



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS PROFISSIONAL

**ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS TREPONÊMICOS E NÃO
TREPONÊMICOS PARA A TRIAGEM SOROLÓGICA DE SÍFILIS EM DOADORES
DE SANGUE ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO HEMOPA**

RICARDO AUGUSTO DE BARROS DOMINGUES.

Belém - Pará
2018

RICARDO AUGUSTO DE BARROS DOMINGUES

**ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS TREPONÊMICOS E NÃO
TREPONÊMICOS PARA A TRIAGEM SOROLÓGICA DE SÍFILIS EM DOADORES
DE SANGUE ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO HEMOPA**

Artigo científico apresentado para Defesa de Mestrado do Curso de Mestrado ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas Profissional do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Renata Bezerra Hermes de Castro

Belém - Pará
2018

RICARDO AUGUSTO DE BARROS DOMINGUES

**ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS TREPONÊMICOS E NÃO
TREPONÊMICOS PARA A TRIAGEM SOROLÓGICA DE SÍFILIS EM DOADORES
DE SANGUE ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO HEMOPA**

Artigo apresentado para Exame de Defesa do Curso de Mestrado ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas Profissional do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Renata Bezerra Hermes de Castro
Fundação HEMOPA.

Banca Examinadora: Prof^ª Dr^ª Jacqueline Cortinhas Monteiro
Laboratório de Virologia, ICB-UFPA

Prof^ª Dr^ª Núbia Caroline Costa de Almeida
Fundação HEMOPA.

Prof. Dr. Carlos Eduardo de Melo Amaral
Fundação HEMOPA.

Prof^ª. Dr^ª. Lucimar Di Paula dos Santos Madeira (Suplente)
Laboratório de Microbiologia, ICB-UFPA

Belém, 05 de junho de 2018.

SUMÁRIO

	RESUMO.....	5
1	ABSTRACT.....	6
2	INTRODUÇÃO.....	6
3	METODOLOGIA.....	9
3.1	ASPETOS ÉTICOS.....	9
3.2	POPULAÇÃO ESTUDADA.....	9
3.3	SELEÇÃO DE AMOSTRAS.....	10
3.4	REALIZAÇÃO DOS TESTES SOROLÓGICOS.....	10
3.4.1	Teste Não Treponêmico.....	10
3.4.2	Imunoensaio Quimioluminescência.....	por 10
3.4.3	Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	11
3.5	ANÁLISES DOS DADOS.....	11
4	RESULTADOS.....	12
5	DISCUSSÃO.....	15
	.	
6	CONCLUSÃO.....	18
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
	ANEXO A	22
	ANEXO B	24

**COMPARATIVE ANALYSIS OF TREPONEMIC AND NON TREPONEMIC
METHODS FOR SYPHILIS SOROLOGY SCORING IN BLOOD DONORS
ATTENDED AT THE HEMOPA FOUNDATION**

Ricardo Augusto de Barros Domingues¹

Renata Bezerra Hermes de Castro²

1. Mestrando no programa de Análises Clínicas Profissional – Universidade Federal do Pará.
2. Orientadora no programa de Análises clínicas Profissional Universidade Federal do Pará, Doutora em Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários, Assessora técnica do Núcleo de Ensino e Pesquisa – Fundação Hemocentro do Pará.

RESUMO

A sífilis é uma doença sexualmente transmissível, causada pela bactéria *Treponema pallidum*, mundialmente endêmica com maior incidência em países subdesenvolvidos. Apresenta-se por característica de sinais e sintomas o cancro duro e é classificada em várias fases de evolução: sífilis primária, latência, secundária e terciária. Há preocupação na transmissão da sífilis por transfusões sanguíneas, acarretando em esforços para minimizar cada vez mais esse risco. A Portaria de consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017 do Ministério da Saúde, anexo IV, diz que a triagem de sífilis deve ser realizada através da detecção de anticorpo treponêmico ou não treponêmico, não determinando um teste padrão para a triagem, deixando á critério de cada hemocentro a escolha da metodologia. Não há unanimidade sobre qual dos testes é o mais adequado/seguro para a triagem de sífilis em doadores de sangue. O objetivo deste trabalho foi comparar diferentes métodos de triagem de sífilis em banco de sangue, avaliando vantagens e desvantagens. Foram testadas 64 amostras de proficiência positivas, 114 amostras de proficiência negativas e 381 amostras aleatórias da rotina do banco de sangue do HEMOPA por *Rapid Test Reagin* e Quimioluminescência, e ELISA nas amostras positivas para quimioluminescência do grupo das aleatórias. Do total de 381 amostras aleatórias, cinco tiveram resultado discordante entre os testes treponêmicos e não treponêmicos, podendo representar cicatriz sorológica ou início de infecção. Faz-se necessário a realização de mais estudos que avaliem as diferentes metodologias, visando à segurança transfusional aliada com a realidade orçamentária dos bancos de sangue brasileiros.

Palavras-chave: **Sífilis Latente. *Treponema pallidum*. Banco de sangue. Diagnóstico. Sorologia.**

ABSTRACT

Syphilis is a sexually transmitted disease caused by the world-endemic *Treponema pallidum*, bacterium with a higher incidence in underdeveloped countries. It is characterized by signs and symptoms of hard cancer and is classified into several stages of evolution: primary syphilis, latency, secondary and tertiary. There is concern in the transmission of syphilis by blood transfusions, leading in efforts to minimize this risk more and more. Ministry of Health Consolidation Ordinance No. 5, dated September 28, 2017, Annex IV, says that screening for syphilis must be done by detecting treponemal or non-treponemal antibody, not determining a standard screening test, leaving at the discretion of each hemocenter the choice of methodology. There is no unanimity on which of the tests is the most appropriate / safe for screening for syphilis in blood donors. The aim of this study was to compare different methods of blood bank syphilis screening, assessing advantages and disadvantages. Sixty-four positive proficiency samples, 114 negative proficiency samples and 381 random samples from the routine of the HEMOPA blood bank by Rapid Test Reagin and Chemiluminescence, and ELISA in the chemiluminescent positive samples from the random group were tested. From the total of 381 random samples, five had discordant results between treponemic and non-treponemic tests, which could represent serological scar or onset of infection. It is necessary to carry out more studies that evaluate the different methodologies, aiming at the transfusion security allied with the budgetary reality of the Brazilian blood banks.

