

# Aula 6 Testes treponêmicos

Nesta aula você conhecerá os testes treponêmicos mais utilizados, suas indicações de uso e as limitações dessas metodologias.

Os testes treponêmicos – FTA-abs, MHA-TP/TPHA/TPPA e ELISA – foram desenvolvidos inicialmente para confirmar resultados positivos obtidos previamente com testes não treponêmicos.

Atualmente os ELISA e suas variações, por permitirem automação, também são utilizados como testes de triagem em laboratórios ou em hemocentros com grande rotina.

## Características gerais dos testes treponêmicos

Como dificilmente esses testes treponêmicos tornam-se não reagentes mesmo após o tratamento eficaz da infecção, é necessário que o médico investigue a história clínica do indivíduo e a associe o resultado do teste treponêmico com o do teste não treponêmico.

Trata-se de testes qualitativos. Sua reatividade indica que o usuário teve contato com *Treponema pallidum* em alguma época de sua vida e desenvolveu anticorpos específicos.

São testes indicados para confirmação do diagnóstico, quando a triagem é feita com um teste não treponêmico. Veja a seguir apresenta os testes treponêmicos mais utilizados no Brasil.

Teste treponêmico	Por que é utilizado
FTA-abs ( <i>Fluorescent treponemal antibody absorption</i> )	<p>É considerado o teste de referência ou padrão ouro dentre os testes treponêmicos. Pode ser feito com amostras de soro ou plasma.</p> <p>É o primeiro teste a se tornar reagente após a infecção, tendo bom desempenho no diagnóstico da sífilis primária em usuários que apresentam o cancro duro com mais de 10 dias de evolução.</p> <p>É importante também para o esclarecimento do diagnóstico de usuários com evidência clínica de sífilis que apresentaram resultados não reagentes nos testes não treponêmicos, situação que pode ocorrer em amostras de pacientes com sífilis primária, latente recente ou tardia.</p>
Testes de hemaglutinação ou aglutinação indireta ou passiva	<p>São de execução simples.</p> <p>Podem ser feitos em amostras de soro ou plasma.</p> <p>Não necessitam equipamentos para sua realização ou para a leitura dos resultados.</p>
Imunoenzimáticos – ELISA, incluindo os quimioluminescentes	<p>São ensaios que podem ser automatizados e empregados em laboratórios que têm grande rotina.</p> <p>Podem ser feitos em amostras de soro ou plasma. Existem, ainda, <i>kits</i> padronizados para testar amostras de sangue seco em papel-filtro.</p> <p>A leitura dos resultados é feita por <b>espectrofotometria</b><sup>1</sup> ou outros métodos automatizados.</p>
Testes Rápidos – TR	<p>Não necessitam de estrutura laboratorial para serem executados.</p> <p>Podem ser feitos em amostras de sangue total, soro ou plasma.</p> <p>Entre a coleta da amostra e a emissão do resultado decorrem cerca de <b>30 minutos</b>.</p>

**Notas:**

**1 - espectrofotometria**  
– é um método óptico de leitura de reações que utiliza diferentes filtros para determinar a presença e (ou) a quantidade de um analito. O equipamento utilizado é o espectrofotômetro.

Quadro 1 - testes treponêmicos mais utilizados no Brasil.

# Teste FTA-abs (*Fluorescent treponemal antibody – absorption*)

## Reagentes e insumos para o FTA-abs

Atualmente os testes são apresentados na forma de conjuntos diagnósticos (*kits*), que geralmente incluem:

- lâminas com os antígenos já fixados, embaladas individualmente;
- conjugado fluorescente com o título pré-determinado;
- solução **adsorvente**<sup>2</sup> ou *sorbent*;
- os soros controles positivos e negativos;
- solução concentrada de salina tamponada com fosfato (PBS) para a lavagem das lâminas.

Esses reagentes e insumos podem ser adquiridos separadamente. Neste caso, se o antígeno for **liofilizado**<sup>3</sup>, deverá ser reconstituído e fixado nas lâminas.

O conjugado adquirido deve ser titulado para determinar a diluição ideal, e a solução salina tamponada deve ser preparada no laboratório.



