

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL/BIOPROSPECÇÃO**

**ESTUDO DE PROTEÍNAS ANTIGÊNICAS DO  
*Treponema pallidum***

**JÚLIO HENRIQUE FERREIRA DE SÁ QUEIROZ**

**DOURADOS  
2019**

**JÚLIO HENRIQUE FERREIRA DE SÁ QUEIROZ**

**ESTUDO DE PROTEÍNAS ANTIGÊNICAS DO**  
***Treponema pallidum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Geral/Bioprospecção da Universidade Federal da Grande Dourados, como requisito à obtenção do título de mestre Biologia Geral.

Área de concentração: Bioprospecção

Orientadora: Profa. Dra. Simone Simionatto

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira

**DOURADOS**  
**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

Q3e Queiroz, Julio Henrique Ferreira De Sa  
ESTUDO DE PROTEÍNAS ANTIGÊNICAS DO *Treponema pallidum* [recurso eletrônico] /  
Julio Henrique Ferreira De Sa Queiroz. -- 2019.  
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Simone Simionatto.  
Coorientador: Rodrigo Matheus Pereira.  
Dissertação (Mestrado em Biologia Geral/Bioprospecção)-Universidade Federal da Grande  
Dourados, 2019.  
Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:  
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Antígeno recombinante. 2. *Treponema pallidum*. 3. ELISA. 4. sífilis. 5. diagnóstico  
sorológico. I. Simionatto, Simone. II. Pereira, Rodrigo Matheus. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

"ESTUDO DE PROTEÍNAS ANTIGÊNICAS DO *Treponema pallidum*".

POR

**JÚLIO HENRIQUE FERREIRA DE SÁ QUEIROZ**

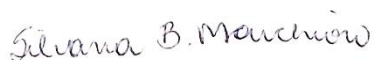
DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS (UFGD), COMO PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA GERAL - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: "BIOPROSPECÇÃO".



PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> SIMONE SIMIONATTO  
ORIENTADORA – UFGD



PROF. DR. RODRIGO MATHEUS PEREIRA  
MEMBRO TITULAR – UFGD



PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> SILVANA BEUTINGER MARCHIORO  
MEMBRO TITULAR – UFGD



PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> SUZANA MEIRA RIBEIRO  
MEMBRO TITULAR – UFGD

Aprovado em 07 de março de 2019.

## Agradecimentos

À minha família (mãe Lenir, pai José Jaime, irmão Jaime e irmã Pamela) pelo todo suporte nessa caminhada, só tenho a agradecer. Apesar da distância, sempre me confortaram. Vocês são importantes para minha vida, gratidão sempre.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone Simionatto por continuar essa condução na minha jornada científica, sempre com um grande apoio. Esse suporte foi importante para meu crescimento científico nessa pós-graduação, muito obrigado.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Geral/Bioprospecção da UFGD que tive a grande oportunidade de participar de suas aulas, que passaram de formar brilhante o conhecimento científico.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde – LPCS (Tiago, Michele, Marcia, Gleyce, Kesia, Marcelo, Érica, Anny, Paulo, Flora, Mariana, Analia e entre outros) por todo auxílio e suporte durante a realização dos meus experimentos no LPCS.

A todos os colegas da IV turma de Biotecnologia que continuaram em Dourados, Jura, Let, Bis, Maia, Alves e Tim pela essa forte amizade durante essa jornada no programa de pós-graduação.

Especialmente, Ludmila, minha namorada e futura esposa pelo todo amor, carinho, atenção, apoio e amizade tanto nos momentos mais tortuosos dessa caminhada como também nos inesquecíveis.

Ao meu grande irmão Fernando Queiroz pela parceria, conselhos e tudo que eu poderia contar nesses mais de 7 anos de convivência em Dourados. Além das importantes amizades (Rogerio, Hugo e Tura) que fiz por sua causa e vou levar para a vida.

Às Instituições financiadoras desta pesquisa FUNDECT e CNPq. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“Se você tem e me dá R\$20, no final,  
eu tenho R\$20 e você não tem mais nada.  
Se você sabe um teorema e me ensina, ao final  
eu tenho o teorema, mas você o conserva também.  
Então, o conhecimento não obedece às leis da troca mercantil,  
ele tem mesmo a virtude de fazer exatamente o oposto...  
Em vez de um jogo de resultado nulo,  
ele suscita a multiplicação de seu valor.”*

***Michel Serres***

## RESUMO

A incidência de sífilis tem aumentado de forma preocupante nas últimas décadas, com uma estimativa de 6 milhões de novos casos por ano no mundo. O diagnóstico da sífilis continua um desafio, devido à dificuldade de cultivo *in vitro* do *Treponema pallidum*. Nos últimos anos, novos testes treponêmicos têm sido desenvolvidos, utilizando antígenos recombinantes de *T. pallidum*. Esta abordagem conferiu uma maior especificidade e sensibilidade para a triagem dos pacientes com sífilis. No entanto, a busca por novos antígenos é fundamental para desenvolvimento de um diagnóstico sorológico mais eficiente para detecção do *T. pallidum*. O objetivo desse estudo foi a produção dos antígenos recombinantes para diagnóstico sorológico da sífilis. A seleção dos antígenos foi baseada em estudos proteômicos com auxílio dos programas de bioinformática. Três genes que codificam para as proteínas Tp0684, Tp0750 e Tp0792 foram selecionados e submetidos síntese química, clonados no vetor pAE; as proteínas foram expressas em *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> e purificadas por cromatografia de afinidade. A antigenicidade das proteínas recombinantes rTp0684, rTp0750 e rTp0792 foram avaliadas através da técnica de *Western blot* e ELISA com soros de pacientes com sífilis primária ( $n = 6$ ), sífilis latente ( $n = 34$ ) e soros controles não infectados ( $n = 10$ ). As três proteínas recombinantes foram reconhecidas pelos soros de pacientes com sífilis primária e sífilis latente nas técnicas *Western blot* e ELISA, demonstrando serem antigênicas. Estes resultados indicam que os antígenos produzidos têm potencial para serem utilizados no desenvolvimento de testes sorológicos para a triagem de pacientes com sífilis. Além disso, a estratégia de utilização de proteínas recombinantes pode garantir um incremento na especificidade dos testes sorológicos reduzindo a ocorrência de resultados falsos positivos. Por outro lado possibilita um estudo racional de alvos com alta sensibilidade, diminuindo de forma significativa resultados falsos negativos e positivos.

**Palavras-chave:** Antígeno recombinante; *Treponema pallidum*; ELISA; sífilis; diagnóstico sorológico.

## ABSTRACT

The incidence of syphilis has increased alarmingly in recent decades, with an estimated 6 million new cases per year in the world. The diagnosis of syphilis remains a challenge, due to the difficulty of *Treponema pallidum* in vitro culture. In recent years, new treponemal tests have been developed using recombinant *T. pallidum* antigens. This approach confers greater specificity and sensitivity for the screening of patients with syphilis. This study aimed to the production of recombinant antigens for the development of a more efficient serological diagnosis for the detection of *T. pallidum*. The selection of antigens was based on proteomic studies with the aid of bioinformatics programs. Three genes coding for the Tp0684, Tp0750 and Tp0792 proteins were selected and submitted to chemical synthesis, cloned in the pAE vector; the proteins were expressed in *E. coli* BL21 Star™ and purified by affinity chromatography. The antigenicity of recombinant proteins rTp0684, rTp0750 and rTp0792 were evaluated by Western blot and ELISA with sera from patients with primary syphilis ( $n = 6$ ), latent syphilis ( $n = 34$ ) and uninfected control sera ( $n = 10$ ). The three recombinant proteins were recognized by sera from patients with primary syphilis and latent syphilis in Western blot and ELISA, demonstrating be antigenic. These results indicate that the antigens produced have the potential to be used in the development of serological tests for the screening of patients with syphilis. In addition, the strategy of using recombinant proteins can ensure an increase in the specificity of serologic tests reducing the occurrence of false positive results. On the other hand, enables a rational study targets with high sensitivity, decreasing significantly negative and false positive results.

**Keywords:** Recombinant antigen; *Treponema pallidum*; ELISA; syphilis; serodiagnosis.

## SUMÁRIO

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução                                                | 12 |
| 2. Revisão de literatura                                     | 13 |
| 2.1. Histórico                                               | 13 |
| 2.2. Agente etiológico da sífilis                            | 14 |
| 2.3. Sífilis                                                 | 16 |
| 2.4. Diagnóstico                                             | 18 |
| 2.5. Diagnóstico molecular                                   | 21 |
| 3. Objetivos                                                 | 25 |
| 3.1 Objetivo geral                                           | 25 |
| 3.2. Objetivos específicos                                   | 25 |
| 4. Artigo científico                                         | 26 |
| 5. Conclusão geral                                           | 47 |
| 6. Referências                                               | 48 |
| 7. Anexos                                                    | 52 |
| Anexo I – Norma da revista                                   | 52 |
| Anexo II – Outras atividades desenvolvidas (Artigo completo) | 53 |

## **Listas de figuras**

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Modelo de superficie de <i>T. pallidum</i> .....                             | 15 |
| Figura 2. Modelo topológico de lipoproteínas soro-reativas de <i>T. pallidum</i> ..... | 23 |

## **Listas de tabelas**

Tabela 1. Manifestações clínicas, de acordo com a evolução e fases da sífilis.....17

Tabela 2. Testes sorológicos para sífilis.....19

## 1. Introdução

A sífilis é uma infecção causada pelo *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*, sendo transmitida, principalmente, por via sexual, através do contato direto com lesões, ou vertical durante a gravidez (LAFOND; LUKEHART, 2006). A incidência de sífilis teve um aumento em todo o mundo, com uma estimativa de 6 milhões de novos casos por ano (NEWMAN et al., 2015). Segundo o Ministério da Saúde, foi observado um aumento constante no número de casos de sífilis no Brasil entre os anos de 2012 e 2017. Em 2017, foram notificados 87.593 casos de sífilis adquirida, 37.436 casos de sífilis em gestantes e 20.474 casos de sífilis congênita, com 185 óbitos de recém-nascidos. O Mato Grosso do Sul apresentou taxa de detecção de sífilis adquirida superior à média nacional em 2016, com mais de 50 casos por 100 mil habitantes. Esse estado apresentou a maior taxa detecção para sífilis em gestantes entre as unidades federativas, aproximadamente 23,7 casos/1.000 nascidos vivos (BRASIL, 2017).