Keywords: **Syphilis, Latent. *Treponema pallidum*. Blood Banks. Diagnosis. Serology.**

Ricardo Augusto de Barros Domingues.

Av. Gov. José Malcher, n. 1701, AP. 1504 – Nazaré.

66060-230 – Belém-PA – Brasil.

(55 91) 98207-3433.

ricardodomingues04@gmail.com

Doi:

Introdução

A sífilis é uma doença infectocontagiosa de caráter sistêmico e se não tratada, com curso crônico^{1,2}. Tem um grande impacto na saúde da população podendo deixar sequelas irreparáveis², estando presente em todos os continentes do mundo com estimativa de 12 milhões de novos casos por ano³. É causada pela bactéria *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* pertencente à ordem *Spirochaetales*, família *Spirochaetaceae* e gênero *Treponema*⁴. É uma infecção sexualmente transmissível (IST), para a qual não há vacina atualmente disponível e a infecção não confere imunidade á infecções subsequentes². Além da transmissão horizontal por relação sexual, a doença pode ainda ser transmitida por transfusão sanguínea, e também verticalmente, resultando na sífilis congênita^{3,5,6,7}.

A transmissão através de transfusão de sangue e/ou hemocomponentes contaminados diminuiu drasticamente, a partir da obrigatoriedade de triagem para sífilis em bancos de sangue desde o ano de 1989, e nos dias atuais a sífilis raramente é transmitida através de transfusão de sangue⁸. A redução de transmissão de sífilis por transfusão se deve ainda, além da triagem laboratorial, ao fato de que a bactéria *T. pallidum* é inativada nas bolsas de hemocomponentes estocadas em refrigeração⁹. Entretanto o risco existe, principalmente em transfusão de plaquetas as quais são estocadas em temperatura ambiente, caso ocorra algum caso não detectado na triagem laboratorial¹⁰.

No Brasil, de acordo com a Portaria de consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017 do Ministério da Saúde, anexo IV¹¹, pode-se realizar para triagem laboratorial de sífilis em bancos de sangue tanto testes treponêmicos quanto não treponêmicos, ficando a critério de cada hemocentro. Nos Estados Unidos, recomenda-se a utilização de um teste não treponêmico, sendo o VDRL e o RPR os mais utilizados para a triagem nos hemocentros e em casos de reações, utiliza-se um teste treponêmico para confirmação¹². No entanto, alguns autores defendem que os testes não treponêmicos não são viáveis para grandes rotinas, por serem manuais e ainda há a subjetividade nos resultados, por tanto, a sua utilização vem diminuindo nos hemocentros¹³.

Os testes laboratoriais treponêmicos consistem em detectar anticorpos específicos, IgG e IgM contra o agente e/ou o próprio agente; como por exemplo o ELISA, que é um teste com custo mais elevado em relação aos testes não treponêmicos e necessita de um profissional mais qualificado, no entanto tem a possibilidade de automação, necessitando apenas alguns processos manuais; a quimioluminescência que é um teste totalmente automatizado e com custo mais elevado; e o Teste de absorção de anticorpos treponêmicos fluorescente (FTA-abs), que é o teste padrão ouro para sífilis, porém necessita de profissional altamente qualificado

para a leitura do teste^{2,3,8,13}. Os testes não treponêmicos, baseiam-se na detecção de anticorpos anticardiolipina, que é um constituinte da membrana interna de mitocôndrias de plantas e mamíferos, e também da membrana externa de vários microrganismos como o *Treponema pallidum*, que é reconhecido pelo sistema imunológico humano como um antígeno estranho, o qual estimula a produção de anticorpos anticardiolipínicos. Contudo, a cardiolipina não é específica do *Treponema pallidum*, de modo que existem outras patologias que resultam na produção desses anticorpos, como em algumas outras infecções bacterianas, infecções virais, doenças autoimunes, algumas protozooses, gravidez e utilização de algumas drogas, entre outros. Os testes *Venereal Disease Research Laboratory* (VDRL), *Unheated Serum Reagin* (USR) e o *Rapid Test Reagin* (RPR), constituem exemplos destes testes, necessitando de um cuidado especial com o efeito prozona, mesmo que raro, acarretando em resultado negativo por conta de um alto índice de cardiolipina no soro, devendo-se testar as amostras sem diluição e com diluição de 1/8 para eliminar a possibilidade do efeito prozona^{11,13,14,15}. Os testes treponêmicos tem a vantagem de serem mais específicos que os não treponêmicos e apresentarem positividade mesmo antes do aparecimento de lesões, no entanto são mais onerosos e uma vez que a infecção tenha ocorrido, estes testes sempre apresentarão resultados reagentes, ainda que o paciente já tenha sido tratado e curado, devido a cicatriz sorológica, sendo assim, tornam-se inviáveis para o acompanhamento de tratamentos. Segundo a Portaria de n. 3.242, de 30 de dezembro de 2011¹⁶, todo resultado reagente para sífilis deve ser confirmado por meio de testes confirmatórios, preferencialmente com a mesma amostra, para que o resultado seja liberado^{2,10,15,16}.

Segundo Baião et al. (2013), em alguns hemocentros se utiliza algoritmo reverso, realizando-se antes um teste treponêmico específico, como o ELISA/Quimioluminescência e depois confirmada com um não treponêmico como o VDRL/RPR, e resultou em uma diminuição de 57,8% dos casos falso-positivos e um aumento de 84% na confirmação sorológica para sífilis. Nos testes não treponêmicos há uma maior incidência de falsos positivos e de falsos negativos, particularmente nos casos de sífilis primária e latente, acarretando em um risco de transmissão da sífilis em transfusões sanguíneas¹⁸. Nos últimos anos, vem se tornando comum a utilização do algoritmo reverso, com a utilização de testes altamente sensíveis e específicos, como primeiro teste a ser feito em bancos de sangue, além de testes automatizados como a quimioluminescência^{13,19}.

