UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Rafaela Caroline Clarinda Melo

Reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do genoma de *Treponema pallidum* em amostras de sangue e fluido cerebroespinal de recém-nascidos em diferentes situações de risco para sífilis congênita – uma amostra do sul do Brasil

Porto Alegre
2020

Rafaela Caroline Clarinda Melo

Reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do genoma de *Treponema pallidum* em amostras de sangue e fluido cerebroespinal de recém-nascidos em diferentes situações de risco para sífilis congênita – uma amostra do sul do Brasil

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Renan Rangel Bonamigo

Co-orientador: Dr. Mauro Cunha Ramos

Porto Alegre
2020

Catalogação na Publicação

Clarinda Melo, Rafaela Caroline
Reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do genoma de Treponema pallidum em amostras de sangue e fluido cerebroespinal de recém-nascidos em diferentes situações de risco para sífilis congênita - uma amostra do sul do Brasil / Rafaela Caroline Clarinda Melo. -- 2020.
84 p. : il., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2020.

Orientador(a): Renan Rangel Bonamigo ; coorientador(a): Mauro Cunha Ramos.

1. Sífilis congênita. 2. Diagnóstico. 3. PCR. 4. Molecular. I. Título.

Agradecimentos

A Deus, pois sem Ele meus caminhos não teriam encontrado os de tantas pessoas que fizeram este estudo se tornar realidade.

Aos meus pais que sempre me incentivaram na busca pelo conhecimento e financiaram meus estudos, especialmente meu pai, Pedro, cuja profissão de professor exerce com tanta dedicação e paixão, que é meu maior exemplo e que me incentivou nos dias mais difíceis.

Aos meus professores, meu orientador Dr Renan Rangel Bonamigo, pela oportunidade, por estar presente para indicar os caminhos - que nem sempre foram os mais fáceis, mas com certeza os que eu precisava trilhar – e trazer luz e sabedoria nos momentos de incerteza, além do seu incansável otimismo.

Ao meu coorientador, Dr Mauro Cunha Ramos, que me emprestou todo o seu conhecimento sobre o tema nesta dissertação abordado, que com dedicação e praticidade fez com que esse estudo de tornasse possível, além das suas ideias inspiradoras.

À Dra Maria Lúcia Rossetti, à Vera Mileide Trivellato Grassi e à Márcia Susana Nunes Silva por realizar o processamento e as análises laboratoriais das amostras, por nos emprestar seu conhecimento na área de biologia molecular, e por fornecer o material de laboratório e o espaço físico necessários.

A toda equipe de médica e de enfermagem do Alojamento Conjunto e UTI Neonatal do Hospital Santa Clara, em especial ao Dr Maurício Colvero Obal, que se dedicaram diariamente na atividade de identificar os pacientes candidatos ao estudo, coletar e armazenar as amostras com todo o cuidado necessário e exigido nesta fase da pesquisa.

Ao Thales Marzarotto, acadêmico do curso de medicina da UFCSPA que não poupou esforços para que pudéssemos convidar as mães a participar da pesquisa, esclarecendo suas dúvidas e aplicando o TCLE para as mães que se propuseram a participar do estudo.

À Daniela Nunes Fraga, que gentilmente nos cedeu as amostras de DNA do *T. pallidum*, além das anotações de laboratório da técnica de PCR por sua equipe desenvolvida no laboratório do HCPA, as quais utilizou previamente no seu projeto de mestrado como controle positivo para realização dos exames de PCR.

A minha querida e organizada amiga Fabiana Bazanella de Oliveira pela parceria de trabalho nesses últimos dois anos.

Resumo

Introdução: A transmissão vertical da sífilis continua sendo um grave problema de saúde pública. Atualmente utilizam-se critérios clínicos e laboratoriais que, em conjunto, sugerem ou não o diagnóstico de sífilis congênita (SC). A multiplicidade de testes solicitados indica que a sensibilidade e a especificidade destes são aquém do ideal e refletem uma interpretação relativa dos resultados. É necessária a busca por testes com maiores sensibilidade e especificidade que auxiliem a tomada de decisão clínica. **Objetivos:** Desenvolver a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação do DNA de *Treponema pallidum* em amostras de sangue e líquido cefalorraquidiano (LCR) de recém-nascidos em diferentes situações de risco para SC e verificar a positividade da técnica nestes grupos. **Materiais e Métodos:** Em estudo transversal, com grupo de comparação, conduzido entre agosto de 2019 e fevereiro de 2020 no Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, foram coletadas amostras de sangue e LCR de recém-nascidos expostos verticalmente à sífilis, com indicação de investigação para SC conforme protocolo institucional. O grupo de comparação foi composto por recém-nascidos sem história de exposição à sífilis, mas com outras indicações clínicas para coleta dessas amostras. Todas as amostras coletadas foram submetidas ao exame de PCR convencional. **Resultados:** Foram incluídos 57 pacientes (35 expostos à sífilis e 22 como grupo comparativo). A PCR foi positiva em 57,6% das amostras de sangue e 66,7% das amostras de LCR nos pacientes expostos à sífilis. Neste grupo, não houve relação entre a positividade da PCR e a positividade de seu RPR, a positividade do RPR da

mãe e/ou o tratamento materno prévio. Verificou-se positividade da PCR em duas amostras de sangue e cinco amostras de LCR no grupo de comparação. **Conclusão:** Embora a PCR pareça ser um método promissor para compor a avaliação de casos suspeitos de SC, há necessidade de continuidade dos estudos sobre a técnica e a importância de seu uso.

Palavras-chave: Sífilis congênita, PCR, Diagnóstico

Abstract

Introduction: The vertical transmission of syphilis remains a serious public health problem. Currently, there are many clinical and laboratorial criteria that, together, suggest or not the diagnosis of congenital syphilis (CS). The need for multiple tests for the diagnosis of CS reveals that their sensitivity and specificity are less than ideal and reflect a relative interpretation of their results. Therefore, it is necessary to search for tests with greater sensitivity and specificity that can assist clinical decision-making. **Aim of study:** To develop the technique of polymerase chain reaction (PCR) for the identification of *Treponema pallidum* DNA in blood and cerebrospinal fluid (CSF) samples from newborns in different risk situations for CS. **Materials and methods:** In a cross-sectional comparative study conducted between August 2019 and February 2020 at Hospital Santa Casa de Misericórdia in Porto Alegre, blood and CSF samples were collected from newborns vertically exposed to syphilis, who had indication to investigate CS according to the hospital protocols (exposed group). The comparative group consisted of infants with no history of exposure to syphilis who had other clinical indications for collection of these samples. All biological samples collected were submitted to conventional PCR. **Results:** Fifty seven patients were included (35 in the exposed group and 22 in the comparative group). The PCR analysis was positive in 19 of the 33 blood samples (57.6%), and 22 of the 33 CSF samples (66.7%) in the exposed group. When comparing maternal treatment or positive RPR results of mothers or infants with PCR positive results, no relationship was found. There were also positive PCR results in 2 blood samples and 5 CSF samples in the comparative group. **Conclusion:** Although PCR can be a promising method to compose the

evaluation of suspected cases of CS, there is still need for further studies on the technique and the importance of its use.

Keywords: Congenital syphilis, PCR, Diagnosis

Lista de abreviaturas

IST: Infecção sexualmente transmissível

OMS: Organização Mundial da Saúde

VDRL: Venereal Disease Research Laboratory

RPR: Rapid Plasma Reagin

FTA: Fluorescent Treponemal Antibody

FTA-Abs: Fluorescent Treponemal Antibody adsorbed

TPHA: *Treponema pallidum* Hemagglutination Assay

TPPA: *Treponema pallidum* Particle Agglutination

EIA: Enzymatic imunoassay

CIA: Chemiluminescent immunoassay

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

DNA: Ácido desoxirribonucleico

RIT: Rabbit infective test

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EUA: Estados Unidos da América

LCR: Líquido cefalorraquidiano

HIV: Human Immunodeficiency Virus

ULBRA: Universidade Luterana do Brasil

UFCSPA: Universidade de Ciências da Saúde de Porto Alegre

PPG: Programa de Pós Graduação

HCSA: Hospital da Criança Santo Antônio

ISCMPA: Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

STI: Sexually transmitted disease

CS: Congenital syphilis

CSF: Cerebroespinal fluid

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

SD: Standard deviation

LBW: Low birth weight

FGR: Fetal growth restriction

NB: Newborn

Lista de Figuras

Figura 1: Análise eletroforética em gel de agarose 2% dos produtos de PCR obtidos com primers específicos para *T. pallidum* de amostras de sangue extraídas de mancha de sangue seco.....49

Figura 2: Classificação dos pacientes do grupo de expostos à sífilis, de acordo com o resultado da PCR nas amostras biológicas 54

Lista de Tabelas

Quadro 1: Critérios diagnósticos para sífilis congênita de acordo com o CDC (2015).....46

Tabela 1: Variáveis sociodemográfias e relacionadas ao parto, características sexuais e reprodutivas, e variáveis relacionadas ao pré-natal dos dois grupos de estudo do ISCMPA, 2019–2020.....52-53

Tabela 2: Características do grupo de expostos à sífilis, classificados por subgrupos de acordo com os resultados de PCR em amostras biológicas.....55

SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO..... 14
1.1. Epidemiologia..... 14-18
1.2. Manifestações clínicas e a sífilis congênita..... 18-19
1.3 O agente etiológico 19-20
1.4 Testes diagnósticos…….....20-25
1.5 Dificuldades para o diagnóstico no recém-nascido……25-31

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO REFERENCIAL TEÓRICO..... 32-37

3. JUSTIFICATIVA..... 38-39

4. OBJETIVOS..... 40
4.1 Objetivo geral.....40
4.2 Objetivos específicos.....40

5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS..... 41

6. ARTIGO REDIGIDO EM INGLÊS..... 42-62

7. CONCLUSÃO.....63

8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....64

Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética da UFCSPA 65-67
Anexo 2. Parecer do Comitê de ética do HCSA.....68-72
Anexo 3. Termo de compromisso para utilização de dados.....73
Anexo 4. Declaração para manuseio de materiais biológicos.....74

Apêndice 1.Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o grupo de expostos e grupo comparativo 75-80
Apêndice 2. Condições para coleta, transporte e armazenamento das amostras biológicas……....81-82
Apêndice 3. Método de extração do DNA das amostras biológicas e condições para realização do PCR convencional.....83-84

1. REFERENCIAL TEÓRICO

A sífilis é uma infecção sexualmente transmissível (IST) causada pelo *Treponema pallidum*, uma bactéria Gram-negativa do grupo das espiroquetas, descoberta em 1905.[1] É uma doença de caráter sistêmico, curável, exclusiva do ser humano e transmitida principalmente pelas vias sexual e vertical.

1.1 Epidemiologia

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou uma incidência de 6,3 milhões de novos de casos de sífilis no mundo em 2016[2], sendo um problema de grande relevância para a saúde pública por se tratar de uma doença bastante comum, passível de tratamento e de prevenção.

Um recente boletim epidemiológico do Ministério da Saúde publicado em 2019 revelou um aumento na taxa de detecção de sífilis adquirida no Brasil, que passou de 59,1 casos por cem mil habitantes em 2010 para 75,8 casos por cem mil habitantes no ano de 2018. Neste mesmo período foi observado um incremento de 3,8 vezes na incidência de sífilis congênita no país, que passou de 2,4 para 9,0 casos novos por mil nascidos vivos.[3]

Esses dados refletem um grave problema de saúde pública, porquanto a transmissão vertical da sífilis é um evento absolutamente passível de prevenção. Entretanto, aspectos socioeconômicos permitem que a transmissão continue ocorrendo, e isto revela a fragilidade dos sistemas de saúde.[4]

A prevalência da sífilis em gestantes e seus desfechos desfavoráveis, com dados coletados mundialmente em 186 países, foi de aproximadamente 988 mil casos de mulheres que apresentaram sífilis ativa durante a gestação em 2016, sendo que uma grande proporção delas não recebeu tratamento ou o recebeu de maneira inadequada. Entre os 355 mil casos de desfechos desfavoráveis houve estimativa de 143 mil (40,3%) abortamentos ou mortes fetais, 14 mil (3,9%) mortes neonatais, 41 mil (11,5%) prematuros ou com baixo peso ao nascer e, por fim, 109 mil (30,7%) recém-nascidos infectados que desenvolveram complicações clínicas.[5] Essa carga de morbimortalidade, no entanto, não é proporcionalmente distribuída, com evidente sobrecarga nos países de média e baixa renda. Enquanto na Europa a estimativa foi de 19 casos de sífilis congênita para cada 100.000 nascidos vivos, na região da África a proporção foi de 1.119 casos para 100.000 nascidos vivos no ano de 2016, e na região das Américas, neste mesmo ano, foi de 339 casos para 100.000 nascidos vivos.[5,6] Nesses países onde o investimento em saúde é menor, o acesso aos serviços de saúde é mais difícil, incluindo o acesso aos cuidados pré-natais.

A tendência mundial foi de uma redução nas taxas de sífilis congênita nos últimos anos: houve uma queda de 540 casos por cem mil nascidos vivos em 2012 para 473 casos por cem mil nascidos vivos em 2016. Embora a região da África ainda corresponda pelo maior número absoluto dos casos de sífilis congênita (61%), houve uma diminuição – consoante com as estatísticas mundiais – nas taxas de sífilis congênita e desfechos desfavoráveis relacionados. O mesmo não se pode dizer das regiões das Américas e do Mediterrâneo Oriental, que apresentaram aumento destas taxas.[5] O aumento

observado nas Américas vem ao encontro do aumento no número de casos de sífilis adquirida identificado na população geral desta região nos últimos anos.[7]

Este fato nos faz refletir sobre as nossas dificuldades locais relacionadas ao enfrentamento da sífilis e a sua transmissão vertical. Um estudo realizado nas capitais brasileiras demonstrou que a maioria dos casos de sífilis na gestação foi diagnosticada em populações com maior vulnerabilidade social: adolescentes e jovens menores de 20 anos, com menos de 4 anos de estudo, desempregadas, com baixa renda, e sem parceria sexual fixa. Estas mulheres apresentaram um índice de acompanhamento pré-natal inadequado sete vezes maior do que o identificado na população geral. Cidades como Porto Alegre que - apesar dos altos índices de adequação pré-natal - registraram uma alta taxa de detecção de sífilis na gestação (22,9 por mil nascidos vivos) e uma taxa ainda maior de sífilis congênita (29,3 por mil nascidos vivos), expõem uma evidente desigualdade social na qual uma pequena parcela da população em situação de maior vulnerabilidade está muito mais exposta à sífilis.[8]

A ausência de tratamento adequado de todas as gestantes com sífilis traz à tona a necessidade do desenvolvimento de estratégias para diminuir a perda de acompanhamento e da chance de tratá-las. Uma possível maneira de melhorar o rastreamento e tratamento dessas gestantes é o uso dos testes rápidos - que podem ser realizados em poucos minutos – e instituição do tratamento na mesma consulta. Esta estratégia, entretanto, não resolve um outro problema: o tratamento concomitante das parcerias sexuais. No Brasil, considera-se que as parcerias sexuais das gestantes com sífilis possam estar infectadas ainda que apresentem um teste imunológico não reagente, e por este motivo se recomenda a realização de uma dose única de Penicilina

Benzatina intramuscular. No caso de um teste reagente para sífilis, a parceria deve seguir as orientações de tratamento para sífilis adquirida no adulto de acordo com o estágio clínico.[9]

Outro estudo que investigou a transmissão vertical de doenças infecciosas no Brasil observou avanços na prevenção da transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV) durante a gestação, equanto a sífilis congênita apresentou um aumento da sua prevalência no país. Este cenário é atribuído ao fato de que as gestantes diagnosticadas com HIV são encaminhadas para acompanhamento e tratamento em serviço especializado, enquanto gestantes diagnosticadas com sífilis são tratadas e acompanhadas na atenção básica. Além disso, a transmissão vertical do HIV pode ser prevenida em até 75% dos casos com a administração de antirretrovirais no momento do parto e a suspensão do aleitamento materno, ao passo que na sífilis congênita não há essa possibilidade. Quando as gestantes são diagnosticadas com sífilis no momento do parto, é necessário tratar o recém-nascido com penicilina procaína ou cristalina dependendo da severidade da infecção.[10]

O desafio, portanto, não é apenas o de aumentar a cobertura pré-natal, mas também melhorar a qualidade do mesmo, fortalecendo a atenção básica, identificando as gestantes com maior vulnerabilidade e desenvolvendo estratégias para mantê-las em tratamento e acompanhamento.

