

## Uma revisão das técnicas de detecção molecular de *Treponema pallidum*, qual a mais eficaz

A review of *Treponema pallidum* Molecular Detection Techniques, which is the most effective

Una revisión de las técnicas de detección molecular de *Treponema pallidum*, que es la más efectiva

Recebido: 20/07/2021 | Revisado: 26/07/2021 | Aceito: 27/07/2021 | Publicado: 03/08/2021

**Vera Mileide Trivellato Grassi**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0987-5084>

Universidade Luterana do Brasil, Brasil

E-mail: [vmgrassi@hotmail.com](mailto:vmgrassi@hotmail.com)

**Liliane Trivellato Grassi**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0768-943X>

Universidade Brasil, Brasil

E-mail: [lilianegrassi@hotmail.com](mailto:lilianegrassi@hotmail.com)

**Maria Lucia Rosa Rossetti**

Universidade Luterana do Brasil, Brasil

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9672-9394>

E-mail: [maria.rossetti@ulbra.br](mailto:maria.rossetti@ulbra.br)

### Resumo:

A sífilis é uma doença polimórfica, infectocontagiosa e sistêmica, causada pela bactéria *T. pallidum*, considerada um agravo de notificação compulsória. O diagnóstico precoce é um fator importante no seu controle, este é realizado combinando achados clínicos e exames laboratoriais. As técnicas moleculares ajudam no diagnóstico, no entanto, não se tem um consenso sobre qual técnica é a mais adequada, estudos apresentam divergências como, qual gene deve ser usado como alvo, qual sequência dos primers, método de extração e tipo de amostra. Esta revisão procurou investigar com base nas evidências científicas, as técnicas moleculares mais eficazes na detecção de DNA de *Treponema pallidum*. Para tanto, realizou-se uma revisão sistemática da literatura realizada nas bases de dados PubMed, Science Direct e Lilacs, através dos descritores “sífilis” and “PCR and “diagnóstico” and “biologia molecular”, selecionando trabalhos publicados nos últimos dez anos. A amostra foi composta por 10 artigos. Quanto ao desenho de estudo, o ensaio clínico foi 100% prevalente. Quanto ao método utilizado foi evidenciado variações, 6 utilizaram PCR Nested, 5 PCR em tempo real e 4 PCR convencional, 5 utilizam mais de uma variação. A diferença entre elas, como, tempo para avaliar uma reação, chance de contaminação, reprodutibilidade, especificidade, sensibilidade, precisão e acurácia diagnóstica, mostrou que os dois genes de maior interesse são o *pol A* e o *tpp47*. Os testes moleculares em especial o PCR nested demonstrou ser promissor tendo boa sensibilidade e especificidade no diagnóstico da sífilis em conjunto com a sorologia para evitar complicações clínicas e transmissão da doença.

**Palavras-chave:** Sífilis; PCR; Diagnóstico; Biologia molecular.

### Abstract:

Syphilis is a polymorphic, infectious and systemic disease, caused by the bacteria *T. pallidum*, considered a disease of compulsory notification. Early diagnosis is an important factor in its control, this is performed by combining clinical findings and laboratory tests. Molecular techniques help in the diagnosis, however, there is no consensus on which technique would be the most appropriate, because studies present divergences such as which gene should be used as target, what sequence of primer, extraction method and type of sample. This review sought to investigate, based on scientific evidence, the most effective molecular techniques in the detection of *T. pallidum* DNA. Therefore, a systematic review of the literature was conducted in the PubMed, Science Direct and Lilacs databases, using the descriptors "syphilis" and "PCR" and "diagnosis" and "molecular biology", selecting works published in the last ten years. The sample consisted of 10 articles. As for the study design, the clinical trial was 100% prevalent. As for the method used, variations were evidenced, 6 used Nested PCR, 5 real-time PCR and 4 conventional PCR, 5 used more than one variation. The difference between them, such as time to evaluate a reaction, chance of contamination, reproducibility, specificity, sensitivity, precision and diagnostic accuracy, showed that the two genes of greatest interest are *pol A* and *tpp47*. Molecular tests, in particular nested PCR, proved to be promising, with good sensitivity and specificity in the diagnosis of syphilis together with serology to avoid clinical complications and disease transmission.

**Keywords:** Syphilis; PCR; Diagnosis; Molecular biology.

### Resumen:

La sífilis es una enfermedad polimórfica, infecciosa y sistémica, causada por la bacteria *T. pallidum*, considerada una enfermedad de notificación obligatoria. El diagnóstico precoz es un factor importante en su control, que se realiza combinando hallazgos clínicos y pruebas de laboratorio. Las técnicas moleculares ayudan en el diagnóstico, sin embargo, no existe consenso sobre qué técnica es la más adecuada, los estudios muestran divergencias como qué gen debe usarse como diana, qué secuencia de cebador, método de extracción y tipo de muestra. Esta revisión buscó investigar, con base en evidencia científica, las técnicas moleculares más efectivas para detectar el ADN de *T. pallidum*. Por ello, se realizó una revisión bibliográfica sistemática en las bases de datos PubMed, Science Direct y Lilacs, utilizando los descriptores "sífilis" y "PCR" y "diagnóstico" y "biología molecular", seleccionando trabajos publicados en los últimos diez años. La muestra estuvo formada por 10 artículos. En cuanto al diseño del estudio, el ensayo clínico tuvo una prevalencia del 100%. En cuanto al método utilizado, se evidenciaron variaciones, 6 utilizaron PCR anidada, 5 PCR en tiempo real y 4 PCR convencional, 5 utilizaron más de una variación. La diferencia entre ellos, como el tiempo para evaluar una reacción, la probabilidad de contaminación, la reproducibilidad, la especificidad, la sensibilidad, la precisión y la exactitud diagnóstica, mostró que los dos genes de mayor interés son *tpA* y *tp47*. Las pruebas moleculares, en particular la PCR anidada, demostraron ser prometedoras, teniendo buena sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la sífilis junto con la serología para evitar complicaciones clínicas y la transmisión de la enfermedad.