Visto que não há um teste pré-fixado pela Portaria, há discordância entre os bancos de sangue em qual teste adotar como triagem e confirmatório, fazendo-se necessário um estudo

que demonstre a taxa de sensibilidade e especificidade entre os testes disponíveis, levando em consideração custo, capacitação de profissionais e demanda diária de cada hemocentro. Foi realizado uma análise comparativa entre métodos treponêmicos e não treponêmico, avaliando vantagens e desvantagens de cada um dos métodos empregados para a triagem sorológica de sífilis em doadores de sangue atendidos na Fundação HEMOPA.

Metodologia

ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto provado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pública Estadual Hospital das Clínicas Gaspar Vianna, com parecer nº 2.102.201 (Anexo A) em obediência à resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Foi solicitado ao Comitê dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido, visto que foram utilizadas amostras de doadores de sangue destinadas à triagem de doenças transmissíveis pelo Sangue, incluindo sífilis, conforme determinação da Portaria de consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017 do Ministério da Saúde, anexo IV. E ainda, não foram consultados e nem utilizados, nenhum dado epidemiológico dos doadores analisados, apenas os resultados obtidos nos testes de triagem realizados.

POPULAÇÃO ESTUDADA

Foi realizado um estudo transversal e observacional, cuja população estudada foi composta por um número amostral de 559 amostras, sendo 64 amostras de teste de proficiência positiva para sífilis, 114 amostras de ensaio de proficiência negativas para sífilis e 381 amostras aleatórias da rotina de doadores de sangue (de acordo com a média do número de amostras que são processadas por dia no hemocentro), atendidos na sede do Hemocentro Coordenador da Fundação Hemopa, que atenderam aos critérios de elegibilidade na triagem clínica e que estão aptos a doar.

SELEÇÃO DE AMOSTRAS

A seleção das amostras dos doadores da rotina foi realizada durante os meses de dezembro de 2017 a fevereiro de 2018, a partir das amostras encaminhadas ao Laboratório de Triagem de Doenças Transmissíveis pelo Sangue, da Fundação HEMOPA, para processamento dos testes sorológicos de rotina. Após liberação dos resultados de rotina, as

amostras foram selecionadas aleatoriamente por meio do programa BioEstat (versão 5.4)²⁰ e depois foram alíquotadas e armazenadas à temperatura $\leq -20^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso.

As amostras provenientes de ensaio de proficiência foram selecionadas da soroteca do laboratório de Sorologia da Fundação HEMOPA, por se tratar de amostras confirmadamente positivas e negativas, provenientes dos órgãos de Proficiência. Fora utilizados o número amostral total de amostras armazenadas nos últimos cinco anos.

TRIAGEM SOROLÓGICA

Realização dos testes sorológicos

Todas as amostras tiveram os resultados de teste não treponêmico obtidos da rotina através do teste RPR, e foram submetidas ainda à análise comparativa com o teste treponêmico através de imunoensaio Quimioluminescente.

Amostras com resultado discordante entre teste não treponêmico e treponêmico, foram ainda submetidas a um segundo ensaio treponêmico, através da metodologia ELISA.

Todos os testes foram realizados no laboratório de Triagem de Doenças Transmissíveis pelo Sangue da Fundação HEMOPA

Não treponêmico - *Rapid test Reagin* – RPR

Todas as amostras do presente estudo foram submetidas à presença do marcador anticardiolipina (não treponêmico) através do teste sorológico RPR e seguindo as recomendações do fabricante (*Wama Diagnóstica, Brasil*). Esta metodologia já é empregada na rotina do HEMOPA, na triagem de Sífilis de todos os doadores de sangue, portanto os resultados destes testes foram obtidos a partir do banco de dados da Fundação Hemopa.

Treponêmico - Imunoensaio por Quimioluminescência

As amostras selecionadas foram submetidas à pesquisa de anticorpos treponêmicos IgG e IgM através de um imunoensaio de micropartículas por Quimioluminescência no equipamento automatizado Architech i2000 e seguiram as recomendações do fabricante (Abbott, Wiesbaden, Germany).

Treponêmico - Ensaio imunoenzimático (ELISA)

As amostras de soro com resultados treponêmico / não treponêmico divergentes foram submetidas à pesquisa de anticorpos treponêmicos IgG e IgM através do teste sorológico ensaio imunoenzimático - ELISA (*ICE Syphilis Murex*) utilizando equipamentos modulares para incubação, lavagem e leitura dos resultados, e seguiram as recomendações do fabricante (*DiaSorin, Branch, Reino Unido*).

ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos com os testes sorológicos realizados foram inseridos em um banco de dados no programa *Microsoft* versão *Excel* para análise descritiva.

A avaliação de sensibilidade dos testes não treponêmicos e treponêmico utilizados foram calculados através da análise dos resultados obtidos das amostras de ensaio de proficiência com resultado sabidamente positivo para sífilis, através da seguinte fórmula:

$$S = A / B$$

Legenda: S= sensibilidade; A = Número de amostras de proficiência positiva com resultado reagente; B = Total de amostras de proficiência positiva.

A avaliação de especificidade dos testes não treponêmicos e treponêmico utilizados foram calculados através da análise dos resultados obtidos das amostras de ensaio de proficiência com resultado sabidamente negativo para sífilis, através da seguinte fórmula:

$$E = C / D$$

Legenda: E= Especificidade; C = Número de amostras de proficiência negativa com resultado não reagente; D = Total de amostras de proficiência negativa).

Os resultados das amostras aleatórias da rotina obtidos com os testes treponêmico e não treponêmico foram comparados entre si, através do teste de concordância/discordância *McNemar* com o auxílio do programa *BioEstat* versão 5.4²⁰ e a correlação da titulação do teste de VDRL com o valor de S/CO do teste treponêmico foi avaliado pelo teste de *Correlação de Pearson*. Foram consideradas associações significativas aquelas com valor de $p \leq 0,05$.