As estratégias de vigilância e controle da sífilis incluem fundamentalmente o diagnóstico, o tratamento e acompanhamento dos casos confirmados. No entanto, o diagnóstico dessa infecção continua a ser um desafio, devido à dificuldade de cultivo *in vitro* do *T. pallidum*, o que impulsiona a busca de métodos alternativos e eficazes para a sua detecção. Em pacientes assintomáticos, os métodos de diagnósticos sorológicos são utilizados para a detecção indireta do *T. pallidum* e são classificados em treponêmicos e não treponêmicos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2015).

Os testes não treponêmicos detectam os anticorpos contra um antígeno lipídico e são utilizados para o monitoramento do tratamento do paciente (PARK et al., 2018). Títulos elevados de anticorpos não treponêmicos resulta do efeito combinado do antígeno cardiolipina do *T. pallidum* e das células do hospedeiro danificadas durante a infecção (GAO et al., 2018). No entanto, resultados falso-positivos no teste não treponêmico podem ser associados à várias condições médicas e fatores não relacionados à doença, incluindo outras doenças autoimunes, AIDS, imunizações, gravidez, uso de drogas injetáveis e idade avançada (NANDWANI; EVANS, 1995). Os testes treponêmicos detectam anticorpos específicos para as proteínas do *T. pallidum*. Todavia, a maioria dos pacientes pode permanecer reagente independentemente do tratamento realizado ou a atividade da infecção (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2015).

Nos últimos anos, novos testes treponêmicos têm sido desenvolvidos, utilizando antígenos recombinantes do *T. pallidum*. Esta abordagem conferiu uma maior especificidade e sensibilidade para a triagem de pacientes com sífilis (JIANG et al., 2013, 2016; SUN et al.,

2009; XIE et al., 2016; XU et al., 2016). No entanto, é fundamental que novas proteínas recombinantes de *T. pallidum* sejam avaliadas para a busca de alvos promissores que possibilitem melhorar a sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade dos testes sorológicos atualmente disponíveis para o diagnóstico da sífilis (MCGILL et al., 2010; MCKEVITT et al., 2005). Este estudo teve como objetivo a produção de antígenos recombinantes do *T. pallidum* buscando o desenvolvimento de um diagnóstico mais sensível para sífilis. Para isso, foram realizadas análises genômicas e proteômicas do *T. pallidum* na busca de uma seleção mais racional de antígenos, os quais podem vir a ser mais efetivos no diagnóstico da sífilis.

## **2. Revisão de literatura**

### **2.1. Histórico**

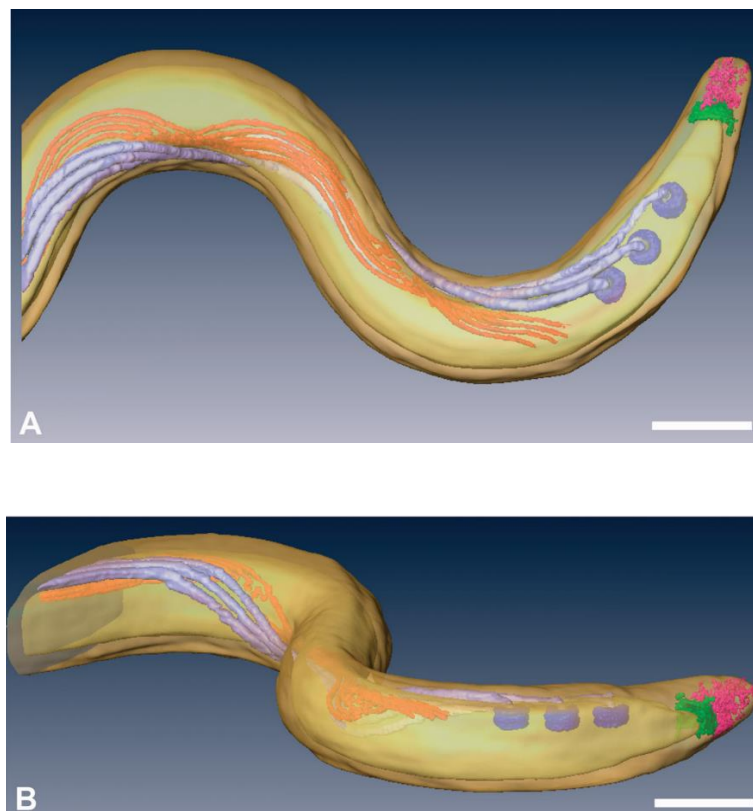
A pandemia de sífilis a partir do final do século XV consolidou esta doença infecciosa como uma das mais temidas da história da humanidade. Os primeiros surtos relatados na Europa foram durante a Guerra de Nápoles em 1495. Posteriormente, a epidemia se espalhou para outros continentes, tornando-se um grave problema de saúde até a descoberta da penicilina como um tratamento eficaz no século XX (ARORA et al., 2017).

A origem geográfica do patógeno da sífilis é controversa. Portanto, foram propostas três hipóteses (pré-colombiana, colombiana e unitária) para explicar o seu surgimento. A hipótese pré-colombiana propõe que a sífilis e outras treponematoses humanas tenham se originado na Europa, antes do contato com o continente americano, no entanto não tinha sido diagnosticada (SCHUENEMANN et al., 2018). A hipótese colombiana sugere que a sífilis originou nas Américas antes do período de contato com os europeus e foi transportada pelos marinheiros de Cristóvão Colombo para continente europeu em 1493. Desta forma, a falta de imunidade contra a infecção treponêmica facilitou a sua rápida dispersão pela Europa. Esta hipótese é apoiada por relatos etnográficos do uso de plantas medicinais para o tratamento da infecção no continente americano (SANTOS; GARDNER; ALLSWORTH-JONES, 2013). Enfim, a hipótese unitária propõe a existência de um único *Treponema* com ampla distribuição global e que, devido às diferenças de clima, condições geográficas e práticas culturais, é expresso como diferentes formas da doença, como a sífilis e as chamadas treponematoses não-venéreas: a boubá (*T. pallidum* subsp. *pertenue*), a bejel ou sífilis endêmica (*T. pallidum* subsp. *endemicum*) e pinta (*Treponema carateum*) (GIACANI; LUKEHART, 2014).

Em um recente estudo, algumas sequências de DNA de *Treponema* sp. foram recuperadas pela primeira vez em indivíduos do período colonial brasileiro no Rio de Janeiro. Os resultados paleogenéticos sugerem a infecção por *Treponema* sp. é consistente com os documentos históricos que descrevem a sífilis, bem como a boubas, como doenças endêmicas na época (GUEDES et al., 2018). A sífilis conhecida também como “A Grande Imitadora”, por ter a capacidade de simular várias doenças, vitimou brilhantes compositores da música clássica. Apresentaram sintomas de neurosífilis, o compositor Beethoven, que lhe causou a surdez completa. Outros sintomas como alterações no comportamento, delírios persecutórios e perda parcial da motricidade sofreram os compositores Schumann e Wolf. Dentre outros compositores, como Donizetti, Smetana, Joplin e Delius, também apresentaram sintomas de neurosífilis (KAHAKURA et al., 2018).

## 2.2. Agente etiológico da sífilis

O *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* é o agente etiológico da sífilis. É uma bactéria Gram-negativa, membro da família *Spirochaetaceae*, do gênero *Treponema* (PASTER; DEWHIRST, 2000). O *T. pallidum* é uma bactéria anaeróbia estrita que apresenta cerca de 10 a 20 µm de comprimento e 100 a 200 nm de diâmetro. O corpo celular espiralado do *T. pallidum* encontra-se envolto por uma estrutura semelhante à de outras bactérias gram-negativas. Esta estrutura celular é envolvida por membranas (membrana citoplasmática e membrana externa) e feixes de fibrilas que se originam nas extremidades da célula sob uma bainha externa, denominados como endoflagelos, os quais permitem o movimento da espiroqueta em volta do seu próprio eixo flagelar (IZARD et al., 2009). A Figura 1 demonstra o modelo de superfície de *T. pallidum*.



**Figura 1.** Vista superior (A) e lateral (B) de um modelo de superfície de *T. pallidum*, mostrando as membranas externa e citoplasmática (amarelo transparente), corpos basais (lavanda escuro), filamentos flagelares (lavanda claro), filamentos citoplasmáticos (laranja), *cap* (verde) e cone (rosa). A camada de peptidoglicano não foi renderizada. Barras brancas de 200 nm.