Devido ao fato de não haver uma vacina contra sífilis e a infecção prévia não conferir imunidade protetora, a pessoa pode se reinfectar a cada vez que

for exposta, motivo pelo qual se justifica o rastreio mais frequente durante a gestação.[9]

1.2 Manifestações clínicas e a sífilis congênita

A sífilis adquirida é uma doença polimórfica que intercala períodos sintomáticos, cujos sintomas podem variar de discretos a exuberantes, e períodos assintomáticos nos quais o único achado é a sorologia positiva.[11] Suas principais vias de transmissão são a sexual e a vertical.

Além das lesões cutaneomucosas das fases primária ou secundária que apresentam completa remissão mesmo na ausência de tratamento, a sífilis adquirida pode acarretar manifestações graves e irreversíveis. A invasão do sistema nervoso é comum na sífilis secundária e, por vezes, pode apresentar-se com sinais meníngeos e comprometimento dos pares cranianos. A sífilis terciária tornou-se mais rara após o advento dos antibióticos. Neste estágio, as três manifestações mais comuns são: (a) gomas sifilíticas, (b) sintomas neurológicos e (c) alterações cardiovasculares. As gomas são lesões necróticas e liquefacientes, mais comuns na pele e nos ossos. Podem, no entanto, ocorrer em qualquer órgão e as manifestações clínicas dependem dos órgãos atingidos.[11]

A transmissão vertical da sífilis pode ocorrer em qualquer fase da gestação e recebe influência da fase clínica em que a mãe se encontra. Durante a sífilis primária e secundária a chance de transmissão é muito maior do que nas fases mais tardias da doença. Títulos mais altos nos testes não-

treponêmicos maternos também são associados a um aumento na chance de transmissão e de eventos adversos relacionados à sífilis congênita.[12]

As manifestações cutaneomucosas da sífilis congênita precoce são semelhantes às do adulto, incluindo rash maculopapular e lesões bolhosas palmoplantares (pênfigo sifilítico). Fissuras periorais (rágades) e rinorreia sanguinolenta são achados frequentes. Além disso, pode haver presença de febre, linfadenopatia generalizada, hepatoesplenomegalia, icterícia, anemia, plaquetopenia, acometimento renal, miocardite, ileíte, leptomeningite, alterações oculares, pneumonia, dificuldade de mobilizar os membros devido a dor (pseudoparalisia de Parrot) e osteocondrite de ossos longos. As manifestações tardias que ocorrem após os dois anos de idade são: ceratite intersticial, surdez do oitavo par, neurosífilis com ou sem sintomas, artropatias, periostitegomatosa do palato e do septo nasal (frequentemente destrutiva e perfurante), e alterações dentárias características(dentes de Hutchinson).[11,13,14]

1.3 Agente etiológico

O *T. pallidum* subespécie *pallidum* – agente causador da sífilis - pertence a uma família de bactérias com formato em espiral, denominadas Spirochaetaceae (espiroquetas),[15] cujo gênero possui outras três espécies patogênicas e pelo menos seis não patogênicas. Dentre as patogênicas, são conhecidos o *Treponema carateum*, responsável pela pinta, o *Treponema pertenue*, agente da bouba ou framboesia e o *Treponema pallidum* subsp. *endemicum* que ocasiona o bejel ou sífilis endêmica.[16]

Seu tamanho varia de 6 a 15 micrômetros de comprimento e tem 0,2 micrômetros de diâmetro. Em ambientes clínicos e laboratoriais, a microscopia de campo escuro é utilizada para a visualização deste pequeno organismo,[15] entretanto este exame possui várias limitações na sua prática clínica. A primeira reside no fato de não conseguir distinguir as espécies de treponema patogênicas das não patogênicas. Além disso, o exame depende de uma adequada coleta e transporte das amostras biológicas, de um microscópio e de microscopista experiente. Apesar de ser um exame com alta sensibilidade (80%) no estágio primário da doença, sua sensibilidade diminui conforme a doença progride para estágios clínicos mais avançados, e se o paciente fez uso de antibióticos tópicos previamente à coleta do material.[17]

Com seu sequenciamento genético em 1998[18] foi possível a busca por testes moleculares que visam detectar genes específicos do código genético desta bactéria.

1.4 Testes diagnósticos

Desde a descoberta do agente etiológico, houve um esforço constante por parte dos pesquisadores no sentido de desenvolver testes para diagnosticar a sífilis em seus diversos estágios clínicos. Uma das dificuldades do seu diagnóstico reside na impossibilidade do seu cultivo em meios artificiais, embora estudos recentes tenham descrito que o *T. pallidum* possa ser co-incubado com células epiteliais de coelho por 180 dias.[19,20]

Os exames com demonstração direta da bactéria foram os primeiros a ser desenvolvidos, como a microscopia de campo escuro em 1906.

Neste mesmo ano, o bacteriologista alemão Paul Wasserman descreveu pela primeira vez um teste sorológico não treponêmico para o diagnóstico da sífilis, cuja técnica foi aprimorada ao longo do tempo para dar origem aos que hoje são utilizados para o rastreio desta doença: o Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) e o Rapid Plasma Reagin test (RPR). São testes que detectam anticorpos contra o complexo cardiolipina-lecitina-colesterol e que não são específicos para a sífilis, podendo estar também aumentados - menos comumente - em outras situações clínicas tais como a gestação, doenças autoimunes, em pessoas idosas, dentre outras.[21]

Um dos primeiros testes treponêmicos foi descrito em 1957 por Deacon, baseado no princípio da imunofluorescência, e que ficou conhecido como FTA (Anticorpo Treponêmico Fluorescente).[22] Ao longo do tempo a reação foi sendo aprimorada a fim de evitar resultados falsos positivos, e então em 1964 foi publicado o FTA adsorvido (FTA-Abs), exame utilizado até hoje para confirmação da infecção em pacientes cujo resultado do teste não treponêmico tenha sido positivo.

O TPHA (Treponema pallidum Hemagglutination Assay) foi introduzido em 1966, e posteriormente o TPPA (Treponema pallidum Particle Agglutination test), visando simplificar o processo de testagem de anticorpos treponêmicos e utilizando a técnica de aglutinação com anticorpos recombinantes do tipo IgG e IgM.

Desde então diversas outras técnicas para a detecção de anticorpos treponêmicos foram desenvolvidas, como os imunoensaios enzimáticos (EIA) e imunoensaios de quimioluminescência (CIA) que apresentam a vantagem de

serem automatizados e, por este motivo, diminuem a chance de erros humanos e de variação entre os operadores. Entretanto, necessitam de infraestrutura laboratorial para sua realização. Com objetivo de simplificar o processo diagnóstico, nos anos 2000 foram desenvolvidos os testes rápidos, a maioria deles baseada nas técnicas de imunocromatografia de fluxo lateral ou em plataforma de dupla migração. Esses testes permitem detectar rapidamente os anticorpos treponêmicos e podem ser utilizados mesmo em locais sem infraestrutura laboratorial. Com esse mesmo propósito foram desenvolvidos também os conjuntos diagnósticos para amostras de sangue coletadas em papel-filtro. Esse tipo de amostra é de fácil coleta e pode ser transportada sem refrigeração.[22]

Os testes com amplificação de ácido nucleico foram desenvolvidos a partir do sequenciamento genético do *Treponema pallidum* para suprir a necessidade de identificar se o agente etiológico encontra-se presente no hospedeiro, especialmente em três situações: (a) nos estágios iniciais da doença (sífilis primária), nos quais o paciente ainda não teve tempo de desenvolver uma resposta imunológica capaz de produzir anticorpos (não-treponêmicos e treponêmicos); (b) nos casos de suspeita de reinfecção, onde o hospedeiro teve infecção prévia pelo *T. pallidum* e desenvolveu anticorpos específicos contra a bactéria (treponêmicos) – e que permanecerão detectáveis no sangue desses pacientes por toda a vida, embora não confiram imunidade duradoura; e (c) nos casos de sífilis durante a gestação, em que os anticorpos produzidos pela gestante atravessam a barreira placentária e são detectados nas amostras de sangue do recém-nascido.

Estes testes - denominados moleculares - baseiam-se no princípio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), cujo objetivo é multiplicar um trecho específico do DNA (gene ou parte dele) utilizando desoxinucleotídeos como monômeros até um ponto em que sua concentração em dada solução seja tão alta que possa ser facilmente detectável por métodos simples e clássicos de separação e identificação de substâncias.[23] Estes exames variam no seu método (por exemplo, PCR convencional, PCR aninhada, PCR quantitativa), nas amostras biológicas analisadas e nos genes-alvo. Um grande número de genes do *T. pallidum* já foram avaliados para fins de diagnóstico molecular da sífilis, sendo os mais pesquisados e utilizados na atualidade o *tpp47* e o *polA.*[24]

Atualmente o diagnóstico presuntivo nas gestantes é realizado com base nos exames sorológicos sem maiores dificuldades. Idealmente se inicia a investigação com um teste treponêmico (teste rápido, FTA-Abs ou EIA). A disponibilidade dos testes rápidos nas unidades de saúde e a praticidade e rapidez na sua realização favorecem o uso deste exame como teste inicial para triagem de sífilis na gestação. Quando o teste rápido for realizado inicialmente e seu resultado for positivo, uma amostra de sangue venoso deve ser coletada e enviada para realização de um teste não treponêmico para confirmação do diagnóstico.[9] Tanto o teste não treponêmico quanto o treponêmico podem ser utilizados inicialmente para o rastreamento porém, para diminuir as chances de um falso positivo, é necessária a realização de um segundo exame confirmatório.[25] O teste não treponêmico deve ser quantitativo para seguimento da evolução pós-tratamento. O tratamento adequado da sífilis na gestação é essencial para evitar a transmissão vertical da bactéria, e deve ser realizado preferencialmente com Penicilina G Benzatina, cuja dose dependerá o estágio

clínico em que a paciente se encontra. As parcerias sexuais também devem ser testadas e tratadas de acordo com seu estágio clínico e resultado dos exames.[9]

No recém-nascido, em especial na ausência de sintomas - o que representa 60% dos recém-nascidos com sífilis - o diagnóstico da sífilis congênita depende exclusivamente de testes diagnósticos e pode ser bastante difícil.[26] Não existe teste ideal que isoladamente ofereça o diagnóstico da sífilis neste contexto. Os testes definitivos são aqueles que identificam o agente etiológico *T. pallidum*. O *rabit infective test* (RIT), utilizado tradicionalmente em pesquisa, é indisponível no contexto clínico. A microscopia de campo escuro e a imunofluorescência direta podem ser utilizadas,[27] mas um resultado negativo não indica obrigatoriamente a ausência de infecção, uma vez que sua sensibilidade é variável. A interpretação dos testes sorológicos do recém-nascido é prejudicada pela presença de anticorpos maternos que atravessam passivamente a barreira placentária.[26] A presença de títulos quatro vezes mais elevados (duas diluições) nos testes não-treponêmicos em relação àqueles da mãe é considerada indicativa da infecção.[9] Esse achado, porém, é mais encontrado naqueles casos nos quais outros sinais clínicos são evidentes, o que reduz ainda mais a importância da sorologia para o diagnóstico. O seguimento sorológico do recém-nascido também poderia oferecer o diagnóstico a *posteriori*. Entretanto, postergar o tratamento de um recém-nascido em risco para sífilis congênita enquanto aguarda a evolução sorológica, é uma prática indesejável e arriscada. Dos testes sorológicos, os mais sensíveis são os de detecção de IgM específica anti-*T. Pallidum*, como o 19S FTA-Abs, o IgM immunoblot e IgM ELISA, pois a imunoglobulina M não é

capaz de atravessar a barreira placentária e, quando detectada em amostra biológica do recém-nascido, o diagnóstico de sífilis congênita é confirmado. A sensibilidade varia entre 83 a 100% dos recém nascidos com sintomas de sífilis congênita ao nascimento, entretanto nos recém-nascidos assintomáticos, que são a grande maioria, a sensibilidade tende a ser menor e um resultado negativo não exclui a infecção.[26]

1.5 Dificuldades para o diagnóstico no recém-nascido

As recomendações dos Centros de Controle de Doenças dos Estados Unidos da América (EUA)[28] evidenciam quatro cenários possíveis:

> Cenário 1 - Doença presente ou **muito provável**: (a) exame físico compatível com sífilis congênita; ou (b) VDRL ou RPR quantitativo reagente no recém-nascido, cuja titulação seja quatro vezes maior que a da mãe; ou (c) um teste de campo escuro positivo em fluídos corporais. Para esses pacientes recomenda-se, ainda, a realização de hemograma com contagem de plaquetas e punção lombar com VDRL no líquido cefalorraquidiano (LCR) e avaliação da celularidade, glicorraquia e proteínorraquia. Outros exames complementares devem ser solicitados quando a situação clínica exija (como exemplos principais: radiografia de ossos longos e/ou tórax, testes de função hepática, ultrassonografia craniana, exame oftalmológico, e/ou resposta auditiva do tronco cerebral). Tratamento recomendado: Penicilina aquosa cristalina endovenosa por 10 dias ou Penicilina procaína intramuscular por 10 dias.