Resultados:

Neste estudo foi analisado o total de 559 amostras, sendo 64 amostras de ensaios de proficiência reagentes para sífilis, 114 de ensaio de proficiência não reagentes para sífilis e 381 amostras aleatórias da rotina de doações do HEMOPA. Todas as amostras de ensaio de

proficiência reagentes para sífilis foram testadas pelo RPR e quimioluminescência para sífilis, e obtiveram resultado reagente para todas as 64 amostras, obtendo um resultado de 100% de sensibilidade e especificidade nestes testes. As 114 amostras de ensaio de proficiência não reagentes para sífilis foram testas também por RPR e quimioluminescência para sífilis e obtiveram resultado não reagentes em todas as 114 amostras, corroborando também com 100% de sensibilidade e especificidade nos testes (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados observados nos testes não treponêmico (RPR) e treponêmico (Quimioluminescência) realizados nas amostras de proficiência positivas e negativas.

RESULTADO ESPERADO	RESULTADO OBSERVADO					
	RPR			Quimioluminescência		
	Reagente	Não Reagente	Total	Reagente	Não Reagente	Total
Reagente	64 (100%)	0 (0%)	64 (100%)	64 (100%)	0 (0%)	64 (100%)
Não Reagente	0 (0%)	114 (100%)	114 (100%)	0 (0%)	114 (100%)	114 (100%)
Total	64 (100%)	114 (100%)	180 (100%)	64 (100%)	114 (100%)	178 (100%)

As 381 amostras aleatórias da rotina do HEMOPA também foram analisadas por RPR e quimioluminescência para sífilis, sendo observado que 375 apresentaram resultados não reagente em ambos os testes. Seis amostras apresentaram resultados reagentes para pelo menos um dos dois testes, sendo todas submetidas ao teste treponêmico pela metodologia ELISA para confirmação. Uma dessas seis amostras apresentou resultado positivo tanto no teste não treponêmico RPR, como nos testes treponêmicos pelas metodologias de quimioluminescência e ELISA. Outras cinco amostras apresentaram resultados reagentes somente nos testes treponêmicos, através das duas metodologias, não apresentando reatividade no teste não treponêmico, tanto quando realizado em soro puro, como realizado em diluição de 1/8 (Tabela 2, Gráfico 1).

Tabela 2: Resultado das amostras aleatórias da rotina através dos testes não treponêmico e treponêmico.

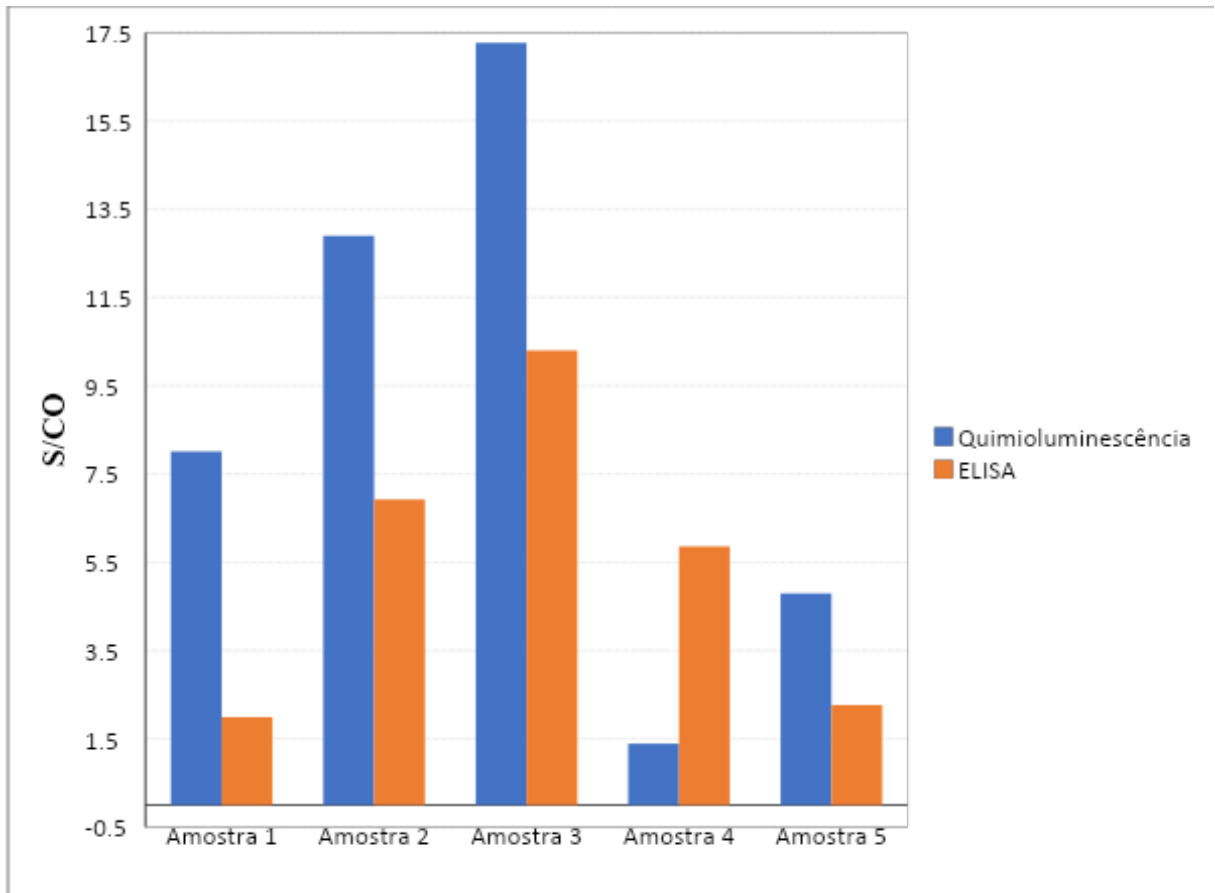
RPR	Quimioluminescência	TOTAL
-----	---------------------	-------

	Reagente	Não Reagente	
Reagente	1 (0,26%)	0 (0%)	1 (0,26%)
Não Reagente	5 (1,31%)	375 (98,43%)	380 (99,74%)
TOTAL	6 (1,57%)	375 (98,43%)	381 (100%)

Teste McNemar: $p=0,0625$

Foi realizada uma comparação de valores dos resultados S/CO (densidade óptica) entre os dois métodos treponêmicos realizados nas cinco amostras discordantes, os quais estão apresentados no Gráfico 1. Os valores obtidos de diluições de RPR e o valor de S/CO no teste treponêmico realizado através da metodologia de quimioluminescência das 64 amostras de ensaio de proficiência sabidamente reagente, foram plotados em um gráfico de dispersão (Gráfico 2), a fim de avaliar possível correlação entre diluição do teste não treponêmico e valor de S/CO de teste treponêmico, tendo sido observado uma correlação positiva significativa ($p=0,0027$), ainda que fraca ($r=0,03686$).