**Palabras clave:** Sífilis; PCR; Diagnóstico; Biología Molecular.

## 1. Introdução

A sífilis adquirida é uma doença polimórfica, infectocontagiosa e sistêmica, causada pela bactéria *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*. Suas principais vias de transmissão são a sexual e a vertical. Sinais clínicos comuns como as lesões cutaneomucosas das fases primária ou secundária, a sífilis adquirida pode acarretar manifestações graves e irreversíveis. Além das consequências diretas, há extensa evidência que a sífilis facilita o risco de transmissão do HIV, seja por representar um marcador de comportamentos de risco para sua transmissão, seja pelo aumento da transmissibilidade decorrente da quebra da barreira cutânea e da presença de células inflamatórias ao nível das lesões cutaneomucosas (Lafond & Lukehart, 2006; Carlson & Dabiri & Cribier & Sell, 2011; Cohen & Klausner & Engelman & Philip, 2013; Taylor & Li & Skinner & Mickey, 2014).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), com base nos dados de prevalência de 2009 a 2016, estimou o total de 376,4 milhões de Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs) curáveis, sendo que desses 6,3 milhões de casos eram de sífilis (WHO, 2020). No Boletim Epidemiológico de 2019, pode-se observar que a sífilis adquirida é considerada como agravo de notificação compulsória desde 2010, teve sua taxa de detecção aumentada de 59,1 casos (por 100.000 habitantes) em 2017, para 75,8 casos em 2018. A prevalência da doença em gestantes e seus desfechos desfavoráveis, baseadas em dados coletados em 97 países, é de aproximadamente 1,36 milhão de casos de mulheres que apresentaram sífilis ativa durante a gestação, sendo que, uma grande proporção delas não recebeu tratamento ou se recebeu, foi de maneira inadequada (Brasil, 2019, Korenromp et al., 2019)

O *T. pallidum* pertence ao gênero *Treponema*, da ordem das *Spirochaetales* que se subdivide em duas famílias: *Spirochataceae* e *Leptospiraceae*. A Família das *Spirochataceae* possui sete gêneros, mas apenas com três de interesse na medicina, o *Treponema*, a *Borrelia* e a *Leptospira* (Castro, 2004; Castro et al., 2009; Brasil, 2016). O *T. pallidum* é um microrganismo não cultivável o que impossibilita o seu isolamento e dificulta o diagnóstico laboratorial (Ageron et al., 2009). Assim, o diagnóstico da sífilis é realizado combinando achados clínicos e exames laboratoriais que variam conforme cada fase da doença (Brasil, 2016).

Os métodos mais utilizados para diagnóstico são divididos em métodos sorológicos também conhecidos como indiretos, baseados na detecção de anticorpos (métodos não treponêmicos e treponêmicos) e métodos diretos, baseados na detecção da bactéria como a Microscopia de Campo Escuro (MCO), a imunofluorescência direta e os testes moleculares (Brasil, 2015; Brasil, 2016; Castro et al., 2016; Pereira et al., 2019).

Esta bactéria, tem um único cromossomo circular de 1.138.006 pb, com 92,2% do genoma que apresenta 1.041 sequências codificadoras e com um conteúdo de 52.8% de C/G (Fraga & Goldini, 2014). Os dois genes mais utilizados como alvo, para realizar o diagnóstico por biologia molecular são o *pol A* e o *tpp47*, que codificam a DNA polimerase e uma proteína de membrana envolvida na síntese da parede celular respectivamente (Liu & Rodes & Chen & Steiner, 2001; Ageron et al., 2015, Theel & Katz & Pillay, 2020).

Nos últimos anos houve uma verdadeira explosão de novas técnicas para o diagnóstico de diversas patologias através da análise do Material Genético, e a biologia molecular está tendo cada vez mais um papel importante no diagnóstico. Atualmente, pode-se analisar sequências de DNA simultaneamente, ou seja, fazer um perfil dos genes de um tipo celular (Brischetto & Gassiep & Whiley & Norton, 2018; Theel et al., 2020).

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica muito usada, apesar de estar sendo aperfeiçoada a cada dia, existem várias metodologias, algumas são praticamente toda automatizada e pode ser realizada em Tempo Real. Esta PCR em tempo real é uma plataforma que diminui o tempo e os riscos de contaminações e ainda pode ser associada a outras técnicas (Theel et al., 2020; Lou & Xie & Liao, 2021).

No caso da sífilis, estudos sobre o *T. pallidum* são bem complexos, e ferramentas moleculares se tornam muito úteis para a determinação da diversidade e epidemiologia das infecções. Além de ter o potencial de aprimorar o tratamento clínico, os métodos de prevenção e controle também podem contribuir para o melhor entendimento sobre aquisição e transmissão da sífilis (Shukalek et al., 2021).

No entanto, ainda não se tem uma técnica padrão, existem vários artigos publicados que divergem sobre as diferentes técnicas moleculares, qual gene deve ser usado como alvo, hoje os principais são *\*tp0105*, *\*tpp15*, *\*tpp47* e *\*tp1016* e quais as sequências de primers para cada gene. Também não há consenso sobre quais os métodos de extração do DNA devem ser utilizados e sobre o tipo de amostra a ser utilizada. A quantidade de alvos utilizados tende a variar de 1 a 3 genes. A maior parte desses testes utilizam sequências iniciadoras para genes que codificam lipoproteínas de membranas, e visam as regiões geneticamente conservadas, os quais têm sido clonados e sequenciados (Castro, 2004; Ageron et al., 2015; Theel et al., 2020; Shukalek et al., 2021).

O presente trabalho tem como objetivo investigar com base nas evidências científicas, as técnicas moleculares mais eficazes na detecção de DNA de *Treponema pallidum*.

Para o alcance do objetivo proposto buscou-se identificar os métodos e os genes que são categóricos na detecção do DNA de *Treponema pallidum* e apresentar a sensibilidade e especificidade dos melhores métodos a fim de se conhecer o mais eficaz para o diagnóstico molecular da sífilis pois até o momento não se tem uma técnica padrão.

## 2. Metodologia

### 2.1 Tipo de Estudo

O presente estudo trata-se de uma revisão sistemática da literatura científica. Segundo Galvão & Sawada & Trevizan (2004) e Galvão & Pereira (2014) este tipo de estudo é um dos muitos recursos metodológicos utilizados para integrar as informações de estudos independentes, realizados separadamente, sendo uma forma de sintetizar as informações disponíveis em dado momento, sobre uma questão específica, de forma objetiva e reproduzível, trabalham com a mesma base temática, uma vez que identifica, analisa e reúne dados sobre um determinado assunto.

### 2.2 Etapas do Estudo

#### 2.2.1 Problema

Qual das variações na técnica de PCR é mais eficaz na detecção de DNA de *Treponema pallidum*?