Cenário 2 –Infecção **possível**: Recém-nascidos que apresentem (a) um exame físico normal **e** (b) um teste não treponêmico cuja titulação é a mesma ou menor que quatro vezes a da mãe **e** (c) mãe não foi tratada **ou** inadequadamente tratada (incluindo o caso de tratamentos diferentes da penicilina) **ou** não se dispõe de documentação de haver sido tratada **ou** mãe recebeu tratamento a menos de quatro semanas antes do parto. Para esses pacientes recomenda-se análise do LCR com VDRL, contagem celular, hemograma e contagem de plaquetas e radiografia de ossos longos. A avaliação completa não é necessária se 10 dias de tratamento parenteral for utilizado. Se uma única dose de penicilina for utilizada a avaliação deve ser completa. Se a avaliação apresentar qualquer alteração ou não puder ser realizada, um curso de 10 dias de penicilina deve ser utilizado. Tratamento recomendado: Penicilina aquosa cristalina endovenosa por 10 dias **ou** Penicilina procaína intramuscular por 10 dias **ou** Penicilina benzatina intramuscular em dose única.

Cenário 3 –Infecção **menos provável**: recém-nascidos que (a) tenham um exame físico normal **e** (b) um exame sorológico não treponêmico com titulação igual ou menor que quatro vezes a titulação da mãe **e** (c) a mãe foi tratada adequadamente para o estágio da infecção quatro semanas ou mais antes do parto **e** (d) mãe não apresenta evidências de infecção ou recaída. Nenhuma avaliação complementar é recomendada. Tratamento Penicilina Benzatina intramuscular em dose única. Outra possibilidade seria

acompanhamento sorológico cuidadoso dos recém-nascidos cujas mães tenham apresentado boa resposta sorológica pós-tratamento.

Cenário 4 –Infecção **improvável**: Recém-nascidos que (a) tenham um exame físico normal **e** (b) teste sorológico não treponêmico igual ou quatro diluições menor que a diluição da mãe **e** (c) tratamento da mãe foi adequado antes da gravidez **e** (d) o exame sorológico da mãe manteve-se baixo e estável antes e durante a gravidez e no momento do parto (VDRL <1:2; RPR <1:4). Não há necessidade de avaliação. Nessa situação, o tratamento não é recomendado, entretanto, a utilização de penicilina benzatina intramuscular em dose única pode ser considerada, em especial se o seguimento do recém-nascido é incerto.

The European Guideline on the Management of Syphilis de 2014[29] diferencia infecção congênita confirmada e presumida. A infecção congênita confirmada é estabelecida por imunofluorescência direta ou PCR na placenta, material de autópsia, exsudato de lesões suspeitas ou em fluidos corporais (ex. corrimento nasal). A infecção congênita presumida: (a) morte fetal com teste treponêmico positivo, **ou** (b) alterações de exame físico compatíveis com sífilis congênita, **ou** (c) alterações radiológicas sugestivas, **ou** (d) um teste RPR ou VDRL positivo no LCR, **ou** (e) teste sorológico (TPPA/TPHA) reagente no recém-nascido cuja titulação é quatro ou mais vezes a titulação no soro da mãe (soros obtidos ao mesmo tempo no momento do parto), **ou** (f) um aumento de quatro vezes ou mais na titulação do soro do recém-nascido aos três meses após o parto. Recomenda investigação com exames complementares: avaliação sorológica (sangue periférico do recém-nascido) RPR/VDRL

(quantitativo), TPPA/TPHA (quantitativo), IgM antitreponema por EIA, IgM antitreponema por 19S FTA-abs ou IgM antitreponema por *immunobloting*, hemograma, função hepática e eletrólitos. Avaliação do LCR com exame da celularidade, glicorraquia, proteinorraquia, RPR/VDRL, TPHA/TPPA. Avaliação radiográfica de ossos longos. Avaliação oftalmológica se indicado. Recomenda duas modalidades de tratamento: (a) penicilina cristalina aquosa endovenosa diariamente por 14 dias ou (b) se não houver alteração liquórica: penicilina benzatina intramuscular em dose única.

Três informações são necessárias ao estarmos em frente à possibilidade de sífilis congênita: (a) existe infecção materna ativa, (b) existe infecção do recém-nascido e, por fim, (c) existe infecção do sistema nervoso central. Ao estudarmos as recomendações desses dois documentos, identifica-se a multiplicidade de situações maternas e nos recém-nascidos que podem ser encontradas na avaliação clínico-laboratorial de casos suspeitos. A multiplicidade de testes a serem solicitados indica que a sensibilidade e a especificidade dos testes se encontram aquém do ideal, e tal fato também se reflete na interpretação sempre relativa dos resultados. É plenamente justificada, portanto, a busca por testes com maiores sensibilidade e especificidade e que possam auxiliar a tomada de decisão clínica.

Por este motivo os testes moleculares - cujo objetivo é identificar diretamente presença do DNA da bactéria nas amostras biológicas - têm sido objeto de pesquisa nos últimos anos com sensibilidade bastante variável dependendo das amostras biológicas analisadas, estágio clínico da doença, gene-alvo e técnica de PCR utilizada. Ao contrário, excelente especificidade

tem sido demostrada nos estudos que avaliam os genes *tpp47* e *polA*, valores que variam entre 97 e 100% independentemente dos demais fatores.[30,31,32]

A técnica de PCR aninhada, nos últimos estudos, tem se demonstrado mais sensível e específica em relações às demais, especialmente nos estágios mais iniciais da doença em que a carga de DNA bacteriano é maior, entretanto são necessários estudos com maior número amostral para confirmação deste achado.[33]

As amostras que apresentam maior sensibilidade para o PCR são as de swab coletado de lesão de sífilis primária (cancro duro), que variam entre 72 e 95%,[34,35,36] enquanto as amostras de swab ou biópsia coletados de lesão de sífilis secundária demonstraram sensibilidade bem menor (entre 20% e 86%).[34,36,37,38]

O diagnóstico da neurossífilis continua sendo um desafio, uma vez que os marcadores sorológicos e as manifestações clínicas são inespecíficos. Um estudo que utilizou como parâmetro diagnóstico de neurossífilis os critérios do *European Guideline on the Management of Syphilis*, observou que dos 33 pacientes que preenchiam critérios para neurossífilis, 70 a 76% tiveram resultado de PCR positivo para os genes tpp47 e polA no LCR, respectivamente.[39]

Outros dois estudos avaliaram amostras de líquido cefalorraquidiano em pacientes infectados pelo vírus HIV e que apresentavam coinfecção pelo *T. pallidum*. O primeiro deles avaliou 12 pacientes com diagnóstico de sífilis latente, e observou positividade para a técnica de PCR aninhado em 5 (40%) das 12 amostras de LCR analisadas.[40] Curiosamente nenhum dos pacientes

que tiveram PCR positivo neste estudo apresentavam alterações na contagem celular, de glicose ou proteínas liquóricas. Nenhum deles tampouco apresentou VDRL positivo no líquor. O segundo estudo avaliou 40 pacientes com diagnóstico de neurossífilis, e observou uma sensibilidade de 42,5% e especificidade de 97% para PCR em amostras de líquor.[41]

O líquor dos recém nascidos expostos à sífilis durante a gestação também foi objeto de estudo para diagnóstico de sífilis congênita. Três trabalhos avaliaram a técnica de PCR em comparação ao RIT (*Rabbit Infective Test*) em líquido cefalorraquidiano de recém nascidos de gestantes diagnosticadas com sífilis durante a gestação que não receberam tratamento, e observaram uma sensibilidade para o PCR que variou entre 60 e 75%.[42,43,44]

Estudos que avaliaram as amostras de sangue e seus derivados (por exemplo: soro, plasma) apontaram uma baixa sensibilidade para o PCR neste tipo de amostra, com variação de 0% a 62% independentemente do estágio clínico em que os pacientes se encontravam.[30,31,36,37,45,46,47] Interessantemente, amostras de sangue capilar coletadas do lóbulo auricular apresentaram uma sensibilidade um pouco maior em comparação às do sangue total e soro, com valores que variaram de 54 a 66% quando pesquisados os genes tpp47 e polA neste tipo de amostra de pacientes com diagnóstico de sífilis latente. Estes resultados podem estar relacionados à hipótese de que o *T. pallidum* resida nos leitos capilares de pacientes com infecção latente.[47],[48],[49]

Nas amostras de sangue total ou soro de neonatos cujas mães foram diagnosticadas com sífilis e não foram tratadas durante a gestação, a sensibilidade dos testes moleculares foi maior do que a do RIT (67 a 94%).[42],[44]

O PCR no líquido amniótico de gestantes com diagnóstico de sífilis também se mostrou uma amostra com maior sensibilidade para o diagnóstico de sífilis congênita, variando entre 75 e 100% nos três estudos que utilizaram o RIT como padrão-ouro.[42],[50],[51]

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO REFERENCIAL TEÓRICO

1. Macedo De Souza E. A hundred years ago, the discovery of treponema pallidum. *An Bras Dermatol*. 2005;80(5):547-548.

2. Rowley J, Hoorn S Vander, Korenromp E, et al. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: Global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ*. 2019;97(8):548-562. doi:10.2471/BLT.18.228486

3. Brasil. Boletim Epidemiologico de Sífilis MS. *Ministério da Saúde*. 2019;Ano V n-1:43.

4. Walker DG, Walker GJA. Prevention of congenital syphilis - Time for action. *Bull World Health Organ*. 2004;82(6):401. doi:10.1590/S0042-96862004000600003

5. Korenromp EL, Rowley J, Alonso M, et al. Global burden of maternal and congenital syphilis and associated adverse birth outcomes-Estimates for 2016 and progress since 2012 (PLoS ONE (2019)14:2(e0211720)Doi:10.1371/journal.pone.0211720). *PLoS One*. 2019;14(7):1-17. doi:10.1371/journal.pone.0219613

6. World Health Organization. gho_sti_anc_syphilis_positive_2019.png (1123×793). Global Health Observatory Map Gallery: Percentage of antenatal care attendees positive for syphilis . http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/gho_sti_anc_syphilis_positive_2019.png. Published 2019. Accessed May 6, 2020.

7. Ghanem KG, Ram S, Rice PA. The modern epidemic of syphilis. *N Engl J Med*. 2020;382(9):845-854. doi:10.1056/NEJMra1901593

8. Benzaken AS, Pereira GFM, Cunha ARC da, Souza FMA de, Saraceni V. Adequacy of prenatal care, diagnosis and treatment of syphilis in pregnancy: a study with open data from Brazilian state capitals . *Cad Saúde Pública* . 2020;36.

9. Brasil. *Protocolo Clinico e Diretrizes Terapeuticas Para Prevencao Da*

Transmissão Vertical de HIV, Sífilis e Hepatites Virais.; 2019. doi:10.1177/1553350612460767

10. Ramos AN, Matida LH, Saraceni V, Veras MADSM, Pontes RJS. Control of mother-to-child transmission of infectious diseases in Brazil: Progress in HIV/AIDS and failure in congenital syphilis. *Cad Saude Publica*. 2007;23(SUPPL. 3):370-378. doi:10.1590/S0102-311X2007001500005

11. Cohen SE, Klausner JD, Engelman J, Philip S. Syphilis in the modern era: An update for physicians. *Infect Dis Clin North Am*. 2013;27(4):705-722. doi:10.1016/j.idc.2013.08.005

12. Liu H, Chen N, Yu J, et al. Syphilis-attributable adverse pregnancy outcomes in China: A retrospective cohort analysis of 1187 pregnant women with different syphilis treatment. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):1-8. doi:10.1186/s12879-019-3896-4

13. Woods CR. Syphilis in children: congenital and acquired. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2005;16(4):245-257. doi:10.1053/j.spid.2005.06.005

14. Lago EG, Vaccari A, Fiori RM. Clinical features and follow-up of congenital syphilis. *Sex Transm Dis*. 2013;40(2):85-94. doi:10.1097/OLQ.0b013e31827bd688

15. LaFond RE, Lukehart SA. Biological Basis for Syphilis. *Clin Microbiol Rev*. 2006;35(1):33-82. doi:10.1128/CMR.19.1.29

16. Avelleira JCR, Bottino G. Sífilis: Diagnóstico, tratamento e controle. *An Bras Dermatol*. 2006;81(2):111-126. doi:10.1590/s0365-05962006000200002

17. Lukehart SA. Laboratory diagnosis of syphilis. *Clin Immunol Newsl*. 1994;14(12):162-166. doi:10.1016/0197-1859(94)90004-3

18. Weinstock GM, Hardham JM, McLeod MP, Sodergren EJ, Norris SJ. The genome of Treponema pallidum: New light on the agent of syphilis. *FEMS Microbiol Rev*. 1998;22(4):323-332. doi:10.1016/S0168-6445(98)00017-5

19. Edmondson DG, Hu B, Norris SJ. Long-Term In Vitro Culture of the

Syphilis Spirochete Treponema pallidum subsp. pallidum. *MBio*. 2018;9(3). doi:10.1128/mBio.01153-18

20. Edmondson DG, Wormser GP, Norris SJ. In Vitro Susceptibility of Treponema pallidum subsp. pallidum to Doxycycline. *Antimicrob Agents Chemother*. July 2020. doi:10.1128/AAC.00979-20

21. A Brief History of Laboratory Diagnostics for Syphilis. https://asm.org/Articles/2020/January/A-Brief-History-of-Laboratory-Diagnostics-for-Syph. Accessed August 8, 2020.

22. Ministério da Saúde. Diagnóstico da Sifilis. *Secr Vigilância em Saúde Dep DST, Aids e Hepatites Virais*. 2014;Outubro:1-23.

23. Watson J. *DNA Recombinante: Genes e Genomas*. 3a edição. Artmed; 2009.

24. Theel ES, Katz SS, Pillay A. Molecular and Direct Detection Tests for Treponema pallidum Subspecies pallidum: A Review of the Literature, 1964–2017. *Clin Infect Dis*. 2020;71(Supplement_1):S4-S12. doi:10.1093/cid/ciaa176

25. Lin JS, Eder ML, Bean SI. Screening for Syphilis Infection in Pregnant Women: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA*. 2018;320(9):918-925. doi:10.1001/jama.2018.7769

26. Herremans T, Kortbeek L, Notermans DW. A review of diagnostic tests for congenital syphilis in newborns. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29(5):495-501. doi:10.1007/s10096-010-0900-8

27. Tsang RSW, Radons SM, Morshed M. Laboratory diagnosis of syphilis: A survey to examine the range of tests used in Canada. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2011;22(3):83-87. doi:10.1155/2011/627076

28. Workowski KA, Bolan GA, Prevention C for DC and. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR Recomm reports Morb Mortal Wkly report Recomm reports*. 2015;64(RR-03):1-137.