Gráfico 1: Valores dos resultados S/CO dos testes treponêmicos realizados pelas metodologias de Quimioluminescência e ELISA das amostras negativas no teste não treponêmico.



Legenda: S= *Sample* (Amostra); CO= *Cut-off* (ponto de corte).

Gráfico 2: Dispersão das titulações do teste de RPR comparado ao resultados de S/CO Quimioluminescência.

considerado pelos gestores dos bancos de sangue, especialmente da hemorrede pública, por terem que adequar as suas finanças a verbas reduzidas¹³.

A fim de simular o comportamento dos testes treponêmicos e não treponêmicos na triagem do banco de sangue foram realizadas análises de amostras aleatórias da rotina, sem resultado previamente conhecido analisadas no presente estudo pelos métodos treponêmicos e não treponêmicos. Nesta análise foram observadas cinco amostras (1,31%) que reagiram somente no teste treponêmico de quimioluminescência, confirmada pela metodologia ELISA com ausência de reatividade no teste não treponêmico RPR. É possível que este resultado seja devido á cicatriz sorológica, visto que, uma vez que um organismo entre em contato com a bactéria, o anticorpo de memória, imunoglobulina G (IgG), permanece reativo por tempo indefinido, resultando em positividade nos testes treponêmicos mesmo após tratamento e cura da sífilis.

A grande discussão entre a utilização do algoritmo tradicional ou reverso gira em torno de duas características entre os testes treponêmicos e não treponêmicos, sendo os testes treponêmicos capazes de detectar infecções mais recentes comparado com os testes não treponêmicos, isto se deve ao sistema imune reagir primeiramente ao *T. pallidum* do que à cardiolipina, desta forma a detecção dos testes treponêmicos se dá primeiramente nesses testes, ressaltando a utilização do algoritmo reverso. Liu et al (2014)²³ demonstraram que os testes treponêmicos detectam uma concentração mínima de anticorpos bem menor do que os não treponêmicos, e dentre os testes treponêmicos, o de quimioluminescência foi o que obteve o melhor resultado.

Há um conflito quanto ao descarte ou não das bolsas de sangue, ficando a dúvida entre sensibilização prévia/cura – não descartar, e infecção recente - descartar as bolsas de sangue^{24,25}. Nos testes não treponêmicos, por sua vez, em geral os títulos de anticorpos diminuem e até mesmo negativam após cura, não havendo evidências de cicatriz sorológica indefinidamente, tal como observado nos testes treponêmicos; sendo então frequentemente utilizados para acompanhamento do tratamento, além da triagem¹³.

Vários autores veem demonstrando benefícios na utilização do algoritmo reverso nas triagens de bancos de sangue pelo mundo, dentre eles está o cuidado com alguns doadores que procuram os bancos de sangue com intuito de realizar testes sorológicos para infecções após comportamentos de risco, sem relatar na triagem clínica e algumas vezes sem apresentar sinais/sintomas que se possa associar a alguma infecção, desta forma os testes treponêmicos se apresentam como a melhor opção por detectarem a infecção pelo *T. pallidum* mais

precocemente devido a produção do anticorpo específico ser produzido antes do que o anticorpo anticardiolipina que é detectado nos testes não treponêmicos^{21,22, 23, 24, 25}.

No presente estudo, buscou-se associar os valores de S/CO com resultados de diluições de RPR para achar uma relação/marcador para a fase da doença, assim como no estudo de Fletcher et al (2017)²⁶ com HCV, que utilizando também o teste de quimioluminescência, e se pôde concluir que resultados de S/CO acima de 8 é confirmado a infecção pelo HCV, no entanto, valores ≥ 1 e < 8 , deve-se realizar o confirmatório com PCR e/ou outro teste EIA, afim de distinguir entre infecção recente²⁶. No entanto, não foi possível definir nesse estudo esta relação, pois levando em consideração as cinco amostras positivas no teste treponêmico e negativas no não treponêmico, foi realizado o teste de ELISA para confirmação, e comparando os resultados de S/CO dos testes de quimioluminescência com o ELISA, observou-se em quatro das cinco amostras uma relação de proporção de maior valor de detecção para a quimioluminescência e o ELISA podendo representar uma relação de valores altos de S/CO indicando cicatriz sorológica e não infecção recente, porém, em uma dessas cinco amostras essa relação não se manteve, demonstrando que o ELISA detectou um S/CO maior que a quimioluminescência, com isso não se pode comprovar a relação de que quanto maior o S/CO de quimioluminescência demonstraria cicatriz sorológica e não infecção recente.

Neste estudo não foram encontrados falso-positivos no teste não treponêmico, divergindo do estudo de Sandes et al²¹ e Baião et al²², no entanto o número amostral utilizado para esta pesquisa não foi tão elevado. Apesar do custo maior, alguns estudos como o de Sandes et al (2017)²¹ demonstraram que em um banco de sangue no Rio de Janeiro, a taxa de falso-positivos na triagem foi de aproximadamente 60% pelo teste VDRL, enquanto que na quimioluminescência foi de aproximadamente 25%. Em outro estudo, foram comparados os resultados de triagens em uma grande rotina de banco de sangue no Brasil; durante dois períodos, um de utilização do protocolo de algoritmo tradicional, consistindo de triagem com teste não treponêmico e confirmação com teste treponêmico; e outro de protocolo de algoritmo reverso, triagem com teste treponêmico e confirmação com teste não treponêmico, sendo todos os resultados divergentes entre os dois testes, confirmados pelo teste *fluorescent treponemal antibody absorption test* (FTA-abs - padrão-ouro). Foi demonstrado que após a implantação do algoritmo reverso houve uma redução de mais da metade de testes falso-positivos²². Desta forma, cabe ressaltar que apenas o teste treponêmico positivo e o não treponêmico negativo não se configura cicatriz sorológica, podendo ser uma detecção de

infecção recente, tendo assim, a necessidade de mais estudos que avaliem uma possível soroconversão ou não do teste não treponêmico, em casos de indivíduos reagentes apenas nos testes treponêmicos, a fim de encontrar marcadores laboratoriais que permitam definir a reatividade como cicatriz sorológica ou infecção recente. Esta identificação permitiria não descartar bolsas de casos de infecção curada, bem como bloquear bolsas correspondentes a infecções recentes.