## **2.2.2 Locais de busca**

### **2.2.2.1 Seleção das fontes**

Para seleção e coleta de material bibliográfico a pesquisa foi conduzida nas bases de dados eletrônicas: Literatura Latino-Americana do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) e Scientific Electronic Library Online (SCIELO), US National Library of Medicine National Institutes of Health (PUBMED) e SCIENCE DIRECT. As buscas para a coleta de dados secundários, foram realizadas no período de junho de 2021.

### **2.2.2.2 Definição dos descritores / Palavras-chaves / Strings**

A coleta de dados secundários, triagem e seleção do material bibliográfico foram realizadas por mais de dois pesquisadores, para evitar possíveis vieses de seleção. Foram eleitos artigos com relevância clínica e científica, usando o operador lógico “AND” para combinação dos descritores utilizados para rastreamento das publicações. Os campos utilizados para a pesquisa foram: título, resumo e assunto. Para literatura nacional foram utilizados os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) e para o internacional o Medical Subject Headings (MeSH). Os descritores utilizados respectivamente foram: DeCS: sífilis, PCR, diagnóstico e biologia molecular; MeSH: syphilis, PCR, diagnosis e molecular biology.

A combinação dos termos utilizados como DeCS e MeSH para busca dos artigos foram: a) Sífilis and PCR; b) Sífilis and biologia molecular; c) Sífilis and PCR and diagnostico; d) Sífilis and PCR and diagnóstico and biologia molecular; e) Syphilis and PCR; f) Syphilis and molecular biology; g) Syphilis and PCR and diagnosis; h) Syphilis and PCR and diagnosis and molecular biology.

### **2.2.2.3 Critérios de inclusão e exclusão**

Para a seleção das fontes, foram considerados como critério de inclusão:

1. Artigos indexados nas bases de dados a partir dos descritores (DeCS): sífilis, PCR, diagnóstico e biologia molecular e MeSH: syphilis, PCR, diagnosis e molecular biology;
2. Foram selecionados os artigos publicados nos idiomas português, espanhol e inglês que dissertam sobre a patologia sífilis e as técnicas moleculares utilizadas;
3. Estudos disponíveis em texto completo e originais, publicados nos últimos dez anos.

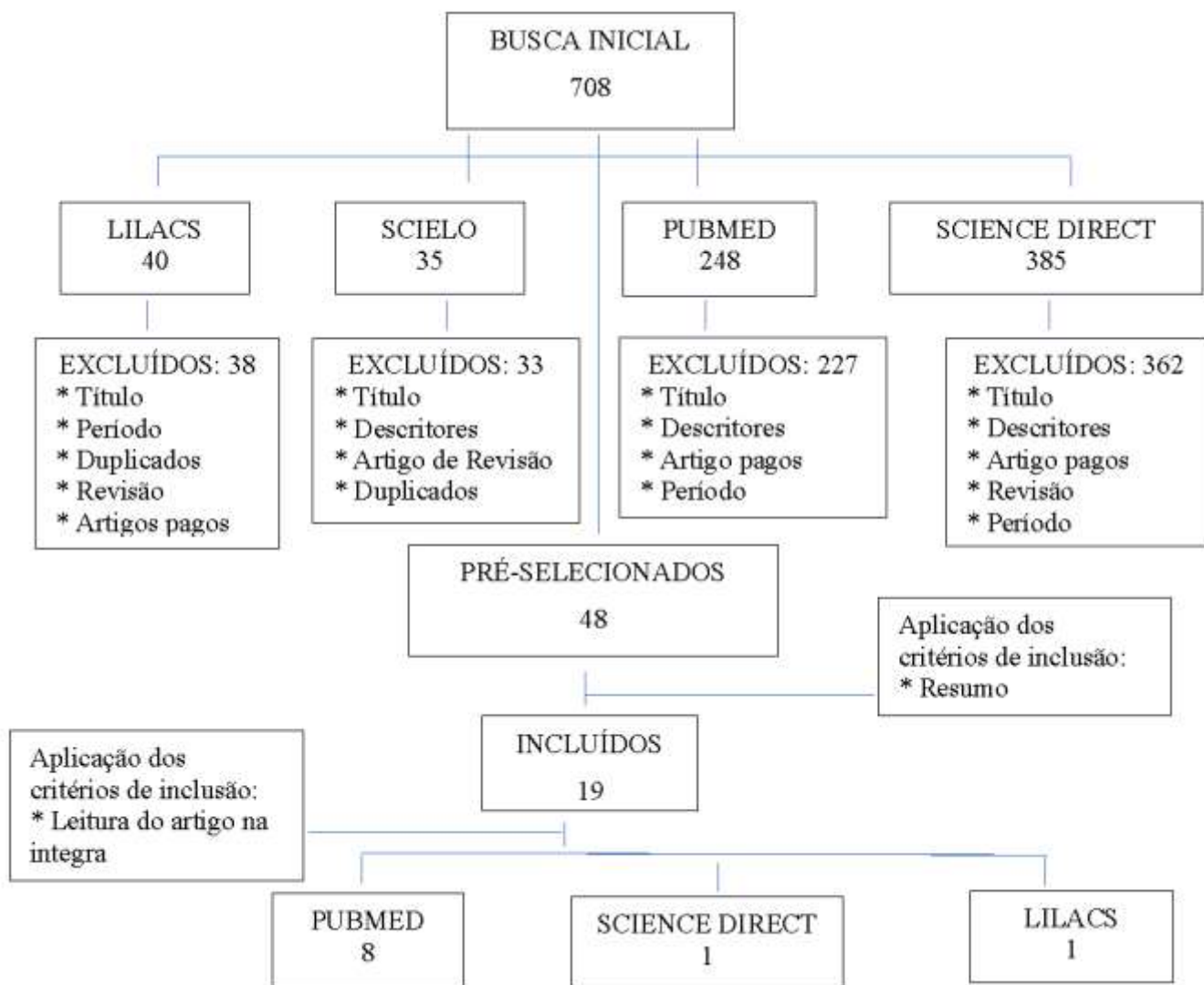
Como critérios de exclusão foram: artigos que após a leitura e análise crítica não atendam a questão norteadora; artigos que não atendam o período estimado de busca de dados; publicações não disponíveis em texto completo; artigo em duplicidade, revisões e outros formatos (tese, manuais, protocolo etc.).