Fonte: Adaptação de IZARD et al., 2009.

O primeiro genoma de *T. pallidum* sequenciado foi da cepa Nichols no final da década de 90 (FRASER et al., 1998). Possui um genoma relativamente pequeno, composto por 1.139.633 pares de base (pb), contendo 1.039 regiões de fase aberta de leitura (*Open Reading Frames*- ORFs) (PĚTROŠOVÁ et al., 2013). Aproximadamente 55% de ORFs possuem função biológica prevista, 17% têm homologia com proteínas hipotéticas de outras espécies e 28% são desconhecidas (HOUSTON et al., 2018).

Outras cepas também tiveram o seu genoma completo sequenciado, a cepa Chicago (EUA Chicago, 1951), a Mexico A (EUA Mexico, 1953), a SS14 (EUA Atlanta, 1976) e a DAL-1, esta última foi isolada do fluído amniótico de uma afro-americana de 21 anos de idade, diagnosticada com sífilis secundária (ZOBANÍKOVÁ et al., 2012). A cepa sequenciada recente foi a Amoy, obtida da lesão de um paciente chinês com sífilis primária. Essa cepa não apresenta a mutação de resistência aos macrolídeos, além disso apresenta baixa virulência e toxicidade em infecção aos animais do que as outras cepas de *T. pallidum* isoladas (TONG et al., 2017).

### 2.3. Sífilis

A sífilis é uma infecção sistêmica causada pela bactéria *T. pallidum*, e pode ser transmitida através do contato sexual, via transplacentária (da mãe para o feto) ou através da transfusão de sangue. As manifestações clínicas da infecção causada pelo *T. pallidum* dependem da duração das fases da sífilis, do local das lesões e do estado imune do paciente infectado (LAFOND; LUKEHART, 2006).

De acordo com as fases da infecção e com base em aspectos clínicos, a sífilis é classificada em: primária, secundária, latente e terciária, contribuindo para o tratamento e acompanhamento da infecção (HO, EL., AND LUKEHART, 2011). A sífilis primária começa após a invasão do patógeno, o período de incubação é de 10 a 90 dias (média de três semanas). Em seguida, há o aparecimento de uma lesão ulcerada (cancro duro ou protossifiloma) indolor no local de inoculação, considerado o primeiro sintoma da sífilis primária, na qual cerca de um terço dos pacientes não tratados nessa fase, irá desenvolver a sífilis secundária. Esse estágio pode durar entre duas a seis semanas e desaparecer de forma espontânea, independentemente de tratamento (RADOLF et al., 2016).

A fase secundária surge em média entre seis semanas e seis meses após a infecção, apresentando lesões, principalmente, nas regiões palmares e plantares, com o surgimento de erupções cutâneas com grandes quantidades de *T. pallidum*. No entanto, a sintomatologia pode desaparecer de forma espontânea em poucas semanas, independentemente de tratamento (PEELING et al., 2017). A ausência de sinais clínicos é denominada de fase latente, nesta fase o patógeno pode persistir por vários anos em diversos tecidos e órgãos sem causar resposta inflamatória. A infecção latente é considerada recente quando tem menos de um ano, depois desse período é classificada tardia ou de duração desconhecida (TIPPLE; TAYLOR, 2015).

A partir do momento que a disseminação do *T. pallidum* começa a atingir vários órgãos, a infecção passa a ser denominada de fase terciária, causando o aparecimento de granulomas que nada mais é que o reflexo de uma resposta imune inadequada para a sífilis persistente. Essa fase da infecção pode levar vários anos para apresentar sintomas, progride de forma silenciosa em pacientes tratados de forma inadequada ou sem tratamento (PILLAY, 2018).

A neurosífilis ocorre quando *T. pallidum* infecta o sistema nervoso central, podendo ser em qualquer fase da sífilis. As manifestações clínicas neurológicas precoces, tais com a disfunção dos nervos cranianos, meningite, acidente vascular cerebral, alterações agudas do estado mental, auditivas ou oftálmicas se manifestam geralmente nos primeiros meses ou anos do contágio. Por outro lado, os sinais neurológicos finais, como paralisia geral e *tabes dorsalis*

ocorrem somente de 10 a 30 anos após a infecção (MARRA; GHANEM, 2018). As manifestações clínicas, de acordo com a evolução e fases da sífilis são resumidas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Manifestações clínicas, de acordo com a evolução e fases da sífilis.

| Evolução                                                | Fases da sífilis adquirida                                                                                                                                                                                                                 | Manifestações clínicas                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Sífilis recente<br/>(menos de um ano de duração)</b> | <b>Primária</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 a 90 dias após contato com o patógeno, em média três semanas;</li> <li>• A lesão desaparece sem cicatriz em duas a seis semanas com ou sem tratamento.</li> </ul>              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Úlcera genital (cancro duro) indolor, geralmente única, com fundo limpo, infiltrada;</li> <li>• Linfonodos regionais indolores, de consistência elástica, que não fistulizam.</li> </ul>                                                            |
|                                                         | <b>Secundária</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Seis semanas a seis meses após o contato com o patógeno;</li> <li>• As lesões desaparecem sem cicatrizes em quatro a 12 semanas;</li> <li>• Pode haver novos surtos.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lesões cutaneomucosas <b>sintomáticas<sup>a</sup></b>;</li> <li>• Sintoma gerais, micropoliadenopatia;</li> <li>• Pode haver envolvimento ocular (ex: uveítes), hepático e neurológico (ex: alterações nos pares cranianos, meningismo).</li> </ul> |
|                                                         | <b>Latente recente<sup>b</sup></b>                                                                                                                                                                                                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Assintomática, com testes imunológicos reagentes.</li> </ul>                                                                                                                                                                                        |
| <b>Sífilis tardia<br/>(mais de um ano de duração)</b>   | <b>Latente tardia<sup>b</sup></b>                                                                                                                                                                                                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Assintomática, com testes imunológicos reagentes.</li> </ul>                                                                                                                                                                                        |
|                                                         | <b>Terciária<sup>c</sup></b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dois a 40 anos após o contato com o patógeno.</li> </ul>                                                                                                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Quadro cutâneo destrutivo e formação de gomas sífilíticas que podem ocorrer em qualquer órgão;</li> <li>• Acometimento cardiovascular, neurológico e ósseo.</li> </ul>                                                                              |

<sup>a</sup>Erupção maculosa (roséola) ou papulosa, lesões palmo-plantares com escamação em colarinho, placas mucosas (tênuas e acinzentadas), lesões papulo-hipertróficas nas mucosas ou pregas cutâneas (condiloma plano), alopecia em clareiras e madarose (perda da sobrancelha). <sup>b</sup> A maioria dos diagnósticos ocorre nesses estágios; frequentemente, é difícil diferenciar a fase latente recente da tardia. <sup>c</sup> Lesões cutâneas nodulares e gomosas (destrutivas), ósseas (periostite, osteíte gomosa ou esclerosante), articulares (artrite, sinovite e nódulos justo-articulares), cardiovasculares (aortite sífilítica, aneurisma e estenose de coronárias), neurológicas (meningite, gomas do cérebro ou da medula, paralisia geral, tabes dorsalis e demência).

Fonte: Adaptação do Boletim Epidemiológico: Sífilis 2017.

A sífilis se desenvolve após o *T. pallidum* penetrar na mucosa ou na pele. A aderência nas células do hospedeiro e a matriz extracelular é considerado o passo inicial da infecção. Logo em seguida uma resposta inflamatória local é provocada pela multiplicação das espiroquetas, e sua disseminação ocorre pelo sistema linfático e corrente sanguínea (LAFOND; LUKEHART, 2006). No entanto, os mecanismos da causa do dano tecidual, bem como as medidas de defesas do hospedeiro sobre o patógeno, não são esclarecidos. Isso se deve a dificuldade do cultivo *in vitro* do *T. pallidum* que impossibilita a utilização de técnicas genéticas para delinear seus determinantes de virulência.

Existem mecanismos de evasão desenvolvidos pelo patógeno como forma de proteção contra as defesas do hospedeiro. Uma das características que auxiliam na evasão desta espiroqueta do sistema imune é o fato de possuir na membrana externa proteínas integrais, tais como, Tp0155, Tp0483, Tp0751, que são candidatas a adesinas e que não estimulam suficientemente o sistema imune. Um dos mecanismos que caracterizam o estágio de latência, permitindo que o *T. pallidum* não seja reconhecido pelo sistema imune, é a capacidade de evadir na circulação e diminuir o metabolismo mantendo os níveis basais de replicação (GIACANI et al., 2013; KELESIDIS, 2014).

## **2.4. Diagnóstico**

O diagnóstico da sífilis é complicado, devido à variedade de manifestações clínicas, e a dificuldade na interpretação dos testes sorológicos, que são utilizados para confirmar o diagnóstico, como também para avaliar a resposta ao tratamento. Desta forma, o *T. pallidum* pode ser detectado de forma direta ou indireta.

O *T. pallidum* pode ser detectado de forma direta a partir de úlceras da mucosa ou da pele de pacientes com sífilis primária e secundária pela técnica de microscopia de campo escuro (MCE). Por outro lado, essa técnica requer um equipamento especial (microscópio de campo escuro) e pessoas treinadas. Além disso, o MCE não é recomendado para amostras orais, pois apresenta resultados falso-positivos devido à presença de espiroquetas saprófitas na cavidade oral (BUFFET et al., 2007; GRANGE et al., 2012; HEYMANS et al., 2010). Resultados falso-negativos para o MCE podem ocorrer em 20% dos casos (GAYET-AGERON et al., 2015).