29. Janier M, Hegyi V, Dupin N, et al. 2014 European guideline on the management of syphilis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014;28(12):1581-1593. doi:10.1111/jdv.12734

30. Cruz AR, Pillay A, Zuluaga A V, et al. Secondary syphilis in cali, Colombia: new concepts in disease pathogenesis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(5):e690. doi:10.1371/journal.pntd.0000690

31. Martin IE, Tsang RSW, Sutherland K, et al. Molecular characterization of syphilis in patients in Canada: azithromycin resistance and detection of Treponema pallidum DNA in whole-blood samples versus ulcerative swabs. *J Clin Microbiol*. 2009;47(6):1668-1673. doi:10.1128/JCM.02392-08

32. Gayet-Ageron A, Sednaoui P, Lautenschlager S, et al. Use of Treponema pallidum PCR in testing of ulcers for diagnosis of primary syphilis. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(1):127-129. doi:10.3201/eid2101.140790

33. Wang C, Cheng Y, Liu B, et al. Sensitive detection of Treponema pallidum DNA from the whole blood of patients with syphilis by the nested PCR assay. *Emerg Microbes Infect*. 2018;7(1):83. doi:10.1038/s41426-018-0085-2

34. Heymans R, van der Helm JJ, de Vries HJC, Fennema HSA, Coutinho RA, Bruisten SM. Clinical value of Treponema pallidum real-time PCR for diagnosis of syphilis. *J Clin Microbiol*. 2010;48(2):497-502. doi:10.1128/JCM.00720-09

35. Orle KA, Gates CA, Martin DH, Body BA, Weiss JB. Simultaneous PCR detection of Haemophilus ducreyi, Treponema pallidum, and herpes simplex virus types 1 and 2 from genital ulcers. *J Clin Microbiol*. 1996;34(1):49-54.

36. Gayet-Ageron A, Ninet B, Toutous-Trellu L, et al. Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse biological samples. *Sex Transm Infect*. 2009;85(4):264 LP - 269. doi:10.1136/sti.2008.034314

37. Grange PA, Gressier L, Dion PL, et al. Evaluation of a PCR test for

detection of treponema pallidum in swabs and blood. *J Clin Microbiol*. 2012;50(3):546-552. doi:10.1128/JCM.00702-11

38. Palmer HM, Higgins SP, Herring AJ, Kingston MA. Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. *Sex Transm Infect*. 2003;79(6):479 LP - 483. doi:10.1136/sti.79.6.479

39. Castro R, Águas MJ, Batista T, Araújo C, Mansinho K, Pereira F da LM. Detection of Treponema pallidum Sp. Pallidum DNA in Cerebrospinal Fluid (CSF) by Two PCR Techniques. *J Clin Lab Anal*. 2016;30(5):628-632. doi:10.1002/jcla.21913

40. Fraga D, Muller AL, Czykiel MS, De Armas Y, Wissmann G, Goldani LZ. Detection of Treponema pallidum by semi-nested PCR in the cerebrospinal fluid of asymptomatic HIV-infected patients with latent syphilis. *Clin Lab*. 2014;60(12):2051-2054. doi:10.7754/clin.lab.2014.140605

41. Vanhaecke C, Grange P, Benhaddou N, et al. Clinical and Biological Characteristics of 40 Patients With Neurosyphilis and Evaluation of Treponema pallidum Nested Polymerase Chain Reaction in Cerebrospinal Fluid Samples. *Clin Infect Dis*. 2016;63(9):1180-1186. doi:10.1093/cid/ciw499

42. Grimprel E, Sanchez PJ, Wendel GD, et al. Use of polymerase chain reaction and rabbit infectivity testing to detect Treponema pallidum in amniotic fluid, fetal and neonatal sera, and cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*. 1991;29(8):1711 LP - 1718.

43. Sánchez PJ, Wendel Jr. GD, Grimprel E, et al. Evaluation of Molecular Methodologies and Rabbit Infectivity Testing for the Diagnosis of Congenital Syphilis and Neonatal Central Nervous System Invasion by Treponema pallidum. *J Infect Dis*. 1993;167(1):148-157. doi:10.1093/infdis/167.1.148

44. Michelow IC, Wendel GD, Norgard M V, et al. Central Nervous System Infection in Congenital Syphilis. *N Engl J Med*. 2002;346(23):1792-1798.

doi:10.1056/NEJMoa012684

45. Marfin AA, Liu H, Sutton MY, Steiner B, Pillay A, Markowitz LE. Amplification of the DNA polymerase I gene of Treponema pallidum from whole blood of persons with syphilis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001;40(4):163-166. doi:10.1016/s0732-8893(01)00275-9

46. Castro R, Águas MJ, Batista T, Araújo C, Mansinho K, Pereira F da LM. Detection of Treponema pallidum Sp. Pallidum DNA in Cerebrospinal Fluid (CSF) by Two PCR Techniques. *J Clin Lab Anal*. 2016;30(5):628-632. doi:10.1002/jcla.21913

47. Castro R, Prieto E, Manata MJ, et al. Detection of Treponema pallidum sp pallidum DNA in latent syphilis. 2014. doi:10.1258/095646207782716901

48. Lu Y, Wu Q, Wang L, Ji L. Molecular epidemiological survey of Treponema pallidum in pregnant women in the Zhabei District of Shanghai Clinical specimens. 2017;(January):391-396. doi:10.1099/jmm.0.000441

49. Manata MJ, Botas J, Pereira FM, Castro R, Prieto E. Molecular Subtyping of Treponema pallidum subsp . pallidum in. 2009;47(8):2510-2512. doi:10.1128/JCM.00287-08

50. Hollier LM, Harstad TW, Sanchez PJ, Twickler DM, Wendel GDJ. Fetal syphilis: clinical and laboratory characteristics. *Obstet Gynecol*. 2001;97(6):947-953. doi:10.1016/s0029-7844(01)01367-9

51. Nathan L, Bohman VR, Sanchez PJ, Leos NK, Twickler DM, Wendel GDJ. In utero infection with Treponema pallidum in early pregnancy. *Prenat Diagn*. 1997;17(2):119-123. doi:10.1002/(sici)1097-0223(199702)17:2<119::aid-pd39>3.0.co;2-t

3. JUSTIFICATIVA

A transmissão vertical da sífilis é um evento passível de prevenção, entretanto continua sendo um grave problema de saúde pública nos países subdesenvolvidos. É possível constatar isto considerando o fato de que no Brasil, entre os anos de 2018 e 2019, observou-se um aumento de 3,8 vezes na incidência de sífilis congênita no país, que passou de 2,4 para 9,0 casos novos por mil nascidos vivos. No mundo, a prevalência da sífilis em gestantes e seus desfechos desfavoráveis foi de aproximadamente 988 mil casos no ano de 2016. Isto revela a falência dos sistemas de saúde em diagnosticar e tratar adequadamente as gestantes portadoras de sífilis.

Para o diagnóstico da sífilis congênita, atualmente, são utilizados critérios clínicos e laboratoriais que, em conjunto, sugerem ou não o diagnóstico. A multiplicidade de testes solicitados indica que a sensibilidade e a especificidade destes se encontram aquém do ideal e refletem uma interpretação relativa dos resultados.

Por este motivo, faz-se necessária a busca por testes com maiores sensibilidade e especificidade e que possam auxiliar a tomada de decisão clínica.

Neste estudo, é avaliada a hipótese de que as crianças com PCR positivos para a detecção do genoma do *T. pallidum* em amostras de sangue e líquido cefalorraquidiano sejam portadores de sífilis congênita, considerando como “padrão-ouro” o atual fluxograma para o diagnóstico de sífilis congênita e

de neurossífilis, determinado pelas “Diretrizes brasileiras para o diagnóstico e controle da sífilis congênita”, do Ministério da Saúde do Brasil.[9]

É importante também avaliar o comportamento da PCR para a detecção do genoma de *Treponema pallidum* em amostras de sangue e fluido cerebrospinal em recém-nascidos em diferentes situações de risco para sífilis congênita, com o intuito de encontrar métodos diagnósticos seguros que permitam o diagnóstico mais preciso da sífilis congênita e que também auxilie a tomada de decisão clínica em relação ao tratamento destes recém-nascidos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar frequência da positividade da PCR para a detecção do genoma de *Treponema pallidum* em amostras de sangue e líquido cefalorraquidiano, em recém-nascidos sob diferentes situações de risco para sífilis congênita.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Desenvolver uma técnica de PCR para a detecção do DNA de *Treponema pallidum* em amostras de sangue e líquido cefalorraquidiano, a partir de técnicas descritas na literatura.

4.2.2 Determinar a frequência de sinais clínicos de sífilis congênita ao nascimento em recém-nascidos em diferentes situações de risco para sífilis congênita.

4.2.3 Verificar possíveis fatores de risco para a ocorrência de sífilis congênita e de neurossífilis em recém-nascidos com diferentes situações de risco para sífilis congênita, considerando aspectos epidemiológicos, histórico de tratamento e acompanhamento pré-natal.

5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto foi aprovado pelas Comissões de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) (parecer 2.547.348) e do Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA) (Centro Coparticipante), sob o número 3.432.633. (Anexos 1 e 2)

Os autores da pesquisa assinaram o Termo de Compromisso para utilização de dados e a Declaração de manuseio de materiais biológicos. (Anexos 3 e 4).

Os pacientes que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. (Apêndice 1)

As condições para coleta, armazenamento e transporte das amostras, bem como o detalhamento da técnica de PCR realizada neste estudo estão descritas nos Apêndices 3 e 4.

6. ARTIGO REDIGIDO EM INGLÊS

Polymerase Chain Reaction (PCR) for *Treponema pallidum* genome in blood samples and cerebrospinal fluid of newborns in different risk for congenital syphilis - a sample from south of Brazil

Rafaela Caroline Clarinda Melo[1,2]
Mauro Cunha Ramos[1]
Maria Lucia Rossetti[3]
Vera Mileide Trivellato Grassi[3]
Maurício Colvero Obal[4]
Renan Rangel Bonamigo[1,2,4,5]

[1]Sanitary Dermatology Outpatient Clinic, State Health Secretariat of Rio Grande do Sul, Brazil
[2] Pathology Postgraduate of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Brazil
[3]Molecular Biology Laboratory of Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Brazil
[4]Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Brazil
[5]Faculty of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

Introduction

Syphilis is a sexually transmitted infection (STI) caused by the *Treponema pallidum* spirochete bacterium which can be sexually or vertically transmitted.[1] It is a systemic disease, exclusive of humans and curable with appropriate antibiotic treatment.

Recently, the Brazilian Ministry of Health published a report revealing a 3.8-fold increase in the incidence of congenital syphilis (CS) between 2010 and 2018.[2] These data reflect a serious public health problem in underdeveloped and developing countries, since vertical transmission of syphilis is an absolutely preventable event.

The prevalence of syphilis in pregnant women and its unfavorable outcomes worldwide was estimated as 988.000 cases in 2016. It resulted in 143.000 abortions or fetal deaths, 14.000 neonatal deaths, 41.000 premature or low birth weight and 109.000 infected newborns who developed clinical complications due to syphilis infection.[3]

This burden of morbidity and mortality, however, is not proportionally distributed, with evident overload in middle and low income countries.[4] In those countries where investment in health is lower, access to health services is more difficult, including access to antenatal care.

Currently, for the diagnosis of congenital syphilis, clinical and laboratory criteria are used, which together suggest or not the diagnosis. The multiplicity of tests requested indicates that their sensitivity and specificity are less than ideal, and national and international institutions establish scenarios in which the

infection is considered present, probable or possible. For this reason, it is necessary to search for new tests that can assist clinical decision-making.

Considering the current epidemiological importance of maternal-fetal syphilis and the scarce publication about diagnostic tests for congenital syphilis, the aim of this study was to investigate CS using a molecular assay in samples of whole blood and cerebrospinal fluid (CSF) of newborns, and also to evaluate the factors related to mother-fetus exposure.

Methods

Settings

This cross-section study was conducted between August, 2019 and February, 2020, and involved newborns who were admitted at the Obstetrics Center of Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), Brazil.

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre and Committee of Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Written consent for publication was obtained from all the relatives' patients. The epidemiological and clinical data, and complementary exams results were obtained from their medical records.

During the study period, a total of 57 newborns were studied, of whom 35 composed group 1 – consisted of newborns exposed to syphilis - and 22 composed group 2 (the comparative group), consisted of newborns not

exposed to syphilis. Group 1 was made up of newborns exposed to syphilis, whose mothers had clinical and/or serological diagnosis of syphilis during pregnancy. Group 2 was made up of newborns whose mothers returned negative results in treponemal serological tests for syphilis during pregnancy, and had no history of syphilis exposition in the past, but the infants had an indication for blood and CSF collection for other reasons (such as early neonatal sepsis, congenital toxoplasmosis infection or herpes). Two patients were excluded because they did not fulfill the inclusion criteria for the comparative group: they had clinical indication to investigate exposition to toxoplasmosis, but their mothers had history of syphilis treatment before pregnancy, the reason why their treponemal tests were positive during prenatal and delivery, but nontreponemal tests were negative.

The working definition of CS and maternal syphilis cases applied in the present study are based on the recommendations of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and Brazilian Health Ministry[5,6,7]. Maternal syphilis was assumed when during pregnancy, delivery or postpartum: (a) there was clinical signs of syphilis and a reactive test (treponemal and/or nontreponemal, with any title); (b) women were asymptomatic and had a reactive test (treponemal or nontreponemal, with any title) and no prior treatment record, and (c) women had a treponemal and a nontreponemal test reactive, regardless of symptomatology and previous treatment for syphilis.[7] Congenital syphilis was defined as any case of child borne by a mother with clinical and/or serological diagnosis of syphilis conducted at birth, who was not treated or had inappropriate treatment during prenatal care. The diagnostic criteria for CS based on four different scenarios according to CDC is shown in

chart 1.The Brazilian Ministry Health flowchart for diagnosis of CS is very similar to the CDC's guidelines, except that PCR is not available in the clinical context, only for research purposes.[6,7]

Chart 1. Diagnostic criteria for Congenital Syphilis, according to CDC (2015)[5]

Scenario 1: Proven or highly probable congenital syphilis	Any neonate with: a) an abnormal physical examination that is consistent with congenital syphilis **or**; b) a serum quantitative nontreponemal serologic titer that is fourfold higher than the mother's titer[¶] **or**; c) a positive darkfield test or PCR of lesions or body fluid(s).
Scenario 2: Possible Congenital Syphilis	Any neonate who has a normal physical examination and a serum quantitative nontreponemal serologic titer equal to or less than fourfold the maternal titer and one of the following: a) mother was not treated, inadequately treated, or has no documentation of having received treatment **or**; b) mother was treated with erythromycin or a regimen other than those recommended in these guidelines (i.e., a nonpenicillin G regimen)[††] **or**; c) mother received recommended treatment <4 weeks before delivery.
Scenario 3: Congenital Syphilis less likely	Any neonate who has a normal physical examination and a serum quantitative nontreponemal serologic titer equal to or less than fourfold the maternal titer and **both** of the following are true: a) mother was treated during pregnancy, treatment was appropriate for the stage of infection, and treatment was administered >4 weeks before delivery **and**; b) mother has no evidence of reinfection or relapse.
Scenario 4: Congenital Syphilis unlikely	Any neonate who has a normal physical examination and a serum quantitative nontreponemal serologic titer equal to or less than fourfold the maternal titer and **both** of the following are true: a) mother's treatment was adequate before pregnancy **and**; b) mother's nontreponemal serologic titer remained low and stable before and during pregnancy and at delivery (VDRL <1:2; RPR <1:4).