Não houveram falso-positivos no teste RPR como demonstrado em outros estudos citados anteriormente^{21,22}, no entanto, pôde-se observar uma maior eficiência no período de realização dos testes, através do teste treponêmico de quimioluminescência.

Ainda, algo pouco relatado na literatura, porém de suma importância, é a constatação de que no teste de quimioluminescência é mais seguro para o profissional que manuseia o equipamento, comparado ao profissional que realiza o teste RPR, que precisa pipetar cada amostra por vez e se expõe a um risco mais elevado.

Conclusão

No presente estudo, através da análise de amostras de ensaios de proficiência, observou-se 100% de sensibilidade e 100% de especificidade tanto no método não treponêmico, como no método treponêmico analisados. A análise dos resultados obtidos nas amostras aleatórias da rotina revelaram 1,31% dos doadores com resultados reagentes apenas no teste treponêmico, possivelmente devido cicatriz sorológica de infecção passada curada, entretanto, devido a possibilidade do anticorpo treponêmico ser detectado em fases mais iniciais que a anticardiolipina, sugere-se o método treponêmico pela metodologia de quimioluminescência mais indicado para a triagem do banco de sangue. Esta sugestão se deve tanto pela automação completa, evitando erros operacionais, bem como pela possibilidade de detecção de anticorpos em fases mais iniciais, ainda que se espere encontrar maior positividade, devido cicatriz sorológica, aumentando o descarte de hemocomponentes. Faz-se necessário, a realização de estudos adicionais, especificamente com doadores de sangue reativos apenas no teste treponêmico, a fim de buscar um marcador laboratorial que possa diferenciar infecção passada curada ou infecção recente inicial, objetivando um maior aproveitamento das bolsas de sangue oriundas de doadores curados para a sífilis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹ Horváth A. **Biology and natural history of syphilis**. Gross, G., Tying, S. K. 2011:129-141.

² Brasil, Manual técnico para diagnóstico da sífilis, **Ministério da Saúde**, Brasília, 2016.

³ Organização mundial da saúde. **Diagnóstico laboratorial de doenças sexualmente transmissíveis, incluindo o vírus da imunodeficiência humana**. Tradução de Nazle Mendonca Collaco Veras. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

⁴ **Bergey's Manual of systematics of archaea and bacteria**. Última atualização: 27 de março de 2017.

⁵ Santos MO, dos, Muller VDM, Valcarenghi D, Gonçalves JBP, Bueno EC. Comparação de testes não treponêmicos utilizados no diagnóstico da sífilis e interferência da inativação do soro. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. 2007;2(39):135-7.

⁶ Cleinman IB, May, SB. Diretrizes de atendimento de sífilis em adultos. UFRJ, **serviço de doenças infecciosas e parasitárias do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho**, 2011.

⁷ Gomes NCRC, Meier DAP, Pieri FM, Alves E, Albanese SPR, Lentine, E. C., Arcêncio, R. A., Dessunti, E. M. Prevalence and factors associated with syphilis in reference center. **Revista sociedade Brasileira de medicina tropical**. 2017;50(1):27-34.

⁸ Brasil, Manual técnico para investigação da transmissão de doenças pelo sangue, **Ministério da Saúde**, Brasília, 2004.

⁹ Muller F, Eisenhart-Rothe B, Busch H. Old-new problem of the lues risk in transfusion medicine: the effect of the serum and ACD stabilizer at different temperatures on the infectiosity of *Treponema pallidum* (Nichols strain). **Infusionsther klin ernahr**. 1979;(5)306-10.

¹⁰ Blejer J, Leiro V. Sífilis: Um hito em medicina transfusional. Tamizaje por pruebas treponémicas o no treponémicas? **Grupo cooperativo iberoamericano de medicina transfusional**. 2015.

¹¹ Brasil, Portaria de consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017, anexo IV. **Ministério da Saúde**, Brasília, 2017.

¹² Centers for Disease Control and Prevention - CDC. **Discordant results from reverse sequence syphilis screening – five laboratories, United States, 2006-2010.** *Morb. Mortal.* 2011;60:133-7.

¹³ Kaur G, Kaur P. Syphilis testing in blood donors: an update. **Blood transfus,** 2015;(13):197-204

¹⁴ Barsanti C, Valdetaro F, Diniz EMA, Succi RCM, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 1999;(6)32:605-11

¹⁵ Santana LR, Parahyba MJPC, Alencar M. J., Marques D de A. Teste VDRL para diagnóstico da sífilis. Avaliação dos resultados em uma unidade de atenção primária de saúde. **Revista Brasileira de Análises Clínicas,** 2006;(382):71-3.

¹⁶ Brasil, Portaria n. 3.242, de 30 de dezembro de 2011. **Ministério da Saúde,** Brasília, 2011.

¹⁷ Baião AM, Kupek E, Petry A, Reverse algorithm for syphilis screening more than halved false positive test results in Brazilian blood donors. **Transf. Med. Bri. Blo. Transf. So.,** Florianópolis, 2013.

¹⁸ Santhi T, Lakshmi SJ, Lavanya G, Raju BTVN, Prasad PG, Evaluation of micro-TPHA, VDRL and RPR tests in the serodiagnosis of syphilis. **J. Evolution Med. Dent. Sci.** 2016;(5):31.

¹⁹ French P, Gomberg M, Janier M, Schmidt B, van Voorst Vader P, Young H. European guidelines on the management of syphilis. **Inter. J. of STD & AIDS,** 2009;20:300-9.

²⁰ Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL, Santos AA **BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas.** Ong Mam. Belém, Pará, 2007.

²¹ Sandes VS, Silva SGC, Motta IJF, Velarde, IGC, de Castilho SR. Evaluation of positive and false-positive results in syphilis screening of blood donors in Rio de Janeiro, Brazil. **Bri. Blo. transf. So.** 2017.