O diagnóstico sorológico da sífilis é classificado em treponêmicos e não treponêmicos. Estes fornecem uma sensibilidade que varia entre 71% a 100%, e especificidade de 98% a 99%, dependendo da fase da sífilis (SEÑA; WHITE; SPARLING, 2010). A Tabela 2 demonstra os testes sorológicos disponíveis para o diagnóstico da sífilis.

**Tabela 2.** Testes sorológicos para sífilis.

| Testes sorológicos                                                               | Amostras            | Vantagens                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Desvantagens                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Testes não treponêmicos</b>                                                   |                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <i>Venereal Disease Research Laboratory</i> (VDRL)                               | Soro, Plasma ou LCR | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pode ser usado para monitorar a eficácia do tratamento;</li> <li>• Único teste adequado para o diagnóstico da neurosífilis utilizando amostra de LCR;</li> <li>• Baixo custo e simples execução;</li> <li>• Os resultados podem ser obtidos em menos de 15 minutos;</li> <li>• Sensibilidade de 71 a 100% dependendo da fase da sífilis;</li> <li>• Especificidade de 98%.</li> </ul>                                                                                                                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Resultados falso-positivos devido a reatividade cruzada com condições agudas e crônicas;</li> <li>• Deve ser executado de forma manual;</li> <li>• Subjetivo;</li> <li>• Requer o uso de um microscópio;</li> <li>• A suspensão antigênica deve ser preparada recente;</li> <li>• Não utiliza sangue total, requer uma centrífuga.</li> </ul>                                                                |
| <i>Rapid Plasma Reagin</i> (RPR) ou <i>Toluidine unheated serum test</i> (TRUST) | Soro ou Plasma      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pode ser usado para monitorar a eficácia do tratamento;</li> <li>• Baixo custo e relativamente simples comparado com VDRL;</li> <li>• Não requer a utilização de microscópio, o resultado pode ser lido a olho nu;</li> <li>• A suspensão antigênica pode ser adquirida comercialmente e estável (não precisa ser preparada recente);</li> <li>• Os resultados podem ser obtidos em menos de 15 minutos;</li> <li>• Sensibilidade de 73 a 100% dependendo da fase da sífilis;</li> <li>• Especificidade de 98%.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Resultados falso-positivos pode ocorrer em lugares empoeirados (por exemplo, clínicas rurais) e devido a reatividade cruzada com condições agudas e crônicas;</li> <li>• Resultados falso-negativos podem ocorrer na sífilis recente e devido ao efeito prozona;</li> <li>• Deve ser executado de forma manual;</li> <li>• Subjetivo;</li> <li>• Não utiliza sangue total, requer uma centrífuga.</li> </ul> |
| <b>Testes treponêmicos</b>                                                       |                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Teste de anticorpos treponêmicos fluorescentes com absorção (FTA-ABS)            | Soro, Plasma ou LCR | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Considerado padrão ouro em muitos países de renda média e baixa;</li> <li>• Sensibilidade de 96 a 100% dependendo da fase da sífilis;</li> <li>• Especificidade de 98%.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Execução demorada, alto custo e difícil a leitura do teste;</li> <li>• Requer reagentes especializados e um microscópio;</li> <li>• Ocasionalmente resultados falso-positivos podem ocorrer durante a gravidez ou em pacientes com doenças autoimunes.</li> </ul>                                                                                                                                            |

Tabela 2. Continua.

| Testes sorológicos                                                                               | Amostras       | Vantagens                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Desvantagens                                                                                                                                                                                                             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ensaio de aglutinação passiva de partículas para <i>T. pallidum</i> (TPPA)                       | Soro ou Plasma | <ul style="list-style-type: none"> <li>Baixo custo;</li> <li>Sensibilidade de 82 a 100% dependendo da fase da infecção;</li> <li>Especificidade de 99%.</li> </ul>                                                                                                                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>Execução manual;</li> <li>Subjetivo;</li> </ul>                                                                                                                                   |
| Ensaio de hemaglutinação para <i>T. pallidum</i> (TPHA) e Ensaio de microhemaglutinação (MHA-Tp) | Soro ou Plasma | <ul style="list-style-type: none"> <li>Baixo custo;</li> <li>Sensibilidade de 82 a 100% dependendo da fase da infecção;</li> <li>Especificidade de 99%.</li> </ul>                                                                                                                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>Execução manual;</li> <li>Subjetivo;</li> </ul>                                                                                                                                   |
| Imunoensaio enzimático (EIA)                                                                     | Soro           | <ul style="list-style-type: none"> <li>Pode ser automatizado, especialmente adequado para triagem de alto rendimento de população assintomática e doadores de sangue ou plasma.</li> <li>Sensibilidade de 82 a 100% dependendo da fase da infecção;</li> <li>Especificidade de 99%.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Alto custo;</li> <li>Requer equipamentos de laboratório;</li> <li>EIA IgM tem baixa sensibilidade na sífilis ativa, não é útil na avaliação da eficácia do tratamento.</li> </ul> |
| Imunoensaio quimioluminescência (CIA)                                                            | Soro           | <ul style="list-style-type: none"> <li>Pode ser automatizado, especialmente adequado para triagem de alto rendimento de população assintomática e doadores de sangue ou plasma.</li> <li>Sensibilidade de 82 a 100% dependendo da fase da infecção;</li> <li>Especificidade de 99%.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Alto custo;</li> <li>Requer equipamentos de laboratório;</li> </ul>                                                                                                               |

LCR, líquido cefalorraquidiano.

Fonte: Adaptação do PEELING et al., 2017.

Os testes não treponêmicos medem os níveis de anticorpo de imunoglobulina G (IgG) e imunoglobulina M (IgM) produzido pelo hospedeiro em resposta ao antígeno lipídico (na maior parte cardiolipina) que é liberado a partir das células hospedeiras danificadas. Como também algumas cardiolipinas são liberadas pelas espiroquetas durante a infecção (GAO et al., 2018; MORSHED; SINGHB, 2015). Os testes mais utilizados são: *Rapid Plasma Reagin* (RPR) ou *Venereal Disease Research Laboratory* (VDRL). Esses ensaios sorológicos são utilizados principalmente para o acompanhamento e eficácia do tratamento do paciente, uma vez que a titulação de anticorpos é relacionada com a atividade da infecção. Dessa forma, para demonstrar que o tratamento foi eficaz, tem que ocorrer uma diminuição de quatro vezes na titulação, que

é equivalente a uma mudança de duas diluições (por exemplo, 1:16 a 1:4). Essa diminuição ocorre de 3 a 6 meses após o início do tratamento recomendado. Entretanto, em alguns indivíduos, os anticorpos não treponêmicos podem persistir por um longo período, podendo ocorrer resultados falso-positivos nesses testes, denominados de “serofast” (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2015).

Os testes sorológicos treponêmicos foram desenvolvidos utilizando a cepa Nichols de *T. pallidum*, tanto as células inteiras ou antígenos derivados das células de *T. pallidum*. Esses testes podem detectar anticorpos IgM ou IgG. A maioria dos laboratórios de diagnóstico utilizam o Ensaio de hemaglutinação para *T. pallidum* (TPHA) e o Ensaio de microhemaglutinação (MHA-Tp); o Ensaio de aglutinação passiva de partículas para *T. pallidum* (TPPA) ou o Teste de anticorpos treponêmicos fluorescentes com absorção (FTA-ABS) (MORSHED; SINGHB, 2015). Por outro lado, esses testes não podem ser completamente automatizados, e os seus resultados são avaliados de forma subjetiva (LI et al., 2016).

No passado, estes antígenos eram gerados pela propagação de *T. pallidum* em animais, no entanto, antígenos clonados e produzidos em sistemas de expressão heterólogas já foram utilizados para o desenvolvimento de testes sorológicos da sífilis. Um *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) com princípio de imunocaptura composto pela combinação de três proteínas recombinantes (TpN15, TpN17 e TpN47) vem sendo utilizado para triagem de amostras, sendo capaz de detectar anticorpos em quase todas as fases da sífilis (SUN et al., 2009). No entanto, quando os testes treponêmicos são reagentes, a maioria dos pacientes será reagente para o resto de suas vidas, independentemente do tratamento realizado ou a atividade da infecção. Contudo, quando tratados durante a fase primária aproximadamente 15% a 25% dos pacientes tornam-se não reagentes após 2 a 3 anos (SEÑA; WHITE; SPARLING, 2010).

## 2.5. Diagnóstico molecular

Novas estratégias de detecção foram desenvolvidas nas últimas décadas, baseados em avanços no conhecimento da sequência do genoma do *T. pallidum*. Dentro dessas estratégias, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é considerada uma ferramenta importante na detecção do agente etiológico da sífilis, por meio da amplificação de vários genes alvos, tais como *bmp* e *tp47* que codificam proteínas de membrana e o *polA* que codifica a DNA polimerase do tipo I, uma enzima de grande importância no reparo e replicação do DNA (GAYET-AGERON et al., 2013; MARTIN et al., 2009). O gene *polA* do *T. pallidum* apresenta maior quantidade do

aminoácido cisteína, cerca de 24 cisteínas. Essa é uma importante característica que difere a DNA polimerase I do *T. pallidum* das outras espécies (LIU et al., 2001).