### **2.2.2.4 Estratégia de busca e seleção e análise dos artigos**

Após a realização da estratégia de busca nas referidas bases de dados, foram encontrados 708 estudos por meio de uma leitura analítica dos títulos. Optou-se por não incluir artigos de revisão, teses, dissertações e monografias, buscando contemplar maior nível de evidência. Do total de artigos científicos, 40 artigos (LILACS), 35 artigos (SCIELO), 248 artigos (PUBMED) e 385 artigos (SCIENCE DIRECT). Após a discriminação dos qualitativos pelas bases de dados, foi feita uma análise do resumo, adequação ao tema da revisão, exclusão de artigos pagos ou de revisão, exclusão dos que não estavam no período selecionado e que não se enquadravam dentro dos descritores e foram então selecionados 48 artigos científicos. Após organização das ideias e leitura dos artigos na íntegra, a amostra final consistiu em 10 artigos científicos que atenderam aos critérios de elegibilidade propostos, sendo 8 da PUBMED, 1 da SCIENCE DIRECT e 1 da LILACS. O resumo do processo de coleta, análise e seleção dos artigos incluídos na amostra desta pesquisa segue apresentado na Figura 1.

Todos os trabalhos escolhidos nesta etapa obtiveram ordem de importância conforme os critérios pré-determinados, na sequência foi realizada a sintetização dos resultados da pesquisa.

**Figura 1** – Fluxograma de coleta, análise e seleção dos artigos para o desenvolvimento da pesquisa, Cáceres - Mato Grosso, Brasil, 2021.



Fonte: Autores.

### 3. Resultados e Discussão

Na Tabela 1, está apresentado o perfil dos artigos selecionados para esta análise. O perfil descrito refere-se às variáveis: ano de publicação; revista/periódico; local da pesquisa e caracterização do delineamento/desenho de estudo. Conforme observado na Tabela 1 entre os dez artigos analisados, a PUBMED teve maior destaque como base de dados tendo 80% das publicações indexadas (Tabela 1).

Quanto ao desenho de estudo, todos os estudos selecionados eram de ensaio clínico, sendo 3 prospectivo, 2 retrospectivo e 1 observacional. Observou-se que, em relação ao qualis 70% são A e 20% B, mostrando excelente nível de qualidade nos artigos relacionados com objeto de pesquisa, somente 1 não possui qualis significativo.

Quanto ao segmento temporal das publicações foi de 2012 a 2021, tendo os anos de 2019 e 2020 os maiores destaques (40%) e os demais anos todos com apenas 10% de publicação cada. Ainda conforme dados da tabela 1, constatou-se que 40% das publicações foram originadas da França e China, e as demais publicações também são de fora do Brasil, mostrando que ainda temos muito que evoluir nas tecnologias moleculares.

**Tabela 1** – Perfil dos artigos analisados segundo ano de publicação, autores, revista, base de dados, Qualis, local (Estado/região) e desenho de estudo, Cáceres-Mato Grosso, Brasil, 2021.

nº	Ano	Autores	Revista/Periódico	Base de dados	Qualis	País	Ensaio Clínico
A1	2012	Grange et al	Journal of Clinical Microbiology	PubMed	A2	Paris - França	Prospectivo
A2	2014	Glatz et al	Clinical Microbiology and Infection	Sicenc Ditect	A1	Zurique - Suíça	Prospectivo
A3	2015	Pinilla & Chaverro & Moreno & Navarrete & Muñoz	Nova	Lilacs		Bogotá- Colômbia	Ensaio clínico
A4	2016	Castro et al	Journal of Clinical Laboratory Alalisis	PubMed	B1	Lisboa - Portugal	Ensaio clínico
A5	2018	Wang et al	Emerging Microbes & Infections	PubMed	A1	Shanghai - China	Ensaio clínico
A6	2019	Noda & Rodriguez & Grillová & Bosshard & Lienhard	International Journal of STD & AIDS	PubMed	B1	Havana - Cuba	Observacional / Prospectivo
A7	2019	Zhang et al	Sexually Transmitted Diseases	PubMed	A4	Guangzhou - China	Ensaio clínico
A8	2020	Grange et al	Journal Of Clinical Microbiology	PubMed	A2	Paris – França	Ensaio clínico
A9	2020	Vrbova et al	Plos One	PubMed	A1	Brno – República Tcheca	Retrospectivo
A10	2021	Shukalek et al	Frontier in Cellular and Infection Microbiology	PubMed	A1	Alberta - Canadá	Retrospectivo

Fonte: Autores.

Comparando os anos de 2012 a 2021, notou-se um aumento dos números de pesquisas relacionadas às técnicas moleculares na detecção de DNA. De 2012 a 2019 havia mais estudos prospectivos, onde se trabalhava com o desfecho que ainda não ocorreu, quando comparado ao ano de 2020, que demonstra uma mudança passando a estudar o paciente a partir de um desfecho, o que enfatiza a credibilidade nos dados de registros do passado, em relação a exposição do fator e/ou a sua intensidade.

Na Tabela 2, foram incluídas as particularidades dos estudos referente ao método utilizado nas pesquisas, o público-alvo do estudo, o método de coleta, os genes utilizados e o principal desfecho.



**Tabela 2** – Características dos artigos selecionados, segundo cenário, público-alvo, método de coleta, método utilizado e gene utilizado, e sensibilidade e especificidade encontrada.

