o percentual de bolsas descartadas na triagem sorológica para sífilis, quando se utiliza um teste não treponêmico, será uma consequência direta do teste utilizado. Cabe também destacar que os testes não treponêmicos são de leitura visual, conseqüentemente subjetiva, cuja interpretação pode variar de operador a operador e, além disso, não podem ser automatizados, o que dificulta a utilização em grandes rotinas de triagem sorológica de doadores.

Dentre as 42 amostras que apresentaram reatividade no teste treponêmico ELISA, 9 não foram confirmadas por nenhum dos demais testes treponêmicos (FTA abs, WB e TPHA) e também foram não reagentes para todos os testes não treponêmicos, o que sugere serem estes resultados falso-positivos. As outras 33 amostras ELISA RR foram confirmadas pelo WB e pela TPHA, mas apenas 25 foram reagentes também pelo FTA abs. Assim, 8 amostras RR pelo ELISA e confirmadas pelo WB e pelo TPHA, foram não reagentes pelo FTA abs. Entre essas, sete foram negativas para os testes não treponêmicos, mas uma amostra foi reagente para todos os testes não treponêmicos, com títulos variando entre 1/2 e 1/4, o que levanta um questionamento sobre a utilização do FTA abs como teste confirmatório para infecção (passada ou recente) pelo *T. pallidum*.

O teste de FTA abs, que possui índices elevados de sensibilidade e especificidade quando comparado com testes não treponêmicos, tem sido recomendado como teste confirmatório para a sorologia da sífilis, mesmo sendo um teste manual e de leitura subjetiva que depende da interpretação do operador. Essa recomendação aceita e reforçada pelo *Center for Diseases Control, USA (CDC)*, faz com que algumas amostras com resultado positivo pelos demais testes treponêmicos não sejam confirmadas como reagentes. Isso se deve ao fato de os testes de TPHA e ELISA apresentarem maior sensibilidade que o FTA abs (11, 19).

Considerando como testes confirmatórios o WB ou o TPHA (n = 33), nas 42 amostras ELISA RR, a especificidade do teste ELISA foi de 99,7%. Se considerássemos como positivas as amostras confirmadas pelo FTA abs (n = 25), a especificidade seria de 99,4%. Esses dados estão bem próximos dos valores encontrados (E = 99,5%) em publicação anterior, na qual foi feita uma avaliação do teste ELISA Recombinante Wiener lab (18).

Os resultados das amostras reagentes para o teste ELISA mostram que, nas amostras reagentes também para o WB e TPHA e para os testes não treponêmicos, existe uma tendência para valores mais altos da relação DO/CO do que nas amostras reagentes apenas para o teste ELISA. Todavia um dos valores (7,2) mostrou sobreposição, o que impede que seja considerado apenas o valor da relação DO/CO para se prever a positividade da amostra.

A discrepância observada quando se utilizam testes não treponêmicos de marcas diferentes levanta um questionamento quanto à sua utilização em

procedimentos de triagem sorológica de doadores de sangue. Por outro lado, o teste ELISA (IgG+IgM) acaba sendo responsável por um número maior de amostras reagentes (1,4 %). Em parte, esse aumento se deve não só ao fato de que os testes treponêmicos conseguem detectar casos de infecções passadas e tratadas, mas também à especificidade do teste (99,6%), que contribui para o aparecimento de resultados falso-positivos. É importante levar em consideração que, no presente estudo, todas as amostras confirmadas como positivas foram ELISA RR, não tendo sido confirmada nenhuma amostra RR apenas para os testes não treponêmicos. Uma alternativa seria utilizar, concomitantemente, um teste não treponêmico e um treponêmico na triagem sorológica de doadores, mas isso representaria um custo adicional de reagentes e um descarte maior de bolsas. Outra opção seria utilizar um teste ELISA (IgG+IgM) neste tipo de triagem. As amostras que fossem RR seriam submetidas a um teste confirmatório WB ou TPHA. Dados recentes da literatura mostram que o FTA abs apresenta menor sensibilidade na sífilis primária e terciária quando comparado ao TPHA e WB (14).