Utilize ponteiros estéreis na preparação do conjugado, a fim de evitar a contaminação deste.

**2 - adsorvente** – fixação de moléculas a uma superfície sólida.

**3 - liofilizado** – que passou por um processo de desidratação usado para preservar alimentos perecíveis, princípios ativos, bactérias etc. O elemento (partícula, molécula etc.) é congelado e a água é retirada por sublimação, sem que passe pelo estado líquido.

## Princípio metodológico da reação de FTA-abs

A reação de FTA-abs é uma técnica de imunofluorescência indireta (IFI). Essa técnica utiliza *Treponema pallidum* (da cepa Nichols) fixado em áreas demarcadas de lâminas de vidro em que são feitas as reações. Veja na Figura 1 a representação do seu princípio metodológico.

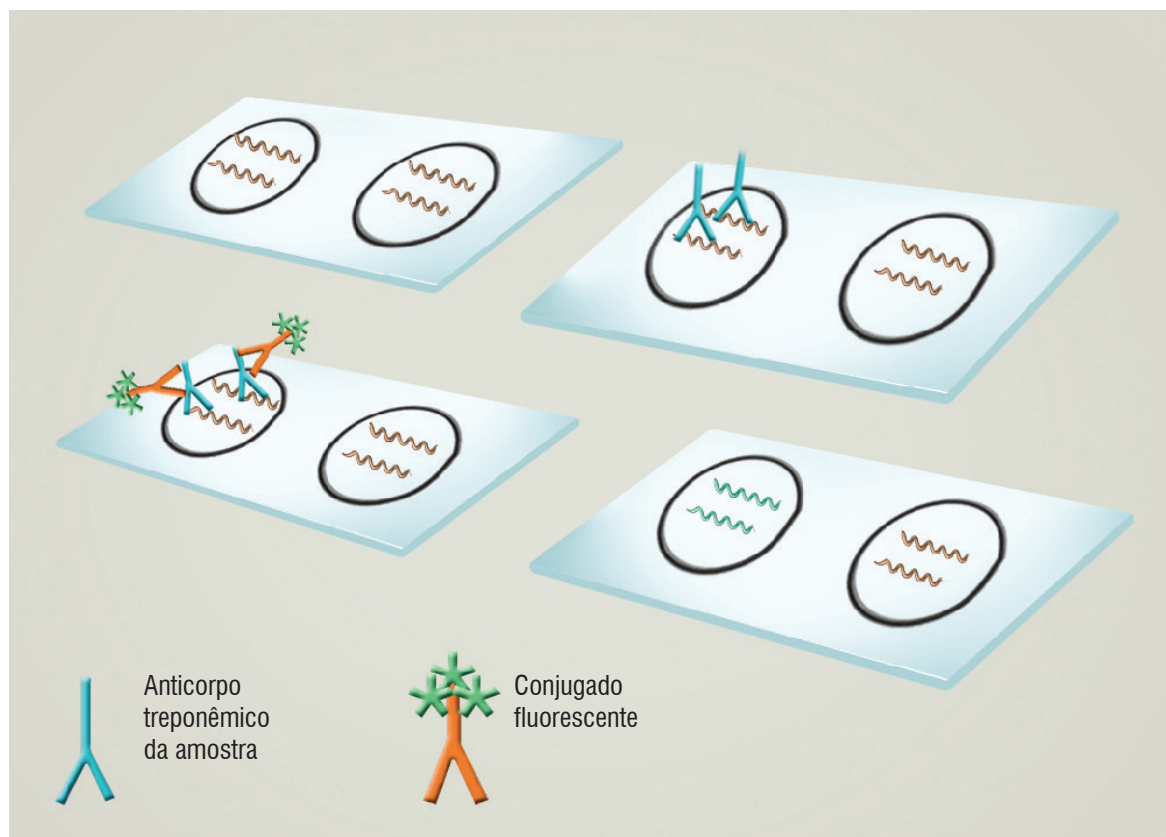


Figura 1 – Representação esquemática de uma reação de imunofluorescência indireta.

## Reação de FTA-abs

A amostra de soro utilizada deve ser inativada, por 30 minutos, a 56°C.