nº	Cenário	Público-alvo	Tipo de Amostra	Método Utilizado	Gene Utilizado	Desfecho
A1	Dois centros de DST em Paris – França	População com suspeita de sífilis e indivíduos saudáveis	Swabs de lesão, soro, plasma e sangue total	Neste PCR	Gene <i>tpp47</i> – mas usou dois pares de primers KO5 e KO3B e o Tpe e Tps	Em Swabs 82% sensibilidade e 95% especificidade Em plasma (18 e 92), soro (14,7 e 93) e sangue total (24 e 97)
A2	Departamento de Dermatologia, do Hospital Universitário de Zurique (Suíça)	População adulta com úlceras na região genital	Swabs de úlceras genitais, anais e orofaríngea	PCR em tempo real comparado com Sorologia e Microscopia de campo escuro	Primers desenhados para o gene <i>16S rRNA</i>	100% Sensibilidade 100% especificidade
A3	Departamento de Imunopatologia da Sífilis da Universidade de Washington	Recém-nascidos	Cordão Umbilical	PCR Convencional, PCR Nested, e PCR em tempo real	<i>pol A</i> , <i>16S rDNA</i> , <i>tpN47</i>	Alvo <i>tpN47</i> teve melhor sensibilidade e especificidade que os outros
A4	Instituto de Higiene e medicina Tropical	População com amostras positivas para sífilis	LCR	PCR convencional	<i>pol A</i> e <i>tpp47</i>	Mostrou que o <i>tpp47</i> é mais sensível (75,8% vs 69,7% do <i>pol A</i> ), é o <i>pol A</i> foi mais específico 92,3% vs 86,8 do <i>tpp47</i>
A5	Clínica de Doenças Sexualmente Transmissíveis do Hospital de Doenças da Pele de Shanghai	População em diferentes estágios da sífilis	Sangue total	PCR convencional e PCR Nested	<i>pol A</i> e <i>tpp47</i>	228 amostras concordaram entre os PCR Nested dos dois genes. Mas a detecção foi muito baixa na sífilis latente
A6	Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK) – Havana, Cuba	População com úlceras ano genitais	Swab de úlceras anais e genitais	3 PCR em tempo real, 1 para cada gene	<i>pol A</i> , <i>tpp47</i> e <i>16S rDNA</i>	Comparou os três PCR com os exames sorológicos. Concordância entre sorologia e PCR foi de 52,3.
A7	Departamento ambulatorial de dermatologia ou doenças sexualmente transmissíveis de sete hospitais em Guangzhou – China	População com suspeita de sífilis de qualquer fase e um grupo controle	Swabs de Úlcera, sangue total, LCR, soro e sangue do lóbulo da orelha	PCR Nested em tempo Real	<i>pol A</i> Novos primers	Detectou 71,7% das amostras positivas para sífilis. Todas as amostras controles foram negativas.
A8	Em seis Centros de DST na França. Centro de Referência Nacional para DSTs bacterianas no Hospital Cochin em Paris	População com úlceras genitais	Swabs de úlceras genitais	Kit comercial Alplex (PCR em tempo real para 7 ISTs) PCR Nested para <i>Treponema</i>	<i>tpp47</i> (primers Ko5 e Ko3B) e TPA (primers Tpe e Tps)	Quando comparados os dois testes PCR com diagnósticos sorológicos e clínicos da sífilis, obteve 80% de sensibilidade, 98.8% especificidade e Kappa =0,85
A9	Departamento Dermatovenerologia (Hospital da Faculdade St. Anne);	População suspeita de sífilis	Swabs de úlceras cutâneas, úlceras	PCR Nested, com touchdown	Alvos: TP0136, TP0548,	Sensibilidade de 72,3% e especificidade de 100% comparada

	Departamento Dermatovenerologia (Hospital da Faculdade Brno, Universidade de Masaryk); Departamento Dermatovenerologia (Universidade Charles) e Laboratório de Referência Nacional para Diagnóstico de Sífilis (Instituto Nacional de Saúde Pública)		orofaríngeas, úlceras ano genitais, úlceras sem localização, sangue total		TP0705, 23SrDNA, TP0319( <i>tmpC</i> ) TP0105( <i>pol A</i> )	com o diagnóstico do CDC.
A10	Dois grandes centros especialistas em DST de Alberta – Canada	População adulta com lesões ano genitais	Lesões ano genitais	PCR	<i>pol A</i> e <i>tpp47</i>	Encontrou sensibilidade de 49,3 e especificidade de 99,9

Fonte: Autores.



A partir da análise das informações obtidas, foi possível identificar que os dois genes de maior interesse para realizar o diagnóstico de *T. pallidum* por biologia molecular são o *pol A* e o *tpp47*. Nota-se que estes são os dois genes mais utilizados, embora exista outros genes alternativos usados com menos frequência, por exemplo o *16S rDNA* e TP0319 (*tmpC*). O *pol A* codifica a DNA polimerase I que está relacionada com o reparo e replicação do DNA e o *tpp47* codifica uma proteína de membrana citoplasmática envolvida na síntese da parede celular, ambos os genes estão presentes nos genomas de *T. pallidum* (Ageron et al., 2015).

Dos artigos selecionados os estudos A1, A3, A4, A5, A6, A8 e A10 defendem a utilização do gene *tpp47*, enquanto nos estudos A3, A4, A5, A6, A7 e A10 fazem uso do gene *pol A* e poucos estudos (A2, A3 e A6) fazem uso do gene *16S rDNA*, e apenas um estudo o A9 faz uso do TP0319. No entanto, observa-se que a maioria dos estudos utilizam mais de um gene, isto ocorre devido a uma não padronização da técnica.

O estudo A1 usou o PCR Nested especificamente para gene *tpp47* de *T. pallidum* utilizando amostra de sangue total, plasma, soro e swabs de lesão, em 294 pacientes com suspeita de sífilis e 35 voluntários saudáveis. As análises de amostras de swabs de lesão de pacientes com diagnóstico de sífilis e de pacientes sem sífilis tiveram boa sensibilidade (82%) e especificidade (95%) para a detecção do genoma de *T. pallidum* em pacientes com sífilis primária e secundária. Já no sangue total o genoma do *T. pallidum* apresentou uma baixa sensibilidade de 24%, mas uma boa especificidade (97%), o mesmo ocorreu com o plasma e o soro sensibilidade de 18 e 14,7 e especificidade de 92 e 93 respectivamente. Esta diferença na sensibilidade pode resultar do uso de um gene alvo diferente *tpp47* versus *pol A* e as condições em que o sangue total foi armazenado, pois já foi demonstrado que o congelamento das amostras pode afetar a sensibilidade.

O estudo A2 avaliou diferentes amostras (swabs de úlceras genitais, anais e orofaríngeas) de pacientes com suspeita de sífilis, buscando a detecção do *T. pallidum*, utilizou o PCR em tempo real comparando com microscopia em campo escuro e sorologia, o gene pesquisado foi o *16S rRNA*, observou-se que a sensibilidade e especificidade do PCR em tempo real foi de 100% para *T. pallidum*, quando comparado ao teste referência que é a microscopia de campo escuro. O PCR parece superior à sorologia nas infecções iniciais por *T. pallidum*.

Na pesquisa A3 os alvos moleculares (*pol A*, *16S rDNA*, *tpN47*) de microrganismo foram amplificados por meio de PCR convencional, PCR Nested e PCR em tempo real em amostras de cordão umbilical de recém-nascido. Os três genes apresentam resultados semelhantes por PCR convencional; no caso de PCR nested e PCR em tempo real, o gene *tpN47* exibiu maior sensibilidade e especificidade em comparação aos genes *pol A* e *16Sr DNA*, mostrando que o gene *tpN47* pode ser utilizado como alvo molecular para o diagnóstico imediato da sífilis congênita. Corroborando com o estudo acima Grange et al. (2012) utilizou o gene *tpN47* para o diagnóstico de Neurosífilis (SN) no LCR, em comparação com os testes diagnósticos estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), onde comprovou a capacidade do microrganismo de invadir o SNC durante os estágios primários da doença.