²² Baião AM, Kupek E, Petry A. Reverse algorithm for syphilis screening more than halved false positive test results in Brazilian blood donors. **Transfusion Medicine British Blood Transfusion Society,** Florianópolis, 2013.

²³ Liu C, Ou Q, Chen H, Chen J, Lin S, Jiang L, Yang B. The Diagnostic Value and Performance Evaluation of Five Serological Tests for the Detection of *Treponema pallidum*. **J. Clin. Lab. Anal.** 2014;28:204–209.

²⁴ Jonckheere S, Berth M, Esbroeck MV, Blomme S, Lagrou K, Padalko E. Evaluation of different confirmatory algorithms using seven treponemal tests on Architect Syphilis TP-positive/RPR-negative sera. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2015.

²⁵ Dai S, Chi P, Lin Y, Zheng X, Liu W, Zhang J, Zeng Q, Wu X, Liu W, Wang J. Improved Reverse Screening Algorithm for *Treponema pallidum* Antibody Using Signal-to-Cutoff Ratios from Chemiluminescence Microparticle Immunoassay. **Sex Trans Dis** 2014;(41),1:29-34.

²⁶ Fletcher GJ, Raghavendran A, Sivakumar J, Samuel P, Abraham P. Diagnostic reliability of Architect anti-HCV assay: Experience of a tertiary care hospital in India. **J Clin Lab Anal.** 2017:1-5.

ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS TREPONÊMICOS E NÃO TREPONÊMICOS PARA A TRIAGEM SOROLÓGICA DE SÍFILIS EM DOADORES DE SANGUE ATENDIDOS NA FUNDAÇÃO HEMOPA.

Pesquisador: Renata Bezerra Hermes

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 08259517.8.0000.0010

Instituição Proponente: Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará - Fundação HEMOPA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.102.201

Apresentação do Projeto:

De acordo com a Portaria n° 158 de 2016 do Ministério da Saúde: "§ 11. O teste para sífilis será por intermédio da detecção de anticorpo antitreponêmico ou não-treponêmico.", não se fixa um teste padrão para se realizar a triagem, ficando assim, à critério de cada hemocentro. Logo, não há uma resposta direta para qual dos testes é o mais adequado para a triagem das bolsas de sangue, visando o aumento da segurança transfusional. Faz-se necessário a realização de um estudo que avalie as diferentes metodologias, visando cada vez mais a segurança transfusional aliada com a realidade orçamentária dos bancos de sangue brasileiros. A sífilis é uma doença infectocontagiosa com curso crônico, que tem um grande impacto na saúde da população (BRASIL, 2010). Esta doença é causada pela espiroqueta *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*, pertencente ao gênero *Treponema*, família *Spirochaetaceae*, possui um cromossomo circular com 1138006 pares de bases (SINGH e ROMANOWSKI, 1999). A principal forma de transmissão do *Treponema pallidum* é a via sexual, mas pode também ocorrer via transmissão vertical (resultando na sífilis congênita) e ainda por transfusão sanguínea e inoculação acidental (SINGH e ROMANOWSKI, 1999).

Objetivo da Pesquisa:

Realizar análise comparativa de métodos treponêmicos e não-treponêmicos para a triagem

Endereço: Travessa Alferes Costa s/n
Bairro: Bairro Pedreira CEP: 66.087-660
UF: PA Município: BELEM
Telefone: (91)3276-1770 Fax: (91)3276-1770 E-mail: cepthcgv@yahoo.com.br

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de pesquisa aprovado para execução.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_854642.pdf	18/05/2017 11:52:03		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Solicitacao_Dispenza_TCLE.pdf	28/03/2017 13:55:02	Renata Bezerra Hermes	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_pesquisadores.pdf	28/03/2017 13:48:37	Renata Bezerra Hermes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Completo.pdf	28/03/2017 13:47:03	Renata Bezerra Hermes	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Aceite_institucional.pdf	28/03/2017 13:21:49	Renata Bezerra Hermes	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	28/03/2017 13:18:37	Renata Bezerra Hermes	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELEM, 06 de Junho de 2017

ANEXO B – NORMAS DA REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA

Information for authors Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy

The *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, ISSN 1516 8484, the official scientific publication of the Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular, Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea, Associazione Italo-Brasiliana di Ematologia and Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica aims to promote scientific development in Hematology, Transfusion Medicine and related areas. All manuscripts, after initial acceptance by the editors, will be sent for analysis by two peer reviewers. Anonymity is guaranteed throughout the evaluation process. When considered necessary, a list of modifications will be sent to authors to correct their work or justify their decision not to do so. The responsibility for opinions expressed in articles is solely of the authors. Manuscripts should not be submitted simultaneously to more than one journal. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. Reproduction, in full or in part, translated into other languages requires prior permission of the editors. The journal publishes the following sessions: Original Article, Special Article, Review Article, Updates in the Specialty, Case report, Letter to the Editor, Images in Clinical Hematology, Editorial, Scientific Comment and What is the Evidence. Other types of publications of interest in the area will be published at the discretion of the editors. All manuscripts must be submitted in English.

PREPARATION OF THE MANUSCRIPT

General information

For any manuscript to be evaluated, it must be accompanied by the following documentation:

- Conflict of interest: Situations that may improperly influence the development or the conclusions of the work such as participation in drug- or equipment-producing companies cited or used in the work, as well as competitors of these companies should be mentioned. Financial assistance, payments received for consultancies, relationships related to employment, etc. are also considered sources of conflict.
- Approval of the study by a Research Ethics Committee recognized by the National Research Ethics Committee (CONEP);

• Articles that deal with clinical research involving human beings must include a statement in the Methods Section that all study participants signed an informed consent form. Authors should also confirm that the study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration as revised in 2008;

• Experimental studies involving animals should be conducted according to the Ethical Principles for Animal Experimentation recommended by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA, http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/363950/E_book_CONCEA.html), Brazilian Law No. 11.794/2008; or equivalent international guidelines. Authors should obtain previous approval from their local Institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation or equivalent ethics committee. A statement of protocol approval from an Animal Ethics Committee (CEUA) or equivalent as well permit numbers must be included in the Methods section of the paper. All randomized controlled trials and clinical trials submitted for publication must be registered in a clinical trials database. This is a guideline of the International Clinical Trial Registry Platform (ICTPR) of the World Health Organization (WHO) and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). The instructions for the registry are available at <http://www.icmje.org/clintrialup.htm> and registration can be attained in the Clinical Trials Database of the National Library of Medicine available at <http://clinicaltrials.gov/ct/gui>.