[¶]The absence of a fourfold or greater titer for a neonate does not exclude congenital syphilis; [††] A women treated with a regimen other than recommended in CDC guidelines should be considered untreated.

On the clinical-epidemiological variables, the following data were collected from both groups: city of origin, maternal age, newborn sex gender and birth weight, gestational age, number of medicals during the prenatal period, first prenatal medical appointment, prenatal serology tests, adequate

treatment of the mother and partner, use of illegal drugs, consumption of alcohol and tobacco, coinfection with human immunodeficiency virus (HIV), exposure to other infectious microorganisms during pregnancy (*Toxoplasma gondii*, *Herpes simplex virus*), and other chronic diseases.

The newborn infants were considered preterm when the gestation length was less than 37 weeks, and the classification for fetal growth was based on the birth weight/gestational age index and curves recommended by World Health Organization in 1996.[8] Other clinical signs consistent with CS were considered when mentioned in the medical records.

All the patients' mothers selected for the present study were screened using the nontreponemal Rapid Plasma Reagin test (RPR) test and quimioluminescent treponemal test at the moment of delivery in the ISCMPA laboratory. Samples of blood and cerebrospinal fluid (CSF) were collected from newborns who had recommendations for laboratorial analysis of these biological samples according to the standard clinical protocols of Hospital. The purpose of non-maleficence in this study was applied by the use of biological samples that would already be collected from newborns according to hospital clinical routines, to avoid submitting infants to other unnecessary procedures or interventions.

Children who had been exposed to vertical syphilis (exposed group) were evaluated with complete blood count, serum non-treponemal test (RPR), CSF analysis for RPR, cell count, glucose and protein, and long bone radiographs.

Children who had not been exposed to vertical syphilis during the pregnancy (comparative group) were evaluated according to their clinical indication (ex. early and late neonatal sepsis, vertical exposition to toxoplasmosis or herpes virus).

Conventional PCR was performed in all biological samples of whole blood and CSF collected. We developed the PCR technique to be used based on the description made by Palmer *et al*.[9]

After DNA extraction, two primers were used to encode the membrane protein of 47KDa *T. pallidum* gene (KO3: 5' GAAGTTTGTCCCAGTTGCGGTT-3'; KO4: 5'CAGAGCCATCAGCCCTTTTCA 3'). These primers were described to amplify a fragment of 260 bp. The amplification conditions were: 95°C for 2 minutes, followed by 35 cycles of 95°C for 20 seconds, 62°C for 20 seconds, and a final extension of 72°C for 20 seconds. The reaction amplified fragments of 260 bp, and these products were analyzed by electrophoresis using a 2% agarose gel. (Figure 1) Positive control included *T. pallidum* DNA extracted from genital ulcers of patients who were diagnosed with primary syphilis. Negative control was composed by a solution with only the mixture of the reagents, free of DNA.

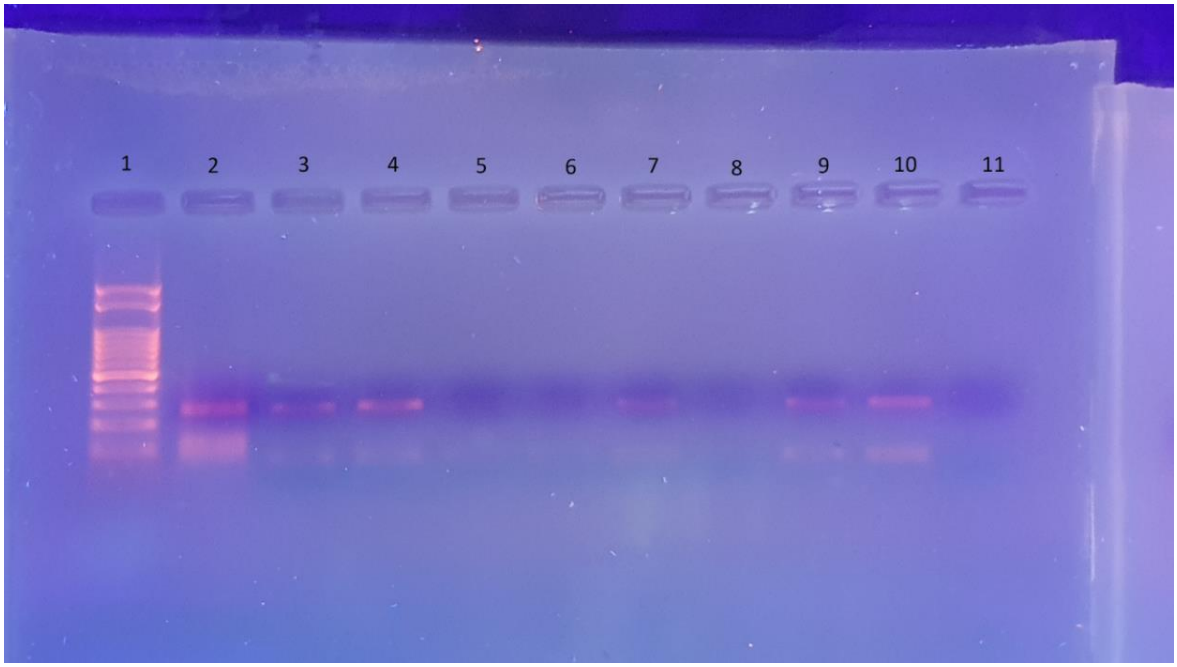

Figure 1. Representative image of an electrophoretic analysis on agarose gel 2% of the PCR products obtained with specific primers for *T. pallidum* from blood samples extracted from dried blood spot. 1: molecular size marker 100pb. 2: positive control; 3, 4, 7, 9 e 10:positive samples for *T. pallidum;* 5, 6 e 8: negative samples for *T. pallidum*; 11: negative control.

Statistical analyses

Demographic and clinical variables were described. Qualitative variables were described as absolute numbers and percentages. Quantitative variables were described as mean and standard deviation. The relationship between the results of PCR in biological samples and the clinical variables were described in its frequency by percentage. Data storage and analysis were performed using EPI Info 7.

The sensivity and specificity of the test were not calculated because there is no gold standard in clinical practice that can validate the PCR assay.

Results

The mean age of women was 26,45 (±SD: 5.87) years, and the mean age of both groups were similar. Table 1 presents these data and the set of data related to the findings described below.

There was only one patient - from the group 1 - who had not attended to prenatal care. Most of the women had six or more medical appointments during prenatal in both groups. The two groups were also similar in terms of the beginning of prenatal care, more than 50% of them started in the first trimester of pregnancy.

Comparative group had significant more stillbirths and consequently lower birth weight[7]. About 41% percent of newborns were premature in the group 2 and the mean birth weight for this group was 2688.09 (±SD:879.47) grams. On the other hand, 8.5% of the newborns were premature in the group 1 and the mean birth weight for this group was 3557.14 (±SD: 384.66) grams. Regarding classification for fetal growth based on the birth weight/gestational age index, three newborns were considered small for gestational age, one from group 1 and two from group 2.

Tobacco was the most commonly drug used during pregnancy, and the total number of smoking patients was similar in both groups. The use of alcohol was observed in two patients of the comparative group, while the use of illicit drugs was reported by three patients of the group 1. The use of these substances during pregnancy does not appear to be related to prematurity, low birth weight (LBW) or fetal growth restriction (FGR) in this sample.

HIV infection was observed at the same frequency in both groups (one patient in each group). Of note, only the patient in the group 2 did not treat HIV during pregnancy.

Two patients from the group 1 had history of previously exposition to syphilis, treated in the past. They were considered to be re-exposed to syphilis during the current pregnancy, the reason why their newborns were investigated for congenital syphilis with complementary exams.

Mothers from the group 2 were more likely to have chronic diseases. The most common were gestational diabetes mellitus (7%), followed by hypothyroidism (5%). The other chronic conditions observed less frequently were chronic arterial hypertension, obesity, sickle cell trait and epilepsy. Five patients (22,7%) from the group 2 had at least one of these conditions, while three patients (8,6%) from the group 1 had one or more of these conditions. The presence of chronic diseases does not seem to be directly related to stillbirths, LBW or FGR.

All newborns in the group 1 had CSF investigated because of vertical exposure to syphilis. One of them was also exposed to toxoplasmosis during pregnancy. In the group 2, five newborns had indication for CSF analysis due to vertical exposure to toxoplasmosis and one because of exposure to *Herpes simplex* virus during delivery. Most part of newborns in the comparative group was investigated because of early neonatal sepsis, and some of them were preterm. Stillbirths in the group 2 were related to maternal conditions as: prelabor rupture of membranes (3), preeclampsia (1), group B streptococcal colonization (1), adramnia (1) and HIV without treatment (1). In the group 1

there were three preterm births: one patient did not have any chronic disease or obstetric condition, one patient presented gestational diabetes mellitus and one patient whose newborn had clinical signs of early congenital syphilis.

A total of 55 samples of CSF and 54 of whole blood were collected for this study. Two patients from the group 1 had only blood samples collected due to the technical impossibility of performing lumbar puncture or error in the storage samples, and three patients (two from the group 1 and one from the group 2) had only CSF collected.

Table 1. Socio-demographic and delivery variables, sexual, reproductive and health characteristics, and variables related to prenatal care. ISCMPA, 2019–2020

Variable	**NB exposed to syphilis (group 1) N / n**	% / SD	**NB comparative (group 2) N / n**	% / SD	Average
Age (mean in years)	26,7	SD: 5,96	26,0	SD: 5,85	26,45
Prenatal care	34 / 35	97,1%	22 / 22	100%	98,2%
Pre-natal care initiated in					
First trimester	16 / 34	47%	13 / 22	59,1%	51,8%
Second trimester	10 / 34	29,5%	06 / 22	27,3%	28,6%
Third trimester	02 / 34	5,9%	00 / 22	0%	3,6%
Missing data	06 / 34	17,6%	03 / 22	13,6%	16%
N° medical appointments					
No prenatal care	01 / 35	2,8%	00 / 22	0%	1,8%
1 to 5 medicals	08 / 35	22,8%	05 / 22	22,7%	22,8%
6 or more medicals	20 / 35	57,2%	15 / 22	68,2%	61,4%
Missing data	06 / 35	17,2%	02 / 22	9,1%	14%
Gestational age					
Term	32 / 35	91,5%	13 / 22	59,1%	79%
Preterm	03 / 35	8,5%	09 / 22	40,9%	21%
Post term	00 / 35	0%	00 / 22	0%	0%
Birth weight / gestational age index					
SGA	01 / 35	2,9%	02 / 22	9,1%	5,2%
AGA	33 / 35	94,2%	20 / 22	90,9%	93%
LGA	01 / 35	2,9%	00 / 22	0%	1,8%
Birth weight (mean in grams)	3557,14	SD: 384,66	2688,09	SD: 879,47	3037,50
Tobacco use (yes)	05 / 35	14,2%	04 / 22	18,2%	15,8%
Alcohol use (yes)	00 / 35	0%	02 / 22	9,1%	3,5%
Ilicit drugs use (yes)	03 / 35	8,5%	00 / 22	0%	5,2%
HIV infection (yes)	01 / 35	2,9%	01 / 22	4,5%	3,5%
History of syphilis treated in the past (yes)	02 / 35	5,7%	00 / 22	0%	3,5%

Other chronic diseases					
Gestational diabetes mellitus	02 / 35	5,7%	02 / 22	9,1%	7%
Hypothyroidism	01 / 35	2,9%	02 / 22	9,1%	5,3%
Other	01 / 35	2,9%	03 / 22	13,6%	7%
Motivation for CSF investigation					
Exposure to syphilis	35 / 35	100%	00 / 22	0%	61,4%
Exposure to toxoplasmosis	01 / 35	1%	05 / 22	22,7%	10,5%
Early neonatal sepsis	00 / 35	0%	15 / 22	68,2%	26,3%
Other	00 / 35	0%	02 / 22	9,1%	3,5%

NB: newborn; SGA: small for gestational age; AGA: appropriate for gestational age; LGA: large for gestational age

All CSF samples from group 1 were analyzed for cell count, protein, glucose and RPR. The RPR analyses were non-reactive in all CSF samples in this group. Protein, glucose and white blood cells were also normal for all samples in both groups. Some patients had isolated increases in red cell count in CSF due to incidental trauma during lumbar puncture.

Whole blood samples were collected from patients from the group 1 for RPR analysis. Additionally, blood was also collected from the comparative group patients for specific analysis according to their clinical indication. (Table 1)

PCR analysis was positive in five CSF and two whole blood samples in the group 2. A total of five patients had at least one sample positive for PCR. It is noteworthy that two of these patients had both CSF and whole blood positive for PCR analysis.

Regarding the group 1, PCR analysis was positive for 22 (66,7%) CSF and 19 (57,6%) whole blood samples. Fourteen patients had both CSF and whole blood samples positive for PCR (subgroup 1a). Eight patients had only positive PCR for their CSF samples (subgroup 1b), five had positive PCR only

for whole blood samples (subgroup 1c) and eight patients had both CSF and whole blood negative results for PCR analysis (subgroup 1d). (Figure 2)

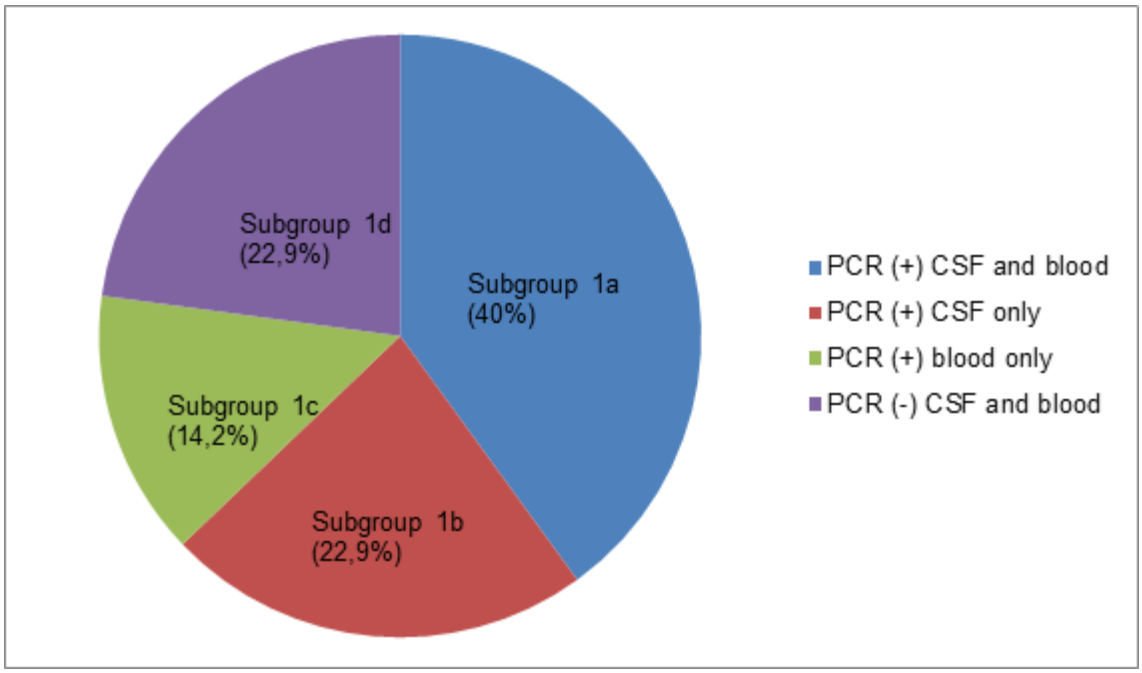

Figure 2. Classification of the group 1 patients (exposed to syphilis), according to their PCR results in biological samples

Twenty five newborns in the group 1 had reactive RPR results in whole blood samples. All of them had RPR titers equal to or less than their maternal titers. (Table 2) Ten newborns and six women from this group had nonreactive RPR results for these samples. There was no relation identified between RPR titers (maternal and neonatal) and positivity in PCR assay.