Estudo feito com o gene *tpN47*, deu origem a resultados promissores e assim desenvolveu um qPCR para detectar *T. pallidum* subsp. *pallidum* sem reatividade cruzada com treponemas da flora comum da pele ou com patógenos associados a infecções sexualmente transmissíveis (ISTs), para ser usado para detectar e quantificar o microrganismo em diferentes lesões e estágios da doença, constatando que na sífilis primária existe um grande número de microrganismos nas úlceras, mas um número baixo de cópias no sangue; na sífilis secundária ocorre aumento da bacteremia, enquanto na fase latente a bacteremia e a carga treponêmica são detectadas com menor frequência (Tipple et al., 2011).

Em A4 os pesquisadores realizaram duas técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) uma para cada gene (*pol A* e *tpp47*), para a detecção de DNA de *T. pallidum* no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com sífilis. Mostrou que o *tpp47* é mais sensível (75,8% vs 69,7% do *polA*) e o *pol A* foi mais específico 92,3% vs 86,8 do *tpp47*. Porém ainda há

dificuldades de se determinar qual é a melhor técnica a ser usada pois os resultados variam de acordo com o estágio da sífilis em especial na sífilis latente.

Além disso, o estudo A5 investigou o método PCR nested e o PCR convencional para os genes (*pol A e tpp47*) em amostras de sangue total de pacientes com diferentes fases da sífilis (primária, secundária e latente). O ensaio de PCR nested com os dois alvos (*pol A e tpp47*), detectou DNA *T. pallidum* em 53,6% e 62,9% dos pacientes com sífilis primária e secundária, respectivamente, o que foi muito superior aos níveis de detecção em pacientes com sífilis latente (7,4%). Indicando que o PCR nested é um método sensível para detectar DNA *T. pallidum* no sangue, especialmente em pacientes com sífilis primária e sífilis secundária. A pesquisa feita por A4 vem amparar o estudo A5, quanto ao benefício do PCR utilizando dois genes alvos (*pol A e tpp47*) para detecção de DNA de *T. pallidum* em pacientes com sífilis primária e secundária.

Até o momento, nenhum gene específico foi recomendado como um alvo padrão-ouro para PCR do *T. pallidum*. No entanto, os genes *tpp47* e *pol A* são os alvos mais promissores atualmente.

A6 avaliou o desempenho de 3 PCR uma para cada gene (*pol A, tpp47 e 16S rDNA*) e o teste sorológico de pacientes adultos com úlceras ano genitais. Os testes moleculares e a sorologia não se correlacionaram bem, obteve concordância de 52,3%. As sensibilidades dos ensaios de PCR (*pol A, tpp47 e 16S rDNA*) e sorologia (VDRL) foram 71,6%, 57,5%, 57,5% e 67,2% e especificidade de 100%, 100%, 100% e 86,4% respectivamente. A combinação de PCR e sorologia pode oferecer informações valiosas para o diagnóstico de sífilis em pacientes que apresentam úlcera ano genital, evitando complicações clínicas adicionais e transmissão da doença.

Isto está em contraste com o estudo de Brischeto et al. (2018), que afirma que o PCR para detectar *T. pallidum* acrescenta pouco valor clínico sobre a sorologia e para o diagnóstico de sífilis em determinados contextos clínicos. Em seu estudo mostraram que a maioria dos pacientes com PCR positivo para o *T. pallidum* também tiveram resultado positivo na sorologia para sífilis.

O estudo A7 investigou a viabilidade do PCR nested (dois pares de primers para o gene *pol A*) para identificar DNA de *T. pallidum* em diferentes amostras (Swabs de úlcera, sangue total, LCR, soro e sangue do lóbulo da orelha) de pacientes com sífilis em qualquer fase. Entre os tipos de sífilis, a maioria das amostras testadas com PCR nested mostrou resultado positivo para 71,7%, incluindo sangue do lóbulo da orelha (92,0%), líquido cefalorraquidiano (LCR) (90,2%), esfregaços de lesão (74,3%), soro (66,9%) e sangue total (64,2%). Não foram observadas diferenças significativas em amostras positivas para sangue total, soro e esfregaços de lesão entre a sífilis primária e secundária, porém houve diferença entre sífilis terciária, latente e neurosífilis. O PCR nested pode ser usado para identificar o DNA de *T. pallidum* de diferentes amostras de pacientes sífilíticos, mas a limitações como diferentes tamanhos de amostras.

Em outro estudo, A8 analisou o desempenho de duas técnicas, um novo ensaio PCR em tempo real comercial comparando com o ensaio de PCR nested, o DNA foi extraído de esfregaços genitais e mucosos coletados de pacientes com lesões mucocutâneas. O PCR em tempo real detectou o *T. pallidum* com uma sensibilidade de 80% e uma especificidade de 98,8%. Em comparação com o ensaio de PCR nested (*tpp47*) que teve uma sensibilidade de 84% e uma especificidade de 100%, a concordância entre os dois ensaios foi muito boa (92,5%). A sensibilidade dependeu da localização da lesão. Este resultado foi comparado com o padrão ouro, ou seja, diagnóstico final de sífilis com base no exame clínico e testes sorológicos. Mostrou que o ensaio PCR em tempo real é adequado para detectar *T. pallidum* em uso de rotina e facilita a detecção rápida simultânea de patógenos relevantes em um contexto de lesões suspeitas de sífilis. As análises feitas pelos estudos A4 e A5 corroboram com a pesquisa mostrando que a PCR nested é relevante para detecção da sífilis pois mostrou uma boa sensibilidade e especificidade.

A análise do estudo A9 foi realizada em população suspeita de sífilis em diferentes amostras, swabs de úlceras cutâneas, úlceras orofaríngeas, úlceras ano genitais, úlceras sem localização e sangue total, comparando com os métodos

sorológicos (não treponêmicos – RPR e treponêmicos - TPPA, ELISA e análise de Western Blot (WB) de IgM e IgG e com DNA de PCR usando alvos TP0136, TP0548, TP0705, genes 23SrRNA, TP0319 (*tmpC*) e TP0105 (*pol A*). Houve concordância de 59,6% entre os testes de sorologia e PCR para todo o conjunto de amostras. A Sensibilidade, especificidade para a sorologia foi de 89,3% e 100% e para PCR 72,3% e 100% respectivamente.