As diluições são feitas em tubo. A amostra é diluída a 1/5, misturando-se 1 parte de soro e 4 partes de solução absorvente ou sorbent – extrato de cultura de treponema Reiter não patogênico. Essa diluição é feita para remover anticorpos treponêmicos comuns à maioria dos treponemas não patogênicos que podem estar presentes no soro.

A amostra diluída é colocada sobre a demarcação da lâmina. Se a amostra contiver anticorpos antitreponema *pallidum*, estes vão se ligar aos treponemas fixados na lâmina.

Após a incubação da reação e a lavagem da lâmina para remover anticorpos e outros componentes da amostra que não se ligaram à reação, é adicionado o conjugado fluorescente – soro anti- imunoglobulina humana **conjugado**<sup>4</sup> ao isotiocianato de fluoresceína).

Se na amostra houver anticorpos ligados aos treponemas fixados na lâmina, o conjugado vai se ligar aos anticorpos, tornando os treponemas fluorescentes.

Assim, estes poderão ser vistos, em microscopia de fluorescência, emitindo luz verde-maçã.

Numa leitura e interpretação da reação de FTA-abs, os resultados possíveis são estes:

- **reagente** – quando os treponemas ficam fluorescentes (emitem cor de maçã-verde) sob microscopia de imunofluorescência;
- **não reagente** – quando os treponemas apresentam uma coloração avermelhada ou cor verde pálida, sem sinal de fluorescência;
- **inconclusiva** – quando há presença de treponemas com baixa intensidade de fluorescência, quando se observa fluorescência descontínua na bactéria, normalmente em pontos esparsos, ou quando se observam, no mesmo campo, treponemas fracamente fluorescentes e treponemas com coloração avermelhada.



Utilize sempre um controle positivo e um controle negativo em toda a lâmina de FTA-abs.

**4 - conjugado** – é um reagente formado por duas moléculas ligadas, como o fluorocromo – isotiocianato de fluoresceína ligado à molécula de imunoglobulina utilizada na reação de FTA-abs.

Veja a seguir os itens que devem ser verificados para tentar solucionar os problemas relativos a ocorrência de resultados inconclusivos quando os padrões de reatividade obtidos não estão dentro do esperado.

- Confira o tempo e a temperatura utilizados para inativar a amostra. Nestes casos, teste novamente a amostra após a correção do problema.
- Verifique se a amostra foi congelada e descongelada várias vezes, o que pode causar diminuição ou perda de reatividade. Neste caso, solicite uma nova amostra.
- Observe se o antígeno contém muitos restos celulares e (ou) outros contaminantes biológicos.
- Os conjugados fluorescentes podem ter perdido a marcação com a fluoresceína ou podem apresentar contaminação bacteriana ou fúngica. Nestes dois casos, observa-se intensa fluorescência inespecífica.
- Certifique-se de que o tempo e a temperatura de incubação da reação foram os recomendados pelo fabricante.
- Verifique as condições do microscópio e da lâmpada de fluorescência.
- Confira se o pH da salina tamponada com fosfato utilizada para a lavagem das amostras está em  $7,2 \pm 0,2$ .



Se houver constatação de que há problemas com o antígeno de *T. pallidum* ou com o conjugado fluorescente, verifique primeiramente se houve problema de má conservação ou se os reagentes estão fora do prazo de validade estabelecido pelo fabricante.

Caso tudo esteja correto, entre em contato com o fornecedor e solicite a troca do reagente com problema.

Se após a adoção dessas medidas o resultado permanecer inconclusivo, utilize outra metodologia para tentar esclarecer o resultado e se possível colete nova amostra.

# Testes MHA-TP (Micro-hemaglutinação para *Treponema pallidum*) e da aglutinação indireta

## Princípio metodológico da reação de MHA-TP

O teste de hemaglutinação indireta ou passiva baseia-se na ligação dos anticorpos treponêmicos presentes no soro com hemácias que contêm, na sua superfície, antígenos de *Treponema pallidum* (cepa Nichols).

Os anticorpos presentes no soro ligam-se aos antígenos que estão na superfície das hemácias, resultando na hemaglutinação.

Na reação de aglutinação indireta, os antígenos de *Treponema pallidum* são adsorvidos à superfície de partículas de gelatina.