O DNA do *T. pallidum* foi detectado através da PCR em várias amostras, como de sangue total, soro, plasma, líquido cefalorraquidiano, exsudato da lesão, tecidos fixados, lesões gástricas, osso, urina e fluido intra-ocular (BEHRHOF et al., 2008; BUFFET et al., 2007; CHEN et al., 2006; FABRICIUS et al., 2013; GAYET-AGERON et al., 2009; GRANGE et al., 2012; TROUTBECK; CHHABRA; JONES, 2013). A técnica da PCR tem o potencial de fornecer um diagnóstico sensível e rápido nas fases iniciais da sífilis, especificamente, em locais nos quais não é possível realizar a detecção direta do *T. pallidum* através da técnica de MCE (HEYMANS et al., 2010; SHIELDS et al., 2012).

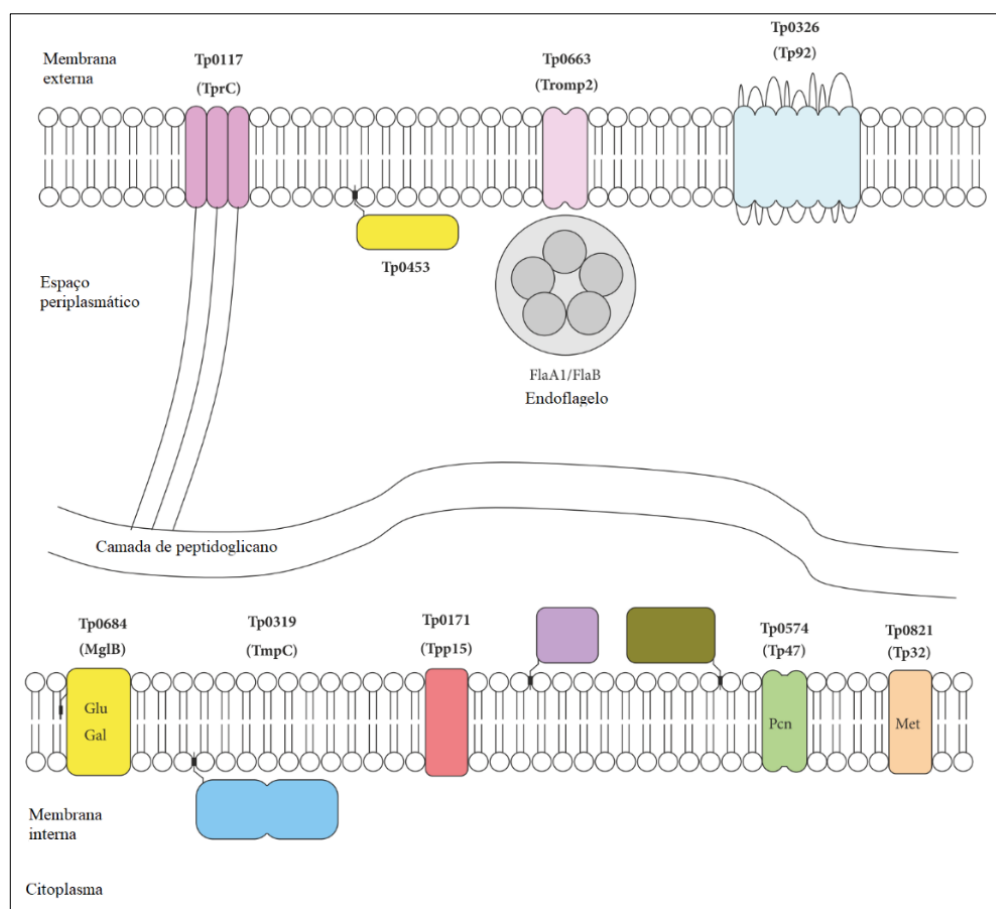
O tratamento de 4 pacientes com sífilis foi acompanhado pela técnica da PCR em Tempo Real (qPCR) e demonstrou que após 56 horas de tratamento com penicilina benzatina não foi encontrado o DNA treponêmico nas amostras de sangue total. Esse estudo evidenciou que a qPCR tem potencial para diagnóstico e acompanhamento do tratamento dos pacientes com sífilis (TIPPLE et al., 2015). Embora os testes sorológicos não treponêmicos sejam utilizados para acompanhar a eficácia do tratamento da sífilis, eles identificam anticorpos não específicos do *T. pallidum*.

Estudo de proteômica determinou o padrão proteico de *T. pallidum*. A nomenclatura padronizada é o prefixo TpN (abreviatura da *T. pallidum* Nichols) juntamente com o valor de massa molecular relativa, baseada nos resultados da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) (NORRIS, 1993). Outro estudo proteômico do *T. pallidum* cepa Nichols avaliou 908 proteínas, sendo que 34 destas proteínas foram significativamente antigênicas com soros de pacientes em todas as fases da sífilis, indicando que estas poderiam ser potenciais alvos a serem utilizados para o desenvolvimento de testes de diagnósticos e/ou vacinas (BRINKMAN et al., 2006).

A técnica da eletroforese em gel bidimensional (2DGE) foi empregue para análise da cepa Nichols e foram identificados 148 pontos que representavam 88 polipeptídeos por suas posições relativas em padrões 2DGE, considerados produtos de genes de alto nível de expressão (MCGILL et al., 2010). Portanto, indicando potenciais antígenos para serem utilizados no diagnóstico sorológico da sífilis. Nas últimas décadas testes sorológicos utilizando uma ou mais proteínas recombinantes do *T. pallidum* vem sendo desenvolvidos. As proteínas recombinantes TpN15 (Tp0171), TpN17 (Tp0435), TpN47 (Tp0574), Gpd (Tp0257), Tp92 (Tp0326) e Tp0453 já foram utilizadas para o diagnóstico da sífilis, as quais apresentaram boa

reprodutibilidade, objetividade e grande potencial para uso em diagnósticos por automação (LIN et al., 2010; SMITH et al., 2013; SUN et al., 2009; VAN VOORHIS et al., 2003). No entanto, a confirmação do diagnóstico necessita ainda de testes complementares, uma vez que estes apresentam problemas de especificidade e sensibilidade e principalmente devido às diferenças clínicas e sorológicas das fases da sífilis (PARK et al., 2011).

A Tp0684, denominada de Tp38 ou MglB-2 é uma lipoproteína do *T. pallidum* (Figura 2). Acredita-se que esta proteína, através de suas porções lipídicas está ligada ao folheto exterior da membrana citoplasmática do *T. pallidum*. Por possuir localização periplasmática consistente, atua como receptor para glicose (Lipoproteína de ligação à Glicose) (BRAUTIGAM et al., 2016). A Tp38 apesar de possuir uma topologia incomum a outras proteínas de sua classe, ela sofre mudanças conformacionais e liga-se à D-glicose de forma similar a outras proteínas do tipo Mgl, o que facilita a captação da D-glicose em *T. pallidum* (BRAUTIGAM et al., 2018). Sendo assim, esta proteína pode desempenhar o papel central para a virulência de *T. pallidum* por compreender a via de absorção de energia necessária para sobrevivência deste patógeno.



**Figura 2.** Modelo topológico de lipoproteínas soro-reativas de *T. pallidum*.

Fonte: Adaptação de KUBANOV et al., 2017.

A Tp0750 é uma proteína que possui um domínio de interação proteína-proteína, comumente observado em proteínas de ligação extracelular. Esta proteína é bem conservada nos treponemas patogênicos, é multifuncional e capaz de degradar os coágulos que limitam a infecção, tanto pela inibição da formação de coágulos através da degradação das proteínas da cascata de coagulação do hospedeiro, como pela promoção da dissolução do coágulo por complexação com proteínas hospedeiras envolvidas na cascata fibrinolítica. Estas características facilitam a degradação das proteínas de ligação extracelular através da metalloprotease dos peptídeos da matriz dos componentes do hospedeiro. Em geral, o *T. pallidum* é capaz de interagir com componentes-chave dos sistemas de coagulação/fibrinolítico do hospedeiro através da ação coordenada das proteínas Tp0750/pallilissina fisicamente e funcionalmente ligadas, promovendo a disseminação treponêmica (HOUSTON et al., 2014, 2015).

A Tp0792, denominada de FlaB2, é uma proteína flagelar que constitui uma parte significativa do proteoma do *T. pallidum* (OSBAK et al., 2016) e possui alta expressão durante a infecção sífilítica (SMAJS et al., 2005). A FlaB2 consiste em um quadro de leitura aberto de 861 nucleotídeos capaz de codificar uma proteína de 31,3 kDa (PALLESEN; HINDERSSON, 1989). Portanto, essa proteína flagelar fornece uma motilidade “saca-rolhas” característica do *T. pallidum*, que é significativa para invasão e disseminação desse patógeno no hospedeiro humano (KUBANOV; RUNINA; DERYABIN, 2017).