Esses resultados são comparáveis com os resultados relatados por Noda et al (2019), os dados revelaram que PCR e sorologia não se correlacionaram bem (concordância = 52,3%), mostrou que a combinação de PCR e sorologia pode oferecer informações valiosas para o diagnóstico de sífilis, evitando complicações clínicas adicionais e transmissão da doença.

Por fim, o resultado do estudo A10 realizado em população adulta de pacientes com lesões ano genitais, utilizando o método PCR e dois genes alvos diferentes (*pol A*, *tpp47*) versus sorologia, mostrou que a PCR apresentou sensibilidade de 49,3% e especificidade de 99,9%. Apesar da baixa sensibilidade do teste molecular para sífilis primária este é um teste altamente específico e útil na confirmação do diagnóstico e poderia ser utilizado não como um teste de triagem, mas sim utilizar os testes de sorologias simultâneos com o PCR pois poderiam garantir que todos os casos sejam identificados para gerenciar o agravamento da epidemia. O estudo A9 contribui com o estudo mostrando que a PCR é vantajosa na confirmação do diagnóstico de sífilis e assim evitar a sua transmissão.

#### 4. Considerações Finais

Em uma análise geral dos artigos, observam-se variações da mesma técnica, com a utilização de genes alvos e material de amostra diferenciado, o que demonstra que a pesquisa na biologia molecular tem evoluído e que os pesquisadores estão tentando padronizar um método mais adequado, válido para o diagnóstico de sífilis.

No que se refere aos genes mais empregados como alvo, destacam-se o *pol A* e o *tpp47* estes por serem de regiões conservadas no genoma do *T. pallidum*, dessa maneira, apresentam melhor aplicabilidade no diagnóstico da sífilis.

Em relação aos testes moleculares o ensaio PCR nested demonstrou ser promissor tendo boa sensibilidade e especificidade no diagnóstico da sífilis primária e secundária em conjunto com a sorologia para evitar complicações clínicas e transmissão da doença, dessa forma impedir o agravamento da epidemia.

#### Referências

- Ageron, A. G., Laurent, F., Schrenzel, J., Charton, B., Getaz, G. J., Tangomo, M., Tristan, B., Sednaoui, P., Lautenschlager, S., Trelu, L. T., Tejada, B. M., Cavassini, M., Emonet, S., Perneger, T., Salord H. (2015). Performance of the 47 kilodalton membrane protein versus DNA Polymerase I genes for detection of *Treponema pallidum* by PCR in ulcers. *Journal of Clinical Microbiology*. Mar;53(3):976-80. DOI: 10.1128/JCM.03444-14
- Ageron, A. G., Ninet, B., Trelu, L. T., Lautenschlager, S., Furrer, H., Piguet, V., Schrenzel, J., Hirschel, B. (2009). Assessment of a Real Time PCR to Diagnose Syphilis from deversi biological sample. *Sexually Transmitted Infections*. Ago;85(4):264-9. DOI: 10.1136/sti.2008.034314
- Brasil, M.d.S. (2016). Manual Técnico para o Diagnóstico da Sífilis. - PNCQ.
- Brasil, M.d.S. (2019). Boletim Epidemiológico da Sífilis.
- Brasil, M. D. S. (2015). Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecção Sexual Transmissível.
- Brischetto, A., Gassiep, I., Whiley, D., Norton, R. (2018). Retrospective review of *Treponema pallidum* PCR and serology results: are both tests necessary? *Journal of Clinical Microbiology*. p.1-7, v.56 n.5. 56:e01782-17. DOI: 10.1128/JCM.01782-17.
- Carlson, J.A., Dabiri, G., Cribier, S., Sell, S. (2011). The immunopathobiology of syphilis: the manifestations and course of syphilis are determined by the level of delayed-type hypersensitivity. *The American Journal of Dermatopathology*. Jul;33(5):433-460. DOI: 10.1097/dad.0b013e3181e8b587
- Castro MRTd. (2004). Contribuição para o estudo da infecção por *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*: Resposta sorológica, Diagnóstico Molecular e Genotipagem. Dissertação de Doutorado. Lisboa - Portugal (LISBOA): Universidade Nova Lisboa.
- Castro, R., Águas, M. J., Batista, T., Araújo, C., Mansinho, K., Pereira, FdaL. (2016). Detection of *Treponema pallidum* Sp. *Pallidum* DNA in Cerebrospinal Fluid (CSF) by Two PCR Techniques. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. Sep;30(5):628-32. DOI: 10.1002/jcla.21913. Epub 2016 Feb 18. PMID: 26892231; PMCID: PMC6807054.
- Castro, R., Prieto, E., Aguas, M. J., Manata, M. J., Botas, J., Pereira F. M. (2009). Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Lisbon,