Most women had documented penicillin treatment during pregnancy (74,3%) in all subgroups. On the other hand, only 20% of the sexual partners had documentation of penicillin treatment during pregnancy. (Table 2) It is noteworthy that women who had less than six medical appointments during prenatal care were less likely to treat syphilis during pregnancy.

Long bone radiographs were more likely to have normal findings in subgroups 1a, 1b and 1d. Only subgroup 1c had 60% of abnormal radiographic exams, and the findings were suggestive of congenital syphilis, but not specific. Symmetric localized demineralization of the medial portion of the proximal long bone metaphysis and metaphyseal lucent bands may occur in congenital syphilis but can also appear in neonatal hyperparathyroidism and osteomyelitis. The missing data was related to radiographs that did not have been evaluated and reported by radiologists. (Table 2)

Table 2. Group 1 characteristics sorted by subgroups according to PCR results in biological samples

	PCR (+) CSF/blood Subgroup 1a	PCR (+) CSF Subgroup 1b	PCR (+) blood Subgroup 1c	PCR (-) CSF/blood Subgroup 1d	Total
Newborn RPR n (%)					
> maternal	4 (28,5%)	4 (50%)	3 (60%)	3 (37,5%)	14 (40%)
< maternal	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
equal to maternal	10 (71,5%)	4 (50%)	2 (40%)	5 (62,5%)	21 (60%)
Long bone radiography n (%)					
Normal	7 (50%)	5 (62,5%)	1 (20%)	3 (37,5%)	16 (45,7%)
Abnormal	2 (14,3%)	1 (12,5%)	3 (60%)	3 (37,5%)	9 (25,7%)
Missing	5 (35,7%)	2 (25%)	1 (20%)	2 (25%)	10 (28,6%)
Documented treatment during pregnancy n (%)					
Penicilin	10 (71,5%)	6 (75%)	4 (80%)	6 (75%)	26 (74,3%)
Other	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
No treatment	4 (35,7%)	2 (25%)	1 (20%)	2 (25%)	9 (25,7%)
Documented sexual partner treatment n (%)					
Penicilin	2 (14,3%)	1 (12,5%)	2 (40%)	2 (25%)	7 (20%)
Other	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
No treatment	12 (85,7%)	7 (87,5%)	3 (60%)	6 (75%)	28 (80%)
Newborn treatment n (%)					
Penicilin G Crystalline	10 (71,5%)	5 (62,5%)	4 (80%)	6 (75%)	25(71,5%)
Peniclin G Benzathine (single dose)	4 (28,5%)	2 (25%)	1 (20%)	0 (0%)	7 (20%)
No treatment	0 (0%)	1 (12,5%)	0 (0%)	2 (25%)	3 (8,5%)

Nearly 72% of the newborns exposed to syphilis were treated with intravenous penicillin for 10 days in hospital. Twenty percent of them were treated with one dose of intramuscular penicillin G benzathine and 8,5% did not

receive any treatment. (Table 2) One of these patients belonged to subgroup 1b and two from subgroup 1d. The subgroup 1b patient did not receive any treatment because both maternal and newborn RPR results in the blood were non-reactive. Also, the mother was treated with three doses (7.2 million UI) of penicillin G benzathine during pregnancy and the others complementary exams were all normal. One of the patients from subgroup 1d did not receive any treatment for the same reason. Both patients had outpatient follow-up after hospital discharge. The other patient from subgroup 1d evaded from the hospital and did not wait for the exam results. For this reason, this newborn did not treat congenital syphilis. This was the same patient who did not attend to prenatal care and also didn't treat syphilis during pregnancy. All of newborn's complementary exam results were normal.

One subgroup 1b patient had clinical signs of early congenital syphilis: hepatosplenomegaly, jaundice and nasal discharge. In complementary exams thrombocytopenia was observed, with normal levels of hemoglobin and elevated white blood cell count. This patient had four prenatal appointments, but did not treat syphilis during prenatal. Their RPR had higher titers, the mother's nontreponemal test was 1:128 and the newborn's was 1:32. The newborn also had elevation on serum bilirubin and C-reactive protein levels. Blood cultures were negative. He was born prematurely (gestational age was 35 weeks) and with low birth weight (2150 grams), but he did not have FGR according to birth weight/gestational age index. During hospitalization this child developed seizures. This patient had a positive PCR result for the CSF sample, but his whole blood sample was negative. His long bone radiography was missing, and he was treated with intravenous penicillin G crystalline for 10 days.

Discussion

In this study, there was equivalence between the newborns exposed to syphilis (group 1) and the comparative newborns (group 2) related to the number of prenatal appointments and the beginning time of the follow-up. This information is consistent with the data observed by Benzaken et al,[10] who found out that although there is a high prenatal coverage in the city of Porto Alegre, there is still a portion of the population that is more susceptible to infection with syphilis during pregnancy. Notably, women in the case group 1 who had less than five medical appointments were less likely to treat syphilis during pregnancy.

The groups were also similar in maternal age, HIV infection, use of tobacco and alcohol. Women in the group 1 were more likely to use illicit drugs during pregnancy, which may reflect the relationship between the exposure to syphilis and social vulnerability.

The fact that only 20% of sexual partners have been investigated and/or treated for syphilis shows the need to develop policies that seek to include and maintain the partner in the prenatal care. This may be the reason why, although most women were treated for syphilis during prenatal, therapeutic failure was identified during the follow-up. Some therapeutic failures can also be explained by inadequate penicillin regimen for the syphilis clinical stage of mothers.

The only newborn who had clinical signs of congenital syphilis, had no report of penicillin treatment during prenatal care and presented (both neonate

and the mother) higher RPR titers. This infant developed seizures during hospitalization, which could not be explained by any other reason than congenital syphilis, which leads us to believe that this infant had clinical signs of neurosyphilis. It is interesting to note that, although the analysis of proteins, glucose and cell count of CSF were normal, as well as negative RPR, the DNA of *T. pallidum* was detected in this CSF sample. Currently, the major difficulty for the diagnosis of neurosyphilis lies in the fact that there is no exam with high sensitivity to predict this condition in newborns. The sensitivity of VDRL in CSF samples of neonates is 54% and its significance is not clear yet, since there may be false positives (related to maternal nontreponemal immunoglobulin antibodies that cross the placenta and diffuse into the fetal CSF or contamination of the CSF with blood from a traumatic lumbar puncture) and false negatives (neonates with initial nonreactive CSF VDRL may subsequently develop signs of neurosyphilis). Likewise, the sensitivities of pleocytosis (elevation of white blood cells in CSF) and elevation of CSF proteins are low, 38% and 56% respectively.[11] The literature estimates that CNS involvement by *T. pallidum* occurs in 40% of infants who have clinical, laboratory, or radiographic abnormalities of congenital syphilis, but is infrequent in infants without such manifestations.[11,12,13] Few studies have tested the PCR assay for CSF samples of newborns exposed to syphilis, and sensitivity ranged from 60 to 75% compared to RIT.[11,14,15] Michelow found positive PCR results in cerebroespinal fluid of newborns exposed to syphilis who had negative results for RIT, which may reflect false positive PCR test results or maybe that sample volume used for rabbit inoculation was insufficient.[11]

We used Elute filter paper cards for storage of blood samples in order to avoid contamination of blood samples previously handled in the ISCMPA laboratory, and because of the convenience of easy collection (the sample can be collected at the same time as “neonatal screening”) and easy storage. There is no such study using dried blood spots for PCR assay for *T. pallidum*. We based our hypothesis on several other studies that use dried blood spot to extract DNA of other biological agents such as hepatitis C and HIV.[16,17]

The presence of a small amount of circulating *T. pallidum* in the peripheral blood may explain why PCR was negative in the blood sample of the newborn with clinical signs of syphilis, once sensivity of this exam in this biological sample is highly variable.[11,14]

This was the first study to compare the PCR results in samples of newborns exposed to syphilis to a comparative group. Whereas the gold standard flowchart currently used for the diagnosis of congenital syphilis does not assure the infection, the existence of a comparative group allow us to assess the possibility of false positive PCR results, or that the current gold standard diagnostic flowchart may be missing exposed and/or infected infants, although this second hypothesis is less likely considering the sensitivity of RPR and rapid test for acquired syphilis is 98% and 94,5%, respectively.[18] The other few studies about this subject compared PCR results to the rabbit infective test (RIT) or the results of PCR newborn samples to their mothers’ PCR results.[11,14,19]

Since there is no standardized technique PCR for detection of *T. pallidum* DNA, many studies tried to develop the most suitable technique for

different biological samples. It seems that nested PCR is more sensitive compared to others, but further studies are necessary to confirm this hypothesis.[20] Besides that, sensitivity of PCR also depends on the biological sample and the target gene. We have developed a conventional PCR-based technique described by Palmer in 2003 for genital ulcer samples.[9] We have found that conventional PCR targeting *tpp47* was positive in 66,7% (22/33) of CSF and 57,6% (19/33) of whole blood samples in neonates exposed to syphilis. On the other hand, also five CSF and two whole blood samples were positive in the comparative group, which cannot be explained by exposure to syphilis because all of these mothers had nonreactive treponemal and nontreponemal tests at the time of delivery, except if we considered the tests of these mothers as false negative and / or there was traces of treponemal antigens in patients already treated and negative in their tests. It could also be explained by a possible contamination of the samples when collecting, storing or performing the PCR. The phenomenon of immunological window - where the patient is in the early stages of the infection and there was no time yet for the immune system to produce detectable antibodies - could also explain these PCR results, although this hypothesis is less likely.

Thus, despite PCR may be a promising method to compose the evaluation of suspected cases of CS, there is still a need to continue studies on the technique and the importance of use.

Finally, this article sheds light on an often neglected topic, which still has little published data and presents an overview of clinical variables of interest.

References

1.Macedo De Souza E. A hundred years ago, the discovery of treponema pallidum. *An Bras Dermatol*. 2005;80(5):547-548.

2.Brasil. Boletim Epidemiologico de Sífilis MS. Ministério da Saúde. 2019;Ano V n-1:43. www.aids.gov.br.

3. Korenromp EL, Rowley J, Alonso M, et al. Global burden of maternal and congenital syphilis and associated adverse birth outcomes-Estimates for 2016 and progress since 2012. PLoS One. 2019;14(7):1-17.

4.World Health Organization. gho_sti_anc_syphilis_positive_2019.png (1123×793). Global Health Observatory Map Gallery: Percentage of antenatal care attendees positive for syphilis . http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/gho_sti_anc_syphilis_positive_2019.png. Published 2019. Accessed August 10, 2020.

5.Workowski KA, Bolan GA, Prevention C for DC and. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. MMWR Recomm reports Morb Mortal Wkly report Recomm reports [Internet]. 2015 Jun 5;64(RR-03):1–137. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26042815

6.Brasil. Protocolo Clinico e Diretrizes Terapeuticas Para Prevencao Da Transmissão Vertical de HIV, Sífilis e Hepatites Virais.; 2019.

7.Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis, Aids e Hepatites Virais. Nota Informativa nº 02-SEI/2017: DIAHV/SVS/MS. Altera os critérios de definição de casos para notificação de sífilis adquirida, sífilis em gestantes e sífilis congênita. Brasília, DF: 13 out. 2017. Disponível em: http://portalsinan.saude.gov.br/images/documentos/Agravos/SifilisGes/Nota_Informativa_Sifilis.pdf. Acesso em: 3 agosto 2020.

8. World Health Organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Reporto f a WHO Expert Committee. World Health Organ Tech Rep Ser 1995:854.

9. Palmer HM, Higgins SP, Herring AJ, Kingston MA. Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. Sex Transm Infect. 2003 Dec 1;79(6):479–483.

10. Benzaken AS, Fernando G, Pereira M, Moreno F, Souza A De. Adequacy of prenatal care , diagnosis and treatment of syphilis in pregnancy : a study with open data from Brazilian state capitals. *Cad Saúde Pública* . 2020;36.

11. Michelow IC, Wendel GD, Norgard M V, Zeray F, Leos NK, Alsaadi R, et al. Central Nervous System Infection in Congenital Syphilis. N Engl J Med [Internet]. 2002 Jun 6;346(23):1792–8.

12.Woods CR. Syphilis in children: congenital and acquired. Semin Pediatr Infect Dis. 2005;16(4):245-257.