Technical requirements

1. Article identification:

- a) A concise however informative title;
- b) Complete names of authors without abbreviations and their institutions;
- c) Department and official name of the institution(s) to which the work should be attributed;
- d) Name, full address including telephone and e-mail of corresponding author; e) financial support (if any).

2. **Abstract and keywords:** Abstract in English of not more than 250 words. For Original Articles this should be structured with background, method, main results and conclusion. For the other article types, the abstract need not be structured but should contain information illustrating the importance of the work. Specify up to five keywords, which define the theme of the paper. The keywords should be based on

MeSH (Medical Subject Headings) from the National Library of Medicine available at: <http://www.srgonline.com.br/rbhh/srg/have/mesh.asp>. For clinical trials, indicate the International Clinical Trials Registry Number below the summary. Non-standard or uncommon abbreviations should be avoided in the title, abstract, and keywords, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

3. Manuscript content: a) **Original Article:** Used to publish the results of scientific research, it must be original and should comprise the following: Introduction, Objective, Method, Results, Discussion, Conclusion and References. The work should not exceed 4000 words (including references), up to 6 authors, up to 7 tables, illustrations and photos and up to 30 references; b) **Special Article:** With the same structure as original articles, Original Articles are reclassified by the Editor depending on their importance:

c) **Review Articles:** narrative reviews addressing an important issue in the specialty. These articles should not exceed 5000 words (including references).

Information for authors

Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia

Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy a maximum of 7 tables, Figures and Photos and up to 60 references; d) **Update in the Specialty:** on a theme, method, treatment, etc. It must contain a brief history of the topic, its current state of knowledge and the reasons for the work; study methods (data sources, selection criteria), hypotheses, study lines, etc., criteria similar to review articles; e) **Case Report:** should have an introduction with a brief literature review, a description of the case showing significant results for the diagnosis and differential diagnoses (if any), discussion or comments and references. Case reports are not published with abstracts or keywords. It should not exceed 1800 words, two tables, illustrations and photographs, up to four authors and ten references; f) **Letters to the Editor:** a maximum of 1000 words (including references), three authors, and two illustrations; g) **Images in Clinical Hematology:** Maximum 100 words, two images, three authors and three references; h) **Scientific comments:** will only be accepted by invitation of the editors.

4. Acknowledgements: Should be addressed to collaborators who deserve recognition, but whose participation does not justify their inclusion as an author such as technical assistants, as well as financial support received.

5. References: should always be numbered in the order they appear in the text. The format must be based on the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" guidelines proposed by the International Committee of Medical Journal Editors and updated in 2009, as follows: the titles of journals should be abbreviated following the List of Journals Indexed in Index Medicus of the National Library of Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Cite the first six authors after which add the words et al.

Examples of references: Printed documents

• **Journals:** Podley DJ, Dietz AB, Gastineau DA. Sterility testing of hematopoietic progenitor cell products: a single-institution series of culture-positive rates and successful infusion of culture-positive products. *Transfusion*. 2007;47(4):636-43.

• **Books:** Chalmers J. Clinician's manual on blood pressure and stroke prevention. 3rd ed. London: Science Press; 2002. 70 p. Richardson MD, Warnock DW. Fungal Infection Diagnosis and Management. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science Ltd Editorial Offices; 1997. 249 p.

• **Book chapters:** F. Reyes. Lymphocyte differentiation. In P Solal-Célgny, N Brousse, F Reyes, C Gisselbrecht, B Coiffier. Non-Hodgkin's Lymphomas. Paris: Éditions Frison-Roche; 1993. p.19-29.

• **Annals:** Souza AM, Vaz RS, Carvalho MB, Arai Y, Hamerschilak. Prevalência de testes sorológicos relacionados à hepatite B e não-A, não-B em doadores de sangue. In: 190 Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia / 260 Congresso da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia; 2003 Ago 6-9; São Paulo, 2003. Anais. p.103.

• **Theses:** Sandes AF. Caracterização imunofenotípica da diferenciação eritrocitária, granulocítica e megacariótica em pacientes com síndromes mielodisplásicas [thesis]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2009. 126p.

Electronic documents

• **Articles in Periodicals:** Almeida ID, Cottinho AS, Juckowsky CA, Schmalfuss T, Balsan AM, Röhsig LM. Controle de esterilidade de produtos de células progenitoras hematopoiéticas do sangue periférico. *Rev Bras Hematol*

Hemoter [Internet] 2010 [cited 2010 Jun 10]; 32(1):23-8. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v32n1/aop03010.pdf>

• **Books:** Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. Clinical methods. The history, physical, and laboratory examinations. 3rd ed. [Internet]. Boston: Butterworths; 1990. [cited 2010 Jun 10]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cm>

• **Illustrations and photos:** Must have a resolution of at least 1000 dpi. Color figures should be in CMYK and will be published in color only if essential and must be in TIFF, JPEG or CDR format. Do not send the figures within the text.

• **Tables:** should be numbered consecutively using Arabic numerals and cited in the text in numerical order. If the table requires special symbols, it should be sent as a high resolution image (1000 dpi) in TIFF or JPG format.

SUBMISSION

The submission of the manuscript must be via the website of the Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, (Journal of Hematology and Hemotherapy) www.rbhh.org. Templates of copyright transfer, conflict of interest and animal rights forms are available on the site of the RBHH. All must be completed and uploaded to the submission site. Possible conflicts of interest of any author should be stated. It is the responsibility of authors to obtain written permission to reproduce any previously published data included in the manuscript. The editors can publish papers that do not exactly follow the instructions after careful evaluation always taking into account the interests of the readership.

Correspondence address:

Fernando Ferreira Costa Editor in Chief
Rua Carlos Chagas, 480 Campinas, SP, Brazil CEP: 13083-970