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo a produção de antígenos recombinantes para o desenvolvimento de um diagnóstico sorológico sensível e específico para detecção do *T. pallidum*.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar de forma clínica as amostras de soros humanos coletadas;
- Analisar regiões codificadoras de polipeptídeos do *T. pallidum* com potencial antigênico para utilização em testes sorológicos através das ferramentas de bioinformática;
- Desenhar e construir versões sintéticas de três genes selecionados com otimização de códons para expressão em sistema heterólogo de *Escherichia coli*;
- Clonar e expressar em *E. coli* os três genes sintéticos de *T. pallidum* selecionados;
- Purificar as três proteínas recombinantes de *T. pallidum* que foram expressas;
- Avaliar a antigenicidade das proteínas purificadas rTp0684, rTp0750 e rTp0792 pelas técnicas sorológicas ELISA e *Western blot* com soros caracterizados;
- Avaliar a sensibilidade e especificidade das proteínas purificadas rTp0684, rTp0750 e rTp0792 com soros de pacientes caracterizados.

#### **4. Artigo científico**

**Artigo para publicação no periódico *International Journal of Infectious Diseases***

**The recombinant proteins Tp0684, Tp0750, and Tp0792 as antigens for the serodiagnosis of syphilis**

## SUMMARY

**Background:** The incidence of syphilis has increased alarmingly in recent years and the diagnosis continues to be a challenge, which leads the search for alternative and effective methods for its diagnosis. The objective of this study was to produce recombinant antigens for *T. pallidum* detection.

**Methods:** The selections of the antigens were based on proteomic studies and analysis of bioinformatics tools. The genes selected were chemically synthesized and ligated into pAE expression vector. Recombinant plasmids were expressed into *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) expression competent cells and purified by nickel affinity chromatography. The antigenicity of the recombinant proteins was evaluated by Western blot and ELISA techniques with sera from patients with primary syphilis ( $n = 6$ ), latent syphilis ( $n = 34$ ) and uninfected control sera ( $n = 10$ ).

**Results:** The rTp0684, rTp0750 and rTp0792 recombinant proteins were expressed in *E. coli* and purified. These recombinant proteins were recognized by sera from patients with primary and latent syphilis. In the ELISA, the rTp0750-ELISA receiver operating characteristic (ROC) showed 0.9825 of the area under the ROC, indicating high diagnostic efficacy. When the diagnostic specificity achieved 100%, the diagnostic sensitivity was up to 92.5%.

**Conclusion:** In conclusion, the rTp0750 *T. pallidum* protein have potential for screening test for syphilis under routine conditions in a diagnostic laboratory.

**Keywords:** Recombinant antigen; *Treponema pallidum*; ELISA; syphilis; serodiagnosis.

## 1. Introduction

Syphilis is an infection caused by *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* and is mainly transmitted by sexual contact with an infectious lesion or via vertical transmission during pregnancy (LaFond et al. 2006). The incidence of syphilis has increased globally, with an estimated of 6 million new cases per year, most in low- and middle-income countries (Newman et al. 2015). According to the Brazilian Ministry of Health, there was a steady increase in the number of syphilis cases from 2012 to 2017, with 87,593 cases of acquired syphilis reported in 2017 in Brazil. Additionally, Mato Grosso do Sul (a state in Central-West Brazil) had a higher rate of acquired syphilis than the national average in 2016, with more than 50 cases per 100,000 inhabitants (Brasil 2018).

Surveillance and control strategies for infectious diseases such as syphilis mainly include diagnosis, treatment and follow-up of confirmed cases. However, the diagnosis of this infection continues to be a challenge, due to the difficulty of *in vitro* culture of *T. pallidum* (Herring et al. 2006). Thus, alternative and effective methods for detection this pathogen are necessary. Treponemal and nontreponemal tests are used for the indirect detection of *T. pallidum* in asymptomatic patients, during the latent period which individuals can remain infectious (Centers for Disease Control 2015).

Treponemal serological tests detect specific antibodies of *T. pallidum*. In some cases, when reagents may remain elevated throughout life, regardless of the treatment performed or the infection activity (Workowski and Bolan 2015). Therefore, the employ of proteins expressed in all stages of syphilis in the development of more sensitive and specific serological diagnoses is a promising strategy to reduce the number of cases of *T. pallidum* false positive diagnostic (McKevitt et al. 2005; Brinkman et al. 2006). For this,

it is essential that new recombinant *T. pallidum* proteins be evaluated in different formulations.

New treponemal tests have been developed using recombinant *T. pallidum* antigens to have a high specificity (95.1-100%) and sensitivity (92.6-99.5%) for the screening of suspected syphilis cases (Sun et al. 2009; Jiang et al. 2013, 2016; Xie et al. 2016; Xu et al. 2016). Proteomic studies revealed novel *T. pallidum* surface-exposed proteins, adhesins, and periplasmic and flagellar proteins, promising candidates for the improvement of syphilis diagnostics (McGill et al. 2010; Kubanov et al. 2017). The Tp0684 is an inner membrane lipoprotein of *T. pallidum* and the biological function is a receptor for glucose that changes its conformation upon binding its preferred substrate, D-glucose (Brautigam et al. 2016). Therefore, this protein plays a key role in the viability and pathogenicity of *T. pallidum*, being involved in the pathway of energy absorption of this pathogen, making it a good antigen candidate for diagnostic testing.

Tp0750, which has a protein-protein interaction domain, commonly seen in extracellular binding proteins. This protein is multifunctional and capable of degrading clots that limit infection. In general, *T. pallidum* is able to interact with key components of the host's coagulation/fibrinolytic systems, promoting *T. pallidum* dissemination (Houston et al. 2014, 2015). The other potential antigen selected was the Tp0792 (FlaB2) is a flagellar protein that constitutes a significant part of the *T. pallidum* proteome (Smajs et al. 2005; Osbak et al. 2016). Additionally, a recent review study selected an optimal antigens panel with potential use for serological tests, among them Tp0684, Tp0750 and Tp0792 were selected in this study (Kubanov et al. 2017).

This study aimed to performed a rational selection of *T. pallidum* antigens by genomic and proteomic analysis and produce recombinant antigens for serodiagnostic test.

## 2. Material and methods

### 2.1. Strains and plasmids

*E. coli* TOP10 (Invitrogen) was used as a host strain for manipulation. *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) (Invitrogen, USA) was used as expression strain. The pAE expression vector (Ramos et al. 2004) was used as cloning and expression system. The pAE vector contains the T7 promoter and allows expression of the recombinant protein fused to His-tag at the N-terminus.

### 2.2. *In silico* selection of coding sequences and synthetic genes construction

Coding DNA sequences (CDS) of *T. pallidum* (GenBank accession no. CP004010.2) were analyzed by bioinformatics software (SignalP and Vector NTI® 11) (Petersen et al. 2011; Invitrogen, USA) and protein databases (PFAM and PROSITE)(Bateman et al. 2004; Hulo et al. 2006). CDS encoding surface-exposed, secreted proteins or proteins related to pathogenesis, proteins expressed in all stages of syphilis and with binding function in host cells were selected. Vector maps drawn in Vector NTI® 11 (Invitrogen, USA). The codon optimization was performed by Biomatik software (Canada) to achieve high levels of expression in *E. coli*. The optimized genes were synthesized and cloned into commercial cloning vector pUC57 (+) by Biomatik Company.

Physicochemical properties calculation of selected proteins was performed using ProtParam (Wilkins et al. 1999), from ExPASy server that provided molecular weight, theoretical PI, amino acid composition, extinction coefficient, estimated half-life, instability and aliphatic indexes. The platforms PSORTb 3.0.2 (Yu et al. 2010), CELLO v.2.5 (Yu et al. 2004) and Gneg-mPLoc (Shen et al. 2010) were used for the prediction of subcellular location (Shen and Chou 2010). The sequence was evaluated with the three

bioinformatics tools, for a better accuracy in the result. Prediction of the presence and location of signal peptides of cleavage was used SignalP (Petersen et al. 2011) and prediction of protective antigen done was evaluated with VaxiJen 2.0 (Doytchinova and Flower 2007).

### 2.3. Cloning, expression and purification of the recombinant proteins

The optimized genes were ligated into pAE expression vector (Ramos et al., 2004). The ligation products were transformed into *E. coli* TOP10 (Invitrogen, USA) electro competent cells. Recombinant plasmids were transformed into *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) (Invitrogen, USA). One recombinant clone of each plasmid was used to inoculate 10 ml of Luria–Bertani (LB) medium containing 100 µg/mL ampicillin (Sigma-Aldrich, USA), which was incubated in shaker (37 °C, 200 rpm) until OD<sub>600</sub> = 0.6. At this moment, expression of the recombinant proteins was induced with Isopropylthio-b-d-galactosidase (IPTG) (Invitrogen, USA) with a final concentration of 0.5 mM, and the culture was grown at incubated in shaker (37 °C, 200 rpm) for 3 h. The recombinant proteins were purified from the supernatant by affinity chromatography using HisTrap<sup>TM</sup> HP 1 mL columns prepacked with precharged Ni Sepharose<sup>TM</sup> (GE Healthcare, USA) using the ÄKTAprime<sup>TM</sup> automated liquid chromatography system. The BCA<sup>TM</sup> Protein Assay kit (Pierce, USA) was used to measure the recombinant proteins concentrations according to the instructions provided by the manufacturer.

### 2.4. Serum samples

A total of 40 syphilis clinical serum samples were obtained from patients with clinically diagnosed syphilis at the 12 prisons in Central-West Brazil from January 2013 to December 2013 (Correa et al. 2017), including 6 cases of primary syphilis and 34 cases

of latent syphilis. A total of 10 cases without syphilis infection were used as controls. The stages of syphilis were established by the clinical symptoms and laboratory serology tests as follows: primary syphilis, typical chancre and reactive syphilis serology test; and latent syphilis, no clinical symptoms and no history of treatment for syphilis during the previous 2 years and reactive syphilis serology test (Jiang et al. 2013). This study was approved by the research ethics committee at the Universidade Federal da Grande Dourados (no. 191.877).