13. Beeram MR, Chopde N, Dawood Y, Siriboe S, Abedin M. Lumbar puncture in the evaluation of possible asymptomatic congenital syphilis in neonates. J Pediatr. 1996;128(1):125-129.
14. Grimprel E, Sanchez PJ, Wendel GD, Burstain JM, McCracken GH, Radolf JD, et al. Use of polymerase chain reaction and rabbit infectivity testing to detect Treponema pallidum in amniotic fluid, fetal and neonatal sera, and cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol. 1991 Aug 1;29(8):1711–18
15. Sánchez PJ, Wendel Jr. GD, Grimprel E, Goldberg M, Hall M, Mireles OA, et al. Evaluation of Molecular Methodologies and Rabbit Infectivity Testing for the Diagnosis of Congenital Syphilis and Neonatal Central Nervous System Invasion by Treponema pallidum. J Infect Dis. 1993 Jan 1;167(1):148–57.
16. Anitha D, Jacob SM, Ganesan A, Sushi KM. Diagnosis of HIV-1 infection in infants using dried blood spots in Tamil Nadu, South India. *Indian J Sex Transm Dis AIDS*. 2011;32(2):99-102
17. Bennett S, Gunson R, Mcallister G, Hutchinson S, Goldberg D, Cameron S, et al. Detection of hepatitis C virus RNA in dried blood spots. J Clin Virol. 2012 Mar 12;54:106–9.
18. Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis, Aids e Hepatites Virais. Manual Técnico para Diagnóstico da Sífilis. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2016.
19. Casal C, Araújo EDC, Corvelo TCDO. Risk factors and pregnancy outcomes in women with syphilis diagnosed using a molecular approach. Sexually Transmitted Infections 2013;89:257-261.
20. Wang C, Cheng Y, Liu B, Wang Y, Gong W, Qian Y, et al. Sensitive detection of Treponema pallidum DNA from the whole blood of patients with syphilis by the nested PCR assay. Emerg Microbes Infect. 2018 May;7(1):83

7. CONCLUSÕES

O estudo atual buscou desenvolver a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção do DNA do *Treponema pallidum* em amostras de sangue e líquido cefalorraquidiano (LCR) de recém-nascidos expostos à sífilis em comparação com um grupo de recém-nascidos sem esta exposição. Consideramos importante a existência do grupo para comparação, uma vez que a exposição vertical à sífilis não é capaz de confirmar a infecção por sífilis congênita (SC), sendo necessários diversos exames com baixa sensibilidade e especificidade que, em conjunto, sugerem ou não o diagnóstico de SC. Não houve relação direta entre os resultados destes exames com a positividade do PCR nas amostras biológicas nesta população estudada.

Considerando que não há padronização da técnica, desenvolvemos nosso exame de PCR convencional baseados em publicações de outros autores que desenvolveram suas técnicas em estudos realizados anteriormente, utilizando o gene *tpp47* como alvo. Este gene e o *polA* foram os que demonstraram maiores especificidade nos estudos já realizados.

A existência de um grupo comparativo, sem história de exposição prévia à sífilis e com testes não treponêmicos e treponêmicos não reagentes nos leva a acreditar que os resultados de PCR positivos encontrados nestas amostras são falso positivos, e que há necessidade de aprimorar a técnica de PCR para auxiliar no diagnóstico mais preciso da SC e na decisão do tratamento ou não dos recém-nascidos expostos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A busca por testes diagnósticos com maiores sensibilidade e especificidade para identificação da infecção por *T. pallidum* em recém-nascidos expostos à sífilis continua sendo um desafio, especialmente porque não há muitos estudos acerca deste tema.

Vislumbra-se na PCR uma técnica promissora, que já se mostrou sensível para a detecção do *T. pallidum* em swabs de úlceras de sífilis primária. Entretanto, é preciso aprimorá-la para outros tipos de amostras biológicas, como sangue e líquido cefalorraquidiano, onde a concentração do treponema é menor.

A técnica molecular utilizada neste trabalho foi a de PCR convencional baseada em um trabalho descrito por Palmer *et al*., em 2003, que desenvolveu esta técnica para identificação do treponema em swabs de cancro primário. É possível que esta não seja a técnica mais adequada para as amostras de sangue e líquido cefalorraquidiano, e por este motivo o estudo tem como perspectiva submeter as amostras biológicas a uma técnica molecular diferente (PCR em tempo real) e comparar os resultados das duas técnicas futuramente (artigo a ser escrito, comparando as duas técnicas).

Anexo 1. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desempenho da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do genoma de Treponema pallidum em amostras de sangue, fluido cerebrospinal, e placenta, em recém-nascidos em diferentes situações de risco para sífilis congênita.

Pesquisador: Renan Rangel Bonamigo
Área Temática:
Versão: 2

CAAE: 80437517.4.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: SECRETARIA DA SAUDE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.547.348

Apresentação do Projeto:

O estudo propõe o desempenho da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do genoma de Treponema pallidum em amostras de sangue, líquido cefalorraquidiano (LCR) e placenta, em recém-nascidos em diferentes situações de risco para sífilis congênita.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO: Avaliar o desempenho da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do genoma de Treponema pallidum em amostras de sangue, fluido cerebrospinal (CSF) e placenta em recém -nascidos em diferentes situações de risco para sífilis congênita.

Objetivos Secundários:

- Determinar a frequência de sinais clínicos de sífilis congênita ao nascimento em recém-nascidos em diferentes situações de risco para sífilis congênita.
- Desenvolver a técnica da PCR para detecção do DNA de Treponema pallidum.

- Determinar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, razão de verossimilhança positiva e negativa e a acurácia do método de PCR para diagnóstico ou exclusão diagnóstica de sífilis congênita e para o diagnóstico ou exclusão diagnóstica de neurosífilis em recém nascidos em diferentes situações de risco para sífilis congênita.

- Determinar os fatores de risco para a ocorrência de sífilis congênita e de neurosífilis em recém-nascidos com diferentes situações de risco para sífilis congênita

Avaliação de Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não haverá alterações nos procedimentos diagnósticos e terapêuticos propostos para as puérperas e para os recém-nascidos, não havendo risco adicional aos participantes. Rotinas de cuidados estabelecidos pelo hospital não vão mudar. Os resultados dos testes de PCR e outras técnicas adicionais ficarão disponíveis para os pacientes, tão logo realizados, mas não trará alteração quanto ao início do tratamento. As amostras serão tratadas de acordo com as normas internacionais de biossegurança. Devem ser armazenadas e refrigeradas imediatamente após a coleta. Eles serão transportados ao Centro de Desenvolvimento Técnico-científico do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Rio Grande do Sul (LACEN). A realização de questionários pode trazer ansiedade, desconforto e consumirá tempo dos pacientes. Para redução desses
efeitos, serão aplicados por profissionais treinados de forma empática, respeitosa e sem juízo de valor. A privacidade e o sigilo serão garantidos

Benefícios:

A confirmação de um teste diagnóstico que seja mais acurado no diagnóstico da sífilis congênita e que ajude na tomada de decisão clínica para o tratamento da sífilis congênita em estágios precoces, e também que evitem o excesso de tratamento em recém-nascidos que não são portadores de sífilis congênita, de maneira a evitar os efeitos adversos indesejados relacionados ao uso da penicilina, quando esta não for necessária

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa trará contribuições relevantes para a área.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos estão adequados.

Recomendações:

Não há

Conclusões ou pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do Relator.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Continuação do Parecer: 2.547.348

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1006998.pdf	22/01/2018 00:25:00		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_sifilis_PCR_300917_RCCM_RRB.docx	22/01/2018 00:23:50	Renan Rangel Bonamigo	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_ao_Comite_de_Etica.docx	22/01/2018 00:20:39	Renan Rangel Bonamigo	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	22/01/2018 00:15:41	Renan Rangel Bonamigo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controles.docx	22/01/2018 00:15:23	Renan Rangel Bonamigo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_casos.docx	22/01/2018 00:15:09	Renan Rangel Bonamigo	Aceito
Outros	Termo_de_entrega_relatorio.pdf	06/11/2017 21:37:06	Renan Rangel Bonamigo	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Renan_Airton.pdf	11/10/2017 16:18:19	Rafaela Caroline Melo	Aceito
Outros	Anuencia_Centro_Des_Tec_Cientifico.pdf	11/10/2017 14:28:31	Rafaela Caroline Melo	Aceito
Outros	Anuencia_Hospital_Femina.pdf	11/10/2017 14:16:26	Rafaela Caroline Melo	Aceito
Orçamento	Oramento.docx	30/09/2017 22:10:19	Renan Rangel Bonamigo	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado
Necessita Apreciação da CONEP:
Não

PORTO ALEGRE, 16 de Março de 2018

_____

Assinado por:
ELIANE DALLEGRAVE
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245
Bairro: Sarmento **CEP:** 90.050-170
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3303-8804 **E-mail:** cep@ufcspa.edu.br

Anexo 2. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do HCSA

HOSPITAL DA CRIANÇA
SANTO ANTÔNIO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Performance da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do genoma de Treponema pallidum em amostras de sangue, fluido cerebrospinal, e placenta, em recém-nascidos em diferentes situações de risco para sífilis congênita

Pesquisador: Renan Rangel Bonamigo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 10709919.3.0000.5683

Instituição Proponente: Hospital da Criança Santo Antônio - Santa Casa/RS

Patrocinador Principal: ASSOCIACAO DE DOENCAS SEXUALMENTE TRANSMISSIVEIS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.432.633

Apresentação do Projeto:

O presente estudo propõe o desempenho da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do genoma de Treponema pallidum em amostras de sangue, líquido cefalorraquidiano (LCR) e placenta, em recém-nascidos em diferentes situações de risco para sífilis congênita.

Serão arrolados 71 pacientes em situação de exposição para sífilis congênita, dos quais serão coletados dados relativos a presença de sinais clínicos para sífilis, resultado de exames de VDRL, FTA-Abs, análise do LCR, exames laboratoriais e radiográficos. Das puérperas, serão coletados dados relativos a história ginecológica e obstétrica bem como os resultados de VDRL e FTA-Abs durante a gestação e no momento do parto. Nas amostras de LCR, sangue e placenta do recém-nascidos, será realizado o exame de PCR para detecção do T. pallidum. Farão parte do grupo controle 71 pacientes que não preencham critério para exposição à sífilis congênita, e que tenham sido investigados através da obtenção de amostras de sangue e LCR para outras causas de sepse, que não o T. pallidum.

Objetivo da Pesquisa:

objetivo geral: Avaliar o desempenho da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do genoma de Treponema pallidum em amostras de sangue, fluido cerebrospinal (CSF) e placenta em

recém-nascidos em diferentes situações de risco para sífilis congênita.

Objetivos específicos:
-Determinar a frequência de sinais clínicos de sífilis congênita ao nascimento em recém-nascidos em diferentes situações de risco para sífilis congênita.
-Desenvolver a técnica da PCR para detecção do DNA de Treponema pallidum.
Determinar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, razão de verossimilhança positiva e negativa e a acurácia do método de PCR para diagnóstico ou exclusão diagnóstica de sífilis congênita e para o diagnóstico ou exclusão diagnóstica de neurosífilis em recém nascidos em diferentes situações de risco para sífilis congênita.
-Determinar os fatores de risco para a ocorrência de sífilis congênita e de neurosífilis em recém-nascidos com diferentes situações de risco para sífilis congênita.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não haverá alterações nos procedimentos diagnósticos e terapêuticos propostos para as puérperas e para os recém-nascidos, não havendo risco adicional aos participantes. Rotinas de cuidados estabelecidos pelo hospital não vão mudar. Os resultados dos testes de PCR e outras técnicas adicionais ficarão disponíveis para os pacientes, tão logo realizados, mas não trará alteração quanto ao início do tratamento. As amostras serão tratadas de acordo com as normas internacionais de biossegurança. Devem ser armazenadas e refrigeradas imediatamente após a coleta. Eles serão transportados ao Laboratório de Biologia Molecular da ULBRA. A realização de questionários pode trazer ansiedade, desconforto e consumirá tempo dos pacientes. Para redução desses efeitos, serão aplicados por profissionais treinados de forma empática, respeitosa e sem juízo de valor. A privacidade e o sigilo serão garantidos.

Benefícios:

A confirmação de um teste diagnóstico que seja mais acurado no diagnóstico da sífilis congênita e que ajude na tomada de decisão clínica para o tratamento da sífilis congênita em estágios precoces, e também que evitem o excesso de tratamento em recém-nascidos que não são portadores de sífilis congênita, de maneira a evitar os efeitos adversos indesejados relacionados ao uso da penicilina, quando esta não for necessária.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Seguem algumas recomendações, as demais solicitações foram atendidas e estão de acordo.



Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Retirar os TCLEs em anexo como documentos únicos e inserir os corretos que se encontram no mesmo anexo do projeto.

Recomendações:

1) Retirar os TCLEs que se encontram como documento único na PB e inserir os TCLEs que estão no anexo junto ao projeto.

2) Sugiro especificar melhor o objetivo secundário "Desenvolver a técnica da PCR para detecção do DNA de Treponema pallidum" conforme explicação da carta-resposta.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Atendidas as alterações solicitadas, o presente CEP não encontra óbices quanto ao desenvolvimento do estudo nesta Instituição.

Considerações Finais a critério do CEP:

O pesquisador responsável deve encaminhar ao CEP, os relatórios de andamento dos projetos:

1) Relatórios parciais;
2) Relatórios finais:
3) Resultados obtidos (cópia da publicação).

Diante do exposto, o Comitê de ética em Pesquisa - CEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução 466/12 e na Norma Operacional nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1322667.pdf	09/06/2019 19:22:14		Aceito
Outros	Carta_resposta.docx	09/06/2019 19:21:32	Renan Rangel Bonamigo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_autosaved.docx	09/06/2019 19:20:13	Renan Rangel Bonamigo	Aceito
Folha de Rosto	RENAN_RANGEL_BONAMIGO.pdf	01/04/2019 10:22:34	Renan Rangel Bonamigo	Aceito

HOSPITAL DA CRIANÇA
SANTO ANTÔNIO

Continuação do Parecer: 3.432.633

Orçamento	orcamento.pdf	01/04/2019 10:20:01	Renan Rangel Bonamigo	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	01/04/2019 10:12:11	Renan Rangel Bonamigo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_dados_e_publicacao.pdf	29/03/2019 01:23:57	Renan Rangel Bonamigo	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracao_materiais_biologicos.pdf	29/03/2019 01:23:24	Renan Rangel Bonamigo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_confidencialidade.pdf	29/03/2019 01:22:12	Renan Rangel Bonamigo	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_onus_instituicao.pdf	29/03/2019 01:20:08	Renan Rangel Bonamigo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.docx	29/03/2019 01:08:33	Renan Rangel Bonamigo	Aceito
Outros	formulario_inscricao.pdf	29/03/2019 01:08:03	Renan Rangel Bonamigo	Aceito
Outros	anuencia.pdf	29/03/2019 01:07:18	Renan Rangel Bonamigo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_autorizacao.pdf	29/03/2019 01:06:33	Renan Rangel Bonamigo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controles_ISCMPA.docx	29/03/2019 00:42:44	Renan Rangel Bonamigo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_casos_ISCMPA.docx	29/03/2019 00:42:26	Renan Rangel Bonamigo	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

PORTO ALEGRE, 02 de Julho de 2019

_____

Assinado por:
Lisiane De Rosa Barbosa
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Independência,155
Bairro: INDEPENDENCIA **CEP:** 90.035-074 **UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8997 **Fax:** (51)3214-8997 **E-mail:** cephcsa@santacasa.tche.br

Anexo 3. Termo de compromisso para utilização de dados e publicação

DECLARAÇÃO DE UTILIZAÇÃO DE DADOS DE PRONTUÁRIOS E USO DE PUBLICAÇÃO

Projeto: Performance da reação em cadeia polimerase (PCR) para a detecção do genoma de Treponema pallidum em amostras de sangue, fluido cerebroespinal, e placenta em recém-nascidos em diferentes situações de risco para sífilis congênita

Pesquisador Responsável: Renan Rangel Bonamigo

Conforme a resolução 466/12 CNS/MS, declaramos que:

Nós pesquisadores estamos comprometidos a manter o sigilo, a privacidade dos dados e identidade dos pacientes coletados em prontuários e banco de dados de pacientes atendidos no Hospital da Criança Santo Antônio.