- Portugal. Journal of Clinical Microbiology. Aug;47(8):2510-2. DOI: 10.1128/JCM.00287-08. Epub 2009 Jun 3. PMID: 19494073; PMCID: PMC2725690.
- Cohen, S. E., Klausner, J. D., Engelman, J., Philip, S. (2013). Syphilis in the modern era: an update for physicians. Infectious Disease Clinics of North America. Dec;27(4):705-22. DOI: 10.1016/j.idc.2013.08.005. PMID: 24275265.
- Fraga, D. D. ., & Goldini, L. Z. (2013). Detecção do *Treponema pallidum* em Líquido Cefalorraquidiano LCR pela reação em cadeia de polimerase PCR em pacientes HIV positivos assintomáticos com diagnóstico de sífilis latente. Dissertação para título de Mestre. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Galvão, C. M., Sawada, N. O., Trevizan, M. A. (2004). Revisão Sistemática: Recurso que proporciona a incorporação das evidências na prática da enfermagem. Revista Latino-americano Enfermagem, 12(3):549-56. DOI:10.1590/S0104-11692004000300014
- Galvão, T. F., Pereira, M. G. (2014). Revisões sistemáticas da literatura: passos para sua elaboração. Epidemiologia e Serviços de Saúde. 23 (1):183-184. DOI:10.5123/S1679-49742014000100018.
- Glatz, M., Juricevic, N. Altwegg, M., Bruisten, S., Komericki, P., Lautenschlager, S., Weber, R., Bosshard, P. P. (2014). 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 Infection. Dec;20(12):O1020-7. DOI: 10.1111/1469-0691.12710. Epub 2014 Jul 25. PMID: 24909546.
- Grange, P. A., Gressier, L., Dion, P. L., Farhi, D., Benhaddou, N., Gerhardt, P., Morini, J. P., Deleuze, J., Pantoja, C., Bianchi, A., Lassau, F., Avril, M. F., Janier, M., Dupin, N. (2012). Evaluation of a PCR test for detection of *treponema pallidum* in swabs and blood. Journal of Clinical Microbiology. Mar;50(3):546-52. DOI: 10.1128/JCM.00702-11. Epub 2012 Jan 4. PMID: 22219306; PMCID: PMC3295187.
- Grange, P. A., Jary, A., Isnard, C., Burrell, S., Boutolleau, D., Touati, A., Bébéar, C., Saule, J., Martinet, P., Robert, J. L., Moulene, D., Vermersch-Langlin, A., Benhaddou, N., Janier, M., Dupin, N. (2021). Use of a Multiplex PCR Assay To Assess the Presence of *Treponema pallidum* in Mucocutaneous Ulcerations in Patients with Suspected Syphilis. Journal of Clinical Microbiology. Jan 21;59(2):e01994-20. doi: 10.1128/JCM.01994-20. PMID: 33177120; PMCID: PMC8111117.
- Korenromp, E. L., Rowley, J., Alonso, M., Mello, MB., Wijesooriya, N. S., Mahiné, SG., Ishikawa, N., Le, L. V., Newman-Owiredo, N., Nagelkerke, N., Newman, L., Kamb, M., Broutet, N., Taylor, M. M. (2019). Global burden of maternal and congenital syphilis and associated adverse birth outcomes—Estimates for 2016 and progress since 2012 journal.pone.0211720. PLoS One. 14(7):1-17. DOI:10.1371/journal.pone.0219613.
- Lafond, R. E., Lukehart, S. A. (2006). Biological basis for syphilis. Clinical Microbiology Reviews. Jan;19(1):29-49. DOI: 10.1128/CMR.19.1.29-49.2006. PMID: 16418521; PMCID: PMC1360276.
- Liu, H., Rodes, B. Chen, C. Y., Steiner, B. (2001). New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene. Journal of Clinical Microbiology. May;39(5):1941-6. DOI: 10.1128/JCM.39.5.1941-1946.2001. PMID: 11326018; PMCID: PMC88053.
- Luo, Y., Xie, Y., Xiao, Y. (2021). Laboratory diagnostic tools for syphilis: Current status and future prospects. Frontiers in cellular and infection microbiology. 8 de fevereiro de 2021;10:574806. DOI: 10.3389/fcimb.2020.574806. 33628742; PMCID: PMC7897658.
- Noda, A. A., Rodríguez, I., Grillová, L., Bosshard, P. P., Lienhard, R. (2019). Accuracy of PCR and serological testing for the diagnosis of primary syphilis: Both tests are necessary. International Journal of STD & AIDS. 30: 1087–1094. DOI:10.1177/0956462419859764
- Pereira, J. B., Barbosa Júnior, W. L., Silva, E. D., Aquino, A. E. C. A., Oliveira, P. M. S., Melo, FL. (2019). Comparação de técnicas de extração de DNA de *Treponema Pallidum* para o diagnóstico molecular da sífilis. Brazilian Journal of Health Review. Curitiba, v. 2, n. 4, p. 3681-3697. DOI:10.34119/bjhrv2n4-131
- Pinilla, G. B., Chavarro, B. P., & Moreno, M. A., Navarrete, J. O., Muñoz, L. M. (2015). Determinación de los genes, *16S ADNr*, *polA*, y *TpN47*, em la detección de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* para el diagnóstico de sífilis congénita. NOVA. 13 (23): 17-25.
- Shukalek, C. B., Lee, B., Fathima, S., Chu, A., Fonseca, K., Somayaji, R. (2021). Comparative Analysis of Molecular and Serologic Testing for Primary Syphilis: A Population-Based Cohort Study. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 11:579660. DOI: 10.3389/fcimb.2021.579660
- Taylor, M. M., Li, W. Y., Skinner, J., Mickey, T. (2014). Viral loads among young HIV-infected men with early syphilis. Journal of the International Association Providers AIDS Care. Nov-Dec;13(6):501-5. DOI: 10.1177/2325957414536229. Epub 2014 Jun 4. PMID: 24899260; PMCID: PMC6754093.
- Theel, E. S., Katz, S. S., Pillay, A. (2020). Molecular and direct detection Testes for *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*: A review of the literature, 1964-2017. Clinical Infectious Diseases. Jun 24;71(Suppl 1):S4-S12. DOI: 10.1093/cid/ciaa176. 32578865; PMCID: PMC7312206.
- Tipple, C., Hanna, M. O. F., Hill, S., Daniel, J., Goldmeie, D., McClure, M., Taylor, G. P. (2011). Getting the measure of syphilis: qPCR to better understand early infection. Sexually Transmitted Infections p. 479-485, v. 87, n.6. DOI:10.1136/sti.2011.049494
- Vrbová, E., Mikalová, L., Grillová, L., Pospíšilová, P., Strnadel, R., Dastychová, E., Kojanová, M., Kreidlová, M., Vačousová, D., Rob, F., & Procházka, P., Krcháčková, A., Vaška, V., Woznicová, V., Dvořáková Herová, M., Kuklová, I., Zákoucká, H., Šmajš, D. (2020). A retrospective study on nested PCR detection of syphilis treponemes in clinical samples: PCR detection contributes to the diagnosis of syphilis in patients with seronegative and serodiscrepant results. PLoS One. Ago 20;15(8):e0237949. DOI: 10.1371/journal.pone.0237949. 32817658; PMCID: PMC7446855.
- Wang, C., Cheng, Y., & Liu, B., Wang, Y., Gong, W., Qian, Y., Guan, Z., Lu, H., & Gu, X., Shi, M., Zhou, P. (2018). Sensitive detection of *Treponema pallidum* DNA from the whole blood of patients with syphilis by the nested PCR assay. Emerging Microbes & Infections. May 9;7(1):83. DOI: 10.1038/s41426-018-0085-2. Erratum in: Emerging Microbes & Infections. 2020 Dec;9(1):1174. PMID: 29739928; PMCID: PMC5940865.
- World Health Organization Global adult estimates of chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis including maternal and congenital syphilis, 2016, Geneva, WHO; 2020, 76p.
- Zhang, Y., Dai, X., Ren, Z., Lin, H., Cao, W., Ye, X. (2019). A Novel Nested Real-time Polymerase Chain Reaction for *Treponema pallidum* DNA in Syphilis Biospecimens. Sexually Transmitted Diseases. Jan;46(1):41-46. DOI: 10.1097/OLQ.0000000000000908. PMID: 30247262.