AGRADECIMENTOS

Expressamos nossos agradecimentos aos laboratórios Laboreclin, Wama, bioMérieux e Wiener, por terem cedido os *kits* utilizados neste trabalho, e ao Laboratório Hemo-Life, por ter permitido o uso de suas instalações.

ABSTRACT

Evaluation of serological tests for syphilis, treponemal (ELISA) and non-treponemal (VDRL and RPR), in blood donors serological screening: confirmation of results by three treponemal tests (FTA ABS, WB and TPHA)

The treponemal ELISA recombinant IgG+IgM test (Wiener laboratory) and another six non-treponemal tests [VDRL Brás, RPR Brás and RPR TRUST (Laborclin); VDRL and RPR (Wama); and USR (Wiener)] for use in serological screening of blood donors were evaluated. The samples that showed repeatedly reactive results (RRR) were submitted to three confirmatory tests: FTA abs (Wama), WB (in house) and TPHA (bioMérieux). A total of 2,990 sera samples were analyzed. The VDRL (USR) test, which was the first one used, showed reactivity in 11 (0.4%) samples with titers ranging from 1:1 to 1:32. Of the 2,990 samples analyzed, 20 (0.7%) were reactive to at least one of the other non-treponemal tests, with the different kits identifying from 4 to 14 of these as reactive. Forty-two (1.4%) of the samples analyzed were repeatedly reactive (RR) in the treponemal ELISA test, and 8 (0.3%) of these had been reactive in at least one non-treponemal test. Of the samples that were repeatedly reactive in the ELISA test and had been submitted to the confirmatory tests (FTA abs, WB and TPHA), 9 (21.4%) were negative in all the confirmatory tests, 8 (19.1%) were positive for WB and TPHA but negative for FTA

abs, and 25 (59.5%) were positive for all three tests. The specificity of the ELISA test was 99.7% using WB and TPHA as confirmatory tests. Twelve samples that were not reactive in the ELISA test but that showed some kind of reactivity for the non-treponemal tests yielded a negative result in the confirmatory tests. Even though more blood units are discarded when treponemal tests are used, this procedure may be considered safer for the serological screening of blood donors.

KEY WORDS: Syphilis. *Treponema pallidum*. Serological screening. Treponemal tests. Non-treponemal tests.

REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 153 de 14 de junho de 2004. Entra em vigor a partir da data de publicação, ficando revogada a RDC nº 343 de 13 de dezembro de 2002. Diário Oficial de União. Brasília, 14 de junho de 2004.
2. Backhouse JL, Nesteroff SI. *Treponema pallidum* western blot: comparison with the FTA abs test as a confirmatory test for syphilis. *Diagn Microbiol Infect Diagn* 39: 9-14, 2001.
3. Byrne RE, Laska S, Bell M, Larson D, Phillips J, Todd J. Evaluation of a *Treponema pallidum* Western Immunoblot Assay as a Confirmatory Test for Syphilis. *J Clin Microb* 30: 115-122, 1992.
4. Camargo ME. Sífilis. In: Ferreira AW, Ávila SLM. *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*. 2º ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 2001. p.215-220.
5. Chambers RW, Foley HT, Schmitdt PJ. Transmission of syphilis by fresh blood components. *Transfusion* 9:32-34, 1969.
6. Dettori G, Grillo R, Mora G, Cavalli A, Alenovi A, Chezzi C, Sanna A. Evolution of western immunoblotting technique in the serological diagnosis of human syphilitic infections. *Eur J Epidemiol* 5: 22-30, 1989.
7. Egglestone SI, Turner AJ. Serological diagnosis of syphilis. PHLS Syphilis Serology Working Group. *Commun Dis Public Health* 3: 158-162, 2000.
8. Harris A, Rosemberg AA, Del Vecchio ER. The VDRL slide micro flocculation test for syphilis using cardiolipin - lecithin antigen. *J Vener Dis Inform* 29: 313-316, 1948.
9. Herrera GA, Lackritz EM, Janssen RS, Raimondi VP, Dodd RY, Aberle-Grasse J, Petersen LR. Serological test for syphilis as a surrogate marker for human immunodeficiency virus infection among United States blood donors. *Transfusion* 37: 836-840, 1997.
10. Kolmer JA. A note on the survival of *Treponema pallidum* in preserved citrated human blood and plasma. *Am J Syph Gonorrhea Vener Dis* 26: 156-158, 1942.
11. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin Microbiol Rev* 8: 1-21, 1995.
12. Lefevre JC, Bertrand MA, Bauriaud R. Evaluation of the Captia enzyme immunoassay for detection of immunoglobulins G and M to *Treponema pallidum* in syphilis. *J Clin Microbiol* 28: 1704-1771, 1990.
13. Lemos EA. Diagnóstico de laboratório da sífilis adquirida e congênita e definição das fases clínicas da doença por western-blotting. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2002. 95 p.
14. Lemos EA, Belém ZR, Santos A, Ferreira AW. Characterization of the Western blotting IgG reactivity patterns in the clinical phases of acquired syphilis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 58: 177-183, 2007.