Concordamos em publicar cientificamente os resultados da pesquisa supracitada assegurando que os relatos sejam feitos de maneira ética, responsável e coerente, sejam eles favoráveis ou não.

Porto Alegre, 25 de maio de 2019.

Equipe do estudo

Nome Completo	Assinatura
MAURICIO OBAL CULVERO	
*RENAN RANGA BONAMIGO	
MAURO CUNHA RAMOS	
RAFAELA CAROLINE C. MELO	
MÁRCIA SUSANA NUNES SILVA	

Anexo 4. Declaração para manuseio de materiais biológicos

DECLARAÇÃO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO

Projeto: Performance da reação em cadeia polimerase (PCR) para a detecção do genoma de Treponema pallidum em amostras de sangue, fluido cerebroespinal, e placenta em recém-nascidos em diferentes situações de risco para sífilis congênita

Pesquisador Responsável: Renan Rangel Bonamigo

Conforme a Resolução 347/05 CNS/MS, declaro que os dados obtidos de materiais biológicos coletados no estudo serão utilizados exclusivamente para as finalidades descritas no protocolo e no TCLE. Não haverá teste além daqueles descritos no protocolo e não há previsão de armazenamento das amostras biológicas para testes futuros, sendo as mesmas apropriadamente destruídas após o uso.

Porto Alegre, 25 de maio de 2019.

Equipe do estudo

Nome Completo	Assinatura
MAURICIO UBAL COLVERO	
*RENAN RANGEL BONAMIGO	
MAURO CUNHA BARROS	
RAFAELA CAROLINE C. MELO	
MARIA SUSANA N. SILVA	

Apêndice 1. Termos de Consentimento Livre e Esclarecido para grupo de expostos e grupo comparativo

Grupo de expostos

Você está sendo convidada a participar, como voluntária, do estudo intitulado "Desempenho da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do genoma de *Treponema pallidum* em amostras de sangue, fluido cerebrospinal, e placenta, em recém-nascidos em diferentes situações de risco para sífilis congênita", conduzida por Rafaela Caroline Clarinda Melo, sob orientação do pesquisador responsável Renan Rangel Bonamigo. Este estudo tem por objetivo avaliar a eficiência do exame de PCR para *T. pallidum* em diagnosticar a sífilis congênita nos recém-nascidos em situação de risco para aquisição desta doença. Você está sendo convidada a participar porque seu recém-nascido foi exposto à bactéria causadora da sífilis e necessita de avaliações e exames para saber se tem essa doença. Sua participação é voluntária (você não é obrigada a participar). A qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa, desistência ou retirada de consentimento não trará nenhum prejuízo ou modificação na qualidade de seu atendimento.

Existem riscos mínimos adicionais a você ou ao seu recém-nascido, pois serão utilizadas amostras que já foram colhidas para realização dos exames que são necessários para dar ao seu filho o melhor cuidado médico disponível (conforme os protocolos deste hospital). Se em qualquer momento você se sentir ansiosa ou incomodada por sua participação na pesquisa, sempre poderá fazer contato com os pesquisadores nos telefones ou endereços abaixo. Sua participação não será remunerada (não será oferecido nenhum valor em dinheiro ou equivalente), e também não implicará em gastos para você. Em caso de você sofrer algum dano comprovadamente causado pela pesquisa (como por exemplo algum grau de

preocupação ou angústia adicional que você possa sentir, ocasionado pelo resultado dos exames) existe garantia de avaliação com profissional que maneje esses possíveis danos. Assim, seu consentimento será para a realização de um exame adicional, o PCR, que identifica a presença ou ausência da bactéria da sífilis (este é um exame que anda não é realizado nos recém-nascidos expostos à sífilis) nas amostras de sangue e líquido cefalorraquidiano que já foram coletadas do seu recém-nascido. Estas amostras serão encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular da ULBRA/RS para realização deste exame, onde ficarão armazenadas até o término deste estudo e após serão destruídas. A intenção da pesquisa é avaliar se é este exame é efetivo para diagnosticar sífilis congênita, o que facilitará o diagnóstico desta doença e consequentemente o seu tratamento. Se você aceitar participar, serão coletados dados do seu prontuário (anotações médicas colhidas no hospital) que dizem respeito ao acompanhamento médico que foi realizado durante a gravidez e dados do prontuário do seu recém-nascido que dizem respeito ao resultado dos exames realizados para investigação de sífilis congênita. O recém-nascido será examinado por um médico para ver se existem manifestações da doença. Esse procedimento também faz parte da rotina de atendimento.

Os dados obtidos por meio desta pesquisa serão confidenciais. O pesquisador responsável se compromete a apresentá-los em encontros ou revistas científicas sem que qualquer pessoa que participou possa ser identificada.

Caso você concorde em participar desta pesquisa, assine ao final deste documento, que possui duas vias, sendo uma delas sua, e a outra, do pesquisador responsável pela pesquisa.

Seguem os telefones e o endereço institucional do pesquisador responsável e do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, onde você poderá tirar suas dúvidas sobre o

projeto e sua participação nele, agora ou a qualquer momento. Contatos do pesquisador responsável: Renan Rangel Bonamigo, Médico Dermatologista do Ambulatório de Dermatologia Sanitária, Avenida João Pessoa, 1327 CEP: 90040-001. rrbonamigo@gmail.com, telefone (51) 3288-7668 ou (51) 99745-7709. Caso você tenha dificuldade em entrar em contato com o pesquisador responsável, comunique o fato ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Santo Antônio localizado na Av. Independência nº 155 – M1, através do telefone (51) 3214-8997 ou através do endereço de e-mail cephcsa@santacasa.org.br. Ou ainda poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa coparticipante da UFCSPA que se localiza na R. Sarmento Leite, 245, sala 407 prédio 3, através do telefone (51) 3303-8804 ou através do endereço de e-mail cep@ufcspa.edu.br.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa, e que concordo em participar.

Porto Alegre, ____ de _____ de _____.

Assinatura do(a) participante: _____

Assinatura do(a) pesquisador(a) : _____

Grupo comparativo

Você está sendo convidada a participar, como voluntária, do estudo intitulado “Desempenho da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do genoma de *Treponema pallidum* em amostras de sangue, fluido cerebrospinal, e placenta, em recém-nascidos em diferentes situações de risco para sífilis congênita”, conduzida por Rafaela Caroline Clarinda Melo, sob orientação do pesquisador responsável Renan Rangel Bonamigo. Este estudo tem por objetivo avaliar a eficiência do exame de PCR

para *T. pallidum* em diagnosticar a sífilis nos recém-nascidos em situação de risco para aquisição desta doença. Não existe suspeita que você ou seu filho tenham sífilis, porém você está sendo convidada a participar porque seu filho tem uma suspeita de infecção que necessitou de avaliações e exames laboratoriais. Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa, desistência ou retirada de consentimento não acarretará prejuízo. Existem riscos mínimos adicionais a você ou ao seu recém-nascido, pois não será coletado nenhum material biológico adicional além dos que já estão nos protocolos deste hospital. Se em qualquer momento você se sentir ansiosa ou incomodada por sua participação na pesquisa, sempre poderá fazer contato com os pesquisadores nos telefones ou endereços abaixo. Sua participação não será remunerada (não será oferecido nenhum valor em dinheiro ou equivalente), e também não implicará em gastos para você. Em caso de você sofrer algum dano comprovadamente causado pela pesquisa (como por exemplo algum grau de preocupação ou angústia adicional que você possa sentir, ocasionado pelo resultado dos exames) existe garantia de avaliação com profissional que maneje esses possíveis danos. Sua participação nesta pesquisa consistirá em fornecer consentimento para a realização do exame de PCR para identificação do T. pallidum (este é um exame que atualmente não é realizado de rotina nos recém-nascidos expostos à sífilis) nas amostras de sangue e líquido cefalorraquidiano que foram coletadas do seu recém-nascido para a investigação de sepse (infecção neonatal). Estas amostras serão encaminhadas ao o Laboratório de Biologia Molecular da ULBRA/RS para realização deste exame, onde ficarão armazenadas até o término deste estudo e após serão destruídas. A intenção é avaliar se é este exame é efetivo para a exclusão do agente causador da sífilis nas amostras biológicas de recém-nascidos que não foram expostos a situações de risco para sífilis congênita, o que facilitará o diagnóstico desta doença e consequentemente o seu tratamento. Serão

também coletados dados do seu prontuário que dizem respeito ao acompanhamento médico que foi realizado no seu pré-natal, e dados do prontuário do seu recém-nascido que dizem respeito ao resultado dos exames que foram realizados no hospital para a investigação de infecção neonatal.

Os dados obtidos por meio desta pesquisa serão confidenciais e não serão divulgados em nível individual, visando assegurar o sigilo de sua participação. O pesquisador responsável se comprometeu a tornar públicos nos meios acadêmicos e científicos os resultados obtidos de forma consolidada sem qualquer identificação de indivíduos ou instituições participantes.

Caso você concorde em participar desta pesquisa, assine ao final deste documento, que possui duas vias, sendo uma delas sua, e a outra, do pesquisador responsável / coordenador da pesquisa.

Seguem os telefones e o endereço institucional do pesquisador responsável e do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, onde você poderá tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação nele, agora ou a qualquer momento. Contatos do pesquisador responsável: Renan Rangel Bonamigo, Médico Dermatologista do Ambulatório de Dermatologia Sanitária, Avenida João Pessoa, 1327 CEP: 90040-001. rrbonamigo@gmail.com, telefone (51) 3288-7668 ou (51) 99745-7709. Caso você tenha dificuldade em entrar em contato com o pesquisador responsável, comunique o fato ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Santo Antônio localizado na Av. Independência nº 155 – M1, através do telefone (51) 3214-8997 ou através do endereço de e-mail cephcsa@santacasa.org.br. Ou ainda poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa coparticipante da UFCSPA que se localiza na R. Sarmento Leite, 245, sala 407 prédio 3, através do telefone (51) 3303-8804 ou através do endereço de e-mail cep@ufcspa.edu.br.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa, e que concordo em participar.

Porto Alegre, ____ de _____ de _____.

Assinatura do(a) participante: _____

Assinatura do(a) pesquisador(a) :_____

Apêndice 2. Condições para coleta, armazenamento e transporte das amostras

As amostras biológicas utilizadas neste estudo foram coletadas, armazenadas e transportadas para o laboratório de biologia molecular da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) – onde foram realizados os exames de PCR.

As amostras de sangue total (4 gotas) foram coletadas por punção venosa periférica e posteriormente colocadas em papel filtro da marca Whatman (cartões Elute), com o objetivo de evitar o uso do sangue armazenado nos frascos - que foram previamente manipulados no laboratório de análises clínicas - uma vez que a técnica de PCR é muito sensível à contaminação. Os cartões de papel filtro foram deixados secando em temperatura ambiente por 20 minutos, e após foram armazenados em sacos plásticos fechados individuais para cada cartão.

As amostras de líquor foram coletadas por procedimento estéril de punção lombar em frascos esterilizados e que em seguida foram vedados, identificados e armazenados em refrigerador que manteve a temperatura média entre 8°C e 20°C. Em 24 a 48h foram transportadas em caixa térmica e então congeladas sob temperatura de -20°C.

As amostras de sangue no cartão foram armazenadas em temperatura ambiente dentro das embalagens plásticas vedadas até o momento da realização do PCR.

O transporte das amostras de líquor foi realizado em caixa térmica vedada, específica para transporte de amostras biológicas, que manteve a

temperatura média das amostras entre 8° e 20°C. As amostras de sangue no cartão foram transportadas dentro das embalagens plásticas vedadas, dentro de caixa isolante específica para transporte de amostras biológicas.

Apêndice 3. Método de extração do DNA das amostras biológicas e condições para realização do PCR convencional

A extração do DNA das amostras de sangue no cartão foi realizada através da técnica de ultrassom, inicialmente com a remoção de dois discos de 3 milímetros utilizando um perfurador (que foi esterilizado com álcool 70% após a utilização em cada cartão), seguido pela transferência dos discos para um microtubo de 1,5 mL. Logo após, foram adicionados 500 µL de água estéril no microtubo, que por sua vez foi agitado no vórtex por 3 vezes, por um período de 5 segundos. Após esta etapa, os discos foram transferidos para um microtubo de 0,5 mL contendo 30 µL de água estéril, e então a solução foi centrifugada por 10 segundos e colocada em banho na temperatura de 95°C por 30 minutos. Novamente a solução foi misturada no vórtex, e após centrifugada por mais 30 segundos.

A extração do DNA do líquor foi realizada após o descongelamento das amostras em temperatura ambiente, utilizando o kit de extração de DNA PureLink® seguindo as etapas do seu protocolo de extração por coluna. Em um tubo foram adicionados: a amostra biológica de líquor, 20 µL de proteinase K, 20 µL de RNase e esses produtos foram misturados e agitados no vórtex. A mistura foi incubada em temperatura ambiente por 2 minutos, e após foram adicionados 200 µL de tampão de ligação/lise genômica PureLink ®. Após esta etapa, houve incubação da nova solução a 55 °C por 10 minutos para promover a lise de proteínas. Então, 200 µL de etanol a 96% foram adicionados ao produto lisado. Houve mistura da solução no vórtex por 5 segundos, e então o produto foi colocado em uma coluna. A coluna foi centrifugada a 10.000 vezes por 1 minuto em temperatura ambiente. Logo após, foram adicionados

por 2 vezes a quantidade de 500 µL do tampão de lavagem, e então a coluna foi centrifugada por mais 10.000 vezes por minuto, seguido de mais 3 minutos de centrifugação na velocidade máxima. Por fim, foram adicionados 100 µL de tampão de eluição genômica PureLink ® à coluna, e após o material foi incubado em temperatura ambiente por 1 minuto. Mais uma vez a coluna foi centrifugada em velocidade máxima por 1 minuto em temperatura ambiente, e por fim se obteve o DNA genômico.

Após a extração do DNA, a detecção do *T. pallidum* foi relizada através da técnica de PCR convencional, utilizando os primers KO3 e KO4 que amplificam um segmento de 260pb do gene 47 kDa conforme descrito por Palmer et al. (KO3: 5’ GAAGTTTGTCCCAGTTGCGGTT-3’; KO4: 5’CAGAGCCATCAGCCCTTTTCA 3’).

Foi preparada uma mistura com tampão 10X, 1,5mM MgCl2, 200µM de cada dNTPs, 25pmol de cada primer e 1,25U da enzima Taq platiniun DNA polimerase. Foi feita uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de uma desnaturação a 95°C por 20 segundos, 62°C por 20 segundos e 72°C por 20 segundos, durante 35 ciclos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. O produto gerado foi um amplicon de 260 pb. O resultado da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2% contendo 0,05% de brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.