## 2.5. Western blot analysis

To confirm the presence and the apparent molecular mass of the recombinant proteins expressed in *E. coli*, Western blot was carried out using mAb anti-histidina (Sigma-Aldrich, USA) diluted 1:5000. Purified recombinant proteins were separated by 12% SDS-PAGE, electrotransferred into a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, USA) and blocked with 5% non-fat dry milk in PBS at 37 °C for 2 h. After washing with PBS-T, the membrane was incubated with mouse peroxidase-conjugated monoclonal anti-6× His IgG (Sigma-Aldrich, USA), diluted 1:6000 in blocking buffer. Immunoreactive protein bands were detected with 0.005% (w/v) 4-chloro-1-naphthol and 0.015% (v/v) hydrogen peroxidase (Sigma-Aldrich, USA) in PBS.

## 2.6. Antigenicity assay of recombinant proteins by Western blot

Recombinant proteins were electrophoresed in a 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and then transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare, USA). Membranes were incubated in blocking buffer (Phosphate-buffered saline containing 5% nonfat dry milk and 0.05% Tween 20) for 12-20 h at 4 °C. After washing with PBST, membranes were incubated individually with

adsorbed sera, diluted 1:100 in blocking buffer, pool of 5 human sera with latent syphilis, for 2 h at 37 °C. Membranes were washed with PBST (3 × 5 min per wash) and incubated for 1 h at 37 °C with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-human IgG (Sigma-Aldrich, USA) diluted 1:6000 in blocking buffer. Membranes were washed in PBST were detected using 3,3'-Diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, USA) and (3 × 5 min per wash) and immunoreactive protein bands 0.015% (v/v) hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich, USA) in PBS.

## 2.7. Indirect IgG Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs)

The optimal concentrations of recombinant proteins rTp0684, rTp0750, rTp0792 and the ideal dilutions of sera were determined by chessboard titration approach. Ninety-six-well plates (Costar, USA) were coated overnight at 4 °C with recombinant proteins at corresponding optimal concentrations in coating buffer (0.05 M carbonate buffer, pH 9.8). After washing three times with PBST (1X phosphate-buffered saline with 0.05% Tween 20), plates were then blocked with 200 µl PBSTM (PBST with 5% nonfat dry milk) for 2 h at 37 °C. Serum samples were diluted at 1:100 with PBSTM, added to each well and then incubated for 1 h at 37 °C. After being washed for five times, they were incubated for 1 h at 37 °C with 1: 10,000 dilution of horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-human IgG (Sigma, USA). Finally, 100 µl of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma, USA) was added to each well and the incubation for 20 min at room temperature in darkness, the reaction was stopped by the addition of 50 µl of 1 M sulfuric acid. The absorbance at 450 nm was measured using the iMark™ microplate absorbance reader (Bio-Rad, USA). All samples were tested in duplicate.

## 2.8. Statistical analysis

GraphPad Prism 7.0 software (San Diego, CA, USA) was used for statistical analysis of the data. A receiver operating characteristic (ROC) curve was plotted. The area under the curve (AUC) was identified, sensitivity and specificity were calculated.

## 3. Results

### 3.1. Analyses *in silico* of the recombinant proteins

The physicochemical parameters evaluated using ProtParam (Gasteiger et al. 2005) of the ExPASy platform for the three recombinant proteins rTp0684, rTp0750 and rTp0792 are shown in Table 1.

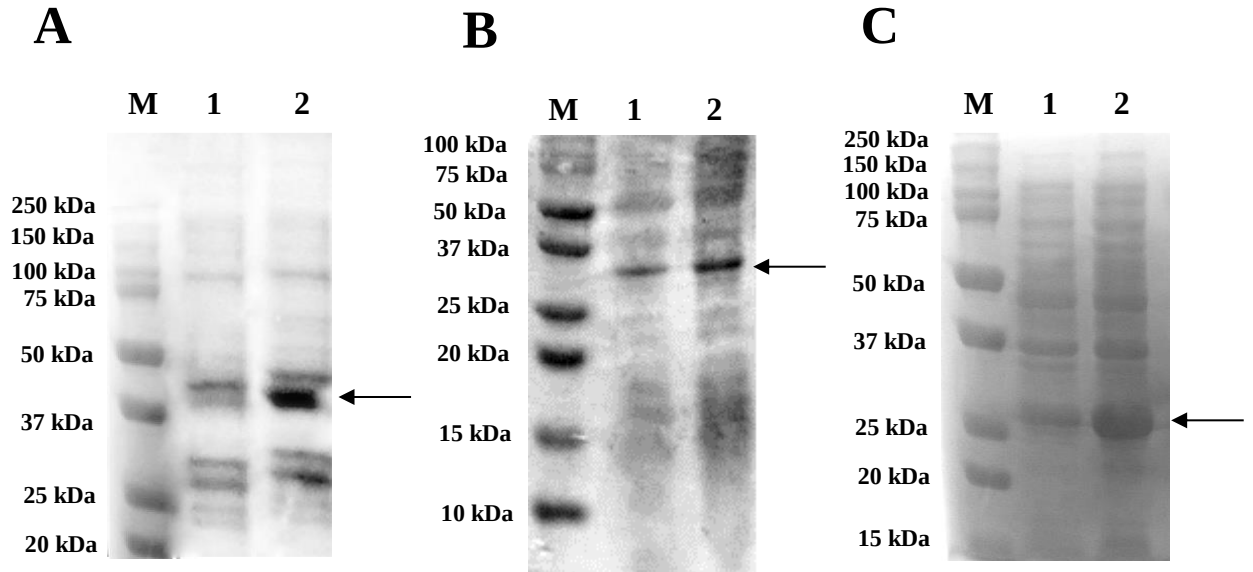
**Table 1.** Analysis of the physicochemical parameters and Bioinformatic software for the recombinant proteins rTp0684, rTp0750 and rTp0792.

| Physicochemical property                         | rTp0684          | rTp0750          | rTp0792          |
|--------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Number of amino acids                            | 414              | 234              | 297              |
| Molecular weight (kDa)                           | 45.7             | 27.5             | 32.9             |
| Theoretical pI                                   | 5.59             | 8.91             | 6.84             |
| Total of negatively charged residues (Asp + Glu) | 48               | 30               | 30               |
| Total of positively charged residues (Arg + Lys) | 39               | 34               | 29               |
| Extinction coefficient                           | 51.255           | 34.045           | 12.95            |
| Abs. 0,1% (=1g/l)                                | 1.155            | 1.248            | 0.396            |
| Instability index (II)                           | 24.39            | 51.77            | 32.31            |
| Aliphatic index                                  | 78.67            | 82.48            | 85.82            |
| Grand average of hydropathicity                  | -0.26            | -0.588           | -0.349           |
| <b>Bioinformatic (software)</b>                  |                  |                  |                  |
| Subcellular Localization (Psortb)                | Periplasm        | Cytoplasmic      | Periplasm        |
| Subcellular Localization (Cello)                 | Extracell        | Cytoplasmic      | Extracell        |
| Subcellular Localization (Gneg-mPLoc)            | Periplasm        | Inner Membrane   | Extracell        |
| Peptide Signal (SignalP)                         | No               | No               | No               |
| Prediction of protective antigen (VaxiJen)       | Probable Antigen | Probable Antigen | Probable Antigen |

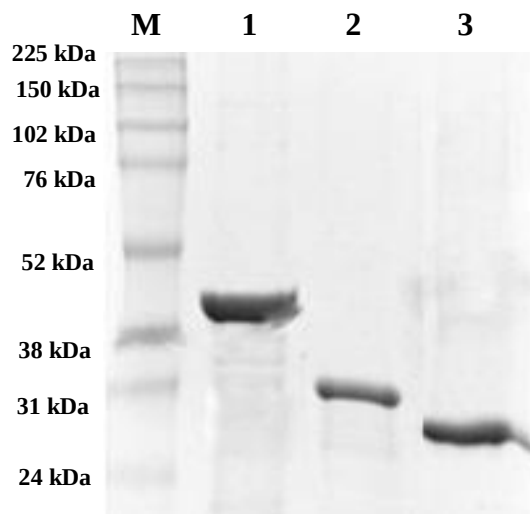
We performed an analysis using three bioinformatics tools to predict the subcellular localization of a protein. Two of the softwares used PSORTb 3.0.2 (Yu et al. 2010) and Gneg-mPLOC (Shen et al. 2010) demonstrated Tp0684 to be a periplasmic protein and CELLO v.2.5 (Yu et al. 2004) predicted for an extracellular structure (Table. 1). For the Tp0750 it was indicated by two software PSORTb 3.0.2 (Yu et al. 2010) and CELLO v.2.5 (Yu et al. 2004) a structure for cytoplasm and other software (Gneg-mPLOC) an internal membrane structure. The two softwares Gneg-mPLOC (Shen et al. 2010) and CELLO v.2.5 (Yu et al. 2004) used have predicted that Tp0792 is an extracellular protein and PSORTb 3.0.2 (Yu et al. 2010) which is a periplasmic protein (Table. 1).