15. Norris SJ, Larsen SA. Treponema and other host-associated spirochetes. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover FC, Tenover FC (eds.). *Manual of clinical microbiology*. 6ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 1995. p.636-651.
16. Orton SL, Liu H, Dodd RY and Williams AE. Prevalence of circulating treponema pallidum DNA and RNA in blood donors with confirmed-positive syphilis tests. *Transfusion* 42: 94-99, 2002.
17. Peeling WR, YE Htun. Diagnostic tools for preventing and managing maternal and congenital syphilis: an overview. *Bull World Health Organ* 82: 439-446, 2004.
18. Sáez-Alquézar A, Marques WP, Botini MB, Alves A. Avaliação de um kit (protótipo) ELISA para detecção de anticorpos anti-*Treponema pallidum*. *NewsLab* 73: 122-128, 2005.
19. Schmidt BL, Edjlalipour M, Lurger A. Comparative evaluation of nine different enzyme-linked immunosorbent assay for determination of antibodies against *Treponema pallidum* in patients with primary syphilis. *J Clin Microbiol* 38: 1279-1282, 2000.
20. Schmidt PJ. Syphilis, a disease of direct transfusion. *Transfusion* 41:1069-1071, 2001.
21. Turner TB, Discker TH. Duration of infectivity of *Treponema pallidum* in citrated blood stored under conditions in blood banks. *Bull John Hopkins Hosp* 68: 269-279, 1941.
22. Van der Sluis JJ, Onvlee PC, Kothe FC, Vuzevski VD, Aelbers GM, Menke HE. Transfusion syphilis, survival of *Treponema pallidum* in donor blood. I. Report of an orientating study. *Vox Sang* 47: 197-204, 1984.
23. Van der Sluis JJ, ten Kate FJ, Vuzevski VD, Kothe FC, Aelbers GM, Van Eijr RV. Transfusion syphilis survival of *Treponema pallidum* in stored donor blood. II. Dose dependence of experimentally determined survival times. *Vox Sang* 49: 390-399, 1985.
24. Young H, Aktas G, Moyes A. Enzywell recombinant enzyme immunoassay for the serological diagnosis of syphilis. *Int J STD AIDS* 11: 288-291, 2000.
25. Young H, Moyes A, Seagar L, McMillan A. Novel recombinant antigen enzyme immunoassay for the serological diagnosis of syphilis. *J Clin Microbiol* 36: 913-917, 1998.
26. Young H. Guidelines for serological testing for syphilis. *Sex Transm Infect* 76: 403-405, 2000.