Os anticorpos presentes no soro ligam-se aos antígenos de várias partículas de gelatina, resultando na aglutinação.

É importante que, antes de iniciar a reação, você leia atentamente as recomendações do fabricante do *kit* quanto à necessidade de inativar o soro, diluir a amostra com solução adsorvente ou *sorbent*, utilizar 2-mercaptoetanol para adsorver fator reumatoide ou outros interferentes da reação e utilizar controles com hemácias ou partículas de gelatina sem antígenos na sua superfície.

Para evitar resultados falso-positivos, retire a eletricidade estática da placa de reação, passando uma gaze úmida embaixo da placa antes de iniciar a incubação.

Além disso, incube a reação em local onde não haja vibração, para evitar que a ligação dos anticorpos às hemácias ou às partículas de gelatina seja desfeita, o que causa resultados falso-negativos.

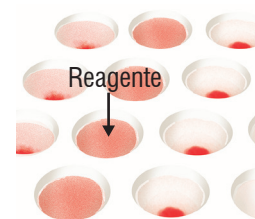


Não reutilize as placas de microtitulação para fazer esta reação. Placas usadas devem ser descartadas.

Numa leitura e interpretação da reação de hemaglutinação ou de aglutinação, os resultados possíveis são estes:

### Reagente

Quando há hemaglutinação (ou aglutinação), forma-se uma rede ou “tapete” de hemácias (ou de partículas de gelatina) unidas aos anticorpos, a qual se espalha por toda a superfície do poço da placa em que foi realizada a reação;



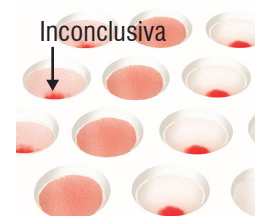
### Não reagente

Quando não há hemaglutinação, as hemácias (ou as partículas de gelatina) se depositam e formam um botão compacto no fundo do poço da placa em que a reação foi realizada;



### Inconclusiva

Neste caso, não há formação completa da hemaglutinação nem do botão, por isso se observa um misto dos dois, não sendo possível definir se a amostra é reagente ou não reagente. Quando isso ocorre, o teste deve ser repetido.



## Teste treponêmico imunoenzimático ELISA ou de quimioluminescência

Os testes imunoenzimáticos e suas variações, como o método de quimioluminescência, são testes treponêmicos que utilizam antígenos recombinantes de *Treponema pallidum* fixados em uma fase sólida. A esses antígenos vão se ligar aos anticorpos presentes na amostra do usuário.

As reações devem ser feitas sempre de acordo com as instruções dos fabricantes, pois existem variações na forma de revelar os anticorpos das amostras que se ligaram aos antígenos fixados. Essas reações são semi ou totalmente automatizadas, e necessitam de equipamentos específicos.



Para conhecer o princípio metodológico dos testes ELISA e de quimioluminescência, faça o curso **HIV – Estratégias para diagnóstico no Brasil**, da Série TELELAB.



## Referências

LARSEN, S.A., POPE, V., JOHNSON, R.E., KENNEDY, JR., E.J. A Manual of Tests for Syphilis. Washington: **APHA**, 1998, 361p. 9ª edição

LARSEN S.A., STEINER, B.M., RUDOLPH, A.H. Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis. Clin. Microbiol. Rev., Washington, v.8, n.1, p.1-21, 1995.

BAZZO, M. L. Avaliação do uso de teste treponêmico imunoenzimático competitivo na triagem sorológica da sífilis em 23.531 soros de uma população de baixa prevalência. Dissertação de Mestrado. 1999. 99p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

BENZAKEN, A. S.; BAZZO, M. L.; GALBAN, E.; PINTO, I. C. P.; NOGUEIRA, C. L.; GOLFETTO, L.; BENZAKEN, N. S.; SOLLIS, K. A.; MABEY, D.; PEELING, R. W. External quality assurance with dried tube specimens (DTS) for point-of-care syphilis and HIV tests: experience in an indigenous populations screening programme in the Brazilian Amazon. Sexually Transmitted Infections (Print), v. 00, p. 1-5, 2013.