### 3.2. Expression, purification and identification of the recombinant proteins

The recombinant proteins were expressed as His-tagged proteins in *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) (Invitrogen, USA) and purified from cell-free supernatants by affinity chromatography using Ni<sup>2+</sup>-NTA. The recombinant proteins as N-terminal 6× His-tagged fusions, the observed molecular masses were 45.7 kDa (rTp0684), 27.5 kDa (rTp0750) and 32.9 kDa (rTp0792) (Figure 1). The yields of purified proteins were 0.367 mg/mL (rTp0684), 0.149 mg/mL (rTp0750) and 0.633 mg/mL (rTp0792). The recombinant proteins purified appeared as a single band and was judged to have a purity of >98% via SDS-PAGE analysis (Figure 2).



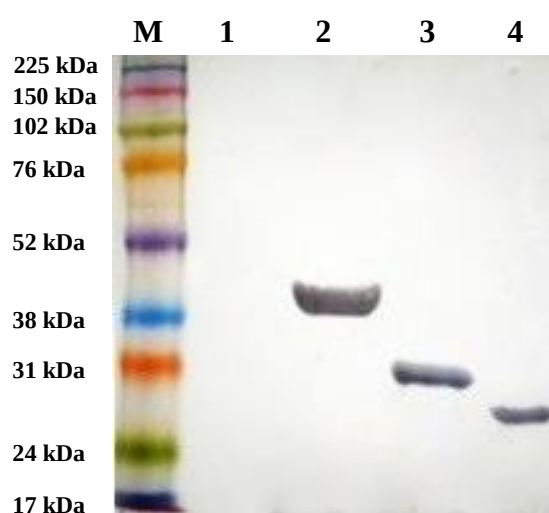
**Figure 1.** 12% SDS-PAGE analysis of expression of recombinant proteins. A. rTp0684 (45.7 kDa), B. rTp0792 (32.9 kDa), C. rTp0750 (27.5 kDa), M = molecular mass markers Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards (Bio-Rad, USA); 1= no induced; 2 = induced with IPTG for 3 h. The arrows show recombinant protein expression.



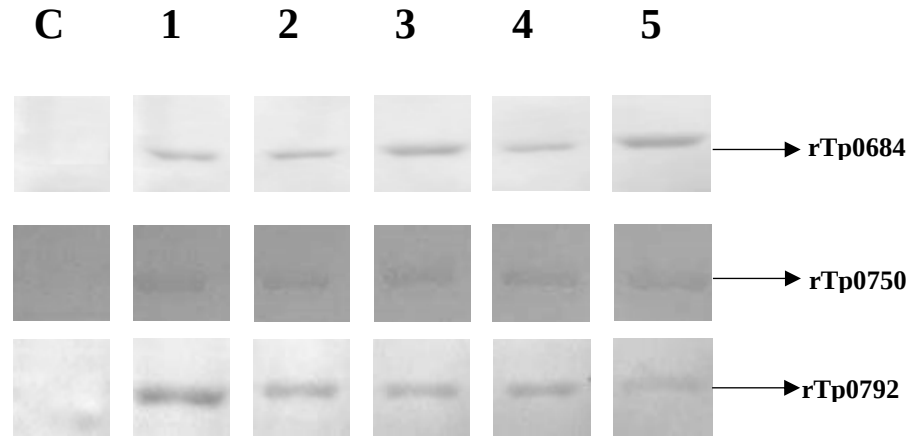
**Figure 2.** 12% SDS-PAGE analysis of purification of recombinant proteins. M = molecular mass markers Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards (Bio-Rad, USA); Lane 1, rTp0684 (45.7 kDa); Lane 2, rTp0792 (32.9 kDa) and Lane 3, rTp0750 (27.5 kDa).

### 3.3. Western blot

The recombinant proteins purified were recognized by MAb anti-6 × His-tag (Figure 3). The antigenicity of rTp0684, rTp0750 and rTp0792 were confirmed using and serum samples from syphilis patients ( $n = 34$ ) (Figure 4) included patients with latent syphilis VDRL 1/8 ( $n = 11$ ), 1/16 ( $n = 4$ ), 1/32 ( $n = 3$ ), 1/64 ( $n = 7$ ), 1/128 ( $n = 4$ ), 1/256 ( $n = 2$ ) and 1/2048 ( $n = 3$ ). All these samples showed reactivity to recombinant proteins rTp0684, rTp0750 and rTp0792. Reactivity with the uninfected control sera ( $n = 10$ ) were not detected (Figure 4).



**Figure 3.** Western blot analysis of the recombinant proteins rTp0685, rTp0750 and rTp0792, challenged against anti-histidine antibody. Column M, Full-Range Rainbow Molecular Marker (GE Healthcare Life Sciences, UK); Column 1, Negative Control - BSA; Column 2, rTp0684 (45.7 kDa); Column 3, rTp0792 (32.9 kDa); Column 4, rTp0750 (27.5 kDa).



**Figure 4.** Immunoreactivity analysis of the recombinant protein rTp0684, rTp0750 and rTp0792 by the Western blot technique with pool of uninfected control sera (C), pool of sera patient with latent syphilis and VDRL titration of 1/2048 (1), 1 / 256 (2), 1/128 (3), 1/16 (4), and 1/8 (5).

### 3.4. Performance of recombinant proteins in IgG ELISA

The optical density (OD) of the rTp0684, rTp0750 and rTp0792-ELISA and clinical diagnosis of syphilis were used to draw a ROC curves (Figure 5). The area under curve were 0.86 (95% confidence interval = 0.7362 to 0.9838), 0.9825 (95% confidence interval = 0.9537 to 1.011) and 0.76 (95% confidence interval = 0.6117 to 0.9083) to rTp0684, rTp0750 and rTp0792-ELISA, respectively. To determine the diagnostic efficacy, the ROC curves were examined. The OD value of 0.403 in rTp0684-ELISA was used as a cut-off value. When the OD was >0.403, the specificity was 100%. So the cut-off value for rTp0750-ELISA is 0.5345 and rTp0792 is 0.3448.

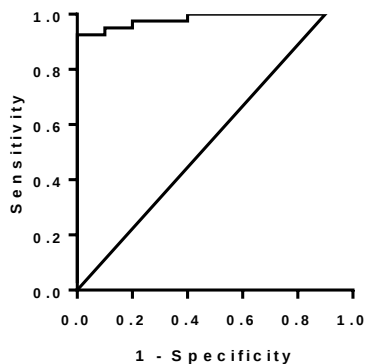
The rTp0684, rTp0750 and rTp0792 recombinant proteins were tested against a serum samples from syphilis patients to determine their sensitivities for the detection of IgG antibodies. Reactive serum samples ( $n = 40$ ) included those from patients with primary ( $n = 6$ ) and latent ( $n = 34$ ). The overall sensitivity of IgG ELISA was 95% for rTp0750, 52.5% for rTp0684 and 32.5% for rTp792, respectively (Table. 2).

**Table 2.** Comparison of the three serodiagnosis tests at primary and latent syphilis.

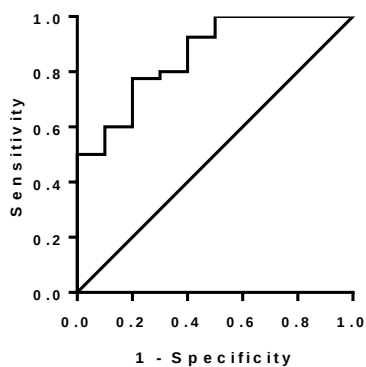
| Diagnosis        | No. of serum samples tested | No. (%) of serodiagnosis positive |                     |                     |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------------|---------------------|---------------------|
|                  |                             | rTp0684-based ELISA               | rTp0750-based ELISA | rTp0792-based ELISA |
| Primary syphilis | 6                           | 3 (50)                            | 6 (100)             | 2 (33.33)           |
| Latent syphilis  | 34                          | 18 (52.94)                        | 32 (94.11)          | 11 (32.35)          |
| Total            | 40                          | 21 (52.5)                         | 38 (95)             | 13 (32.5)           |

**Figure 5.** A. ROC curve for rTp0684-ELISA. B. ROC curve for rTp0750-ELISA. C. ROC curve for rTp0792-ELISA. 1-specificity (true negative rate) is displayed on the x-axis and the sensitivity (true positive rate) is displayed on the y-axis. The AUC for rTp0684, rTp0750 and rTp0792 were 0.86, 0.9825 and 0.76, respectively. ROC, receiver operating characteristic; AUC, area under curve.

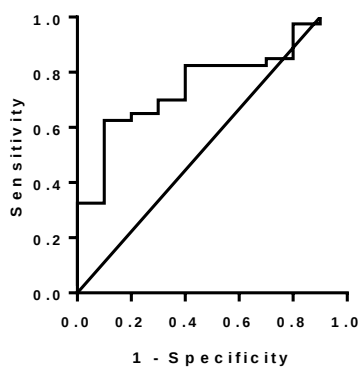
**A**



**B**



**C**



#### 4. Discussion

The diagnosis of syphilis continues to be a challenge, due to the difficulty of *in vitro* culture of the agent. In the last decade, new treponemal tests have been developed using *T. pallidum* recombinant antigens (Sun et al. 2009; Jiang et al. 2013, 2016; Smith et al. 2013; Xie et al. 2016). This approach confers greater specificity and sensitivity for the screening of patients with syphilis and the early and rapid diagnosis of syphilis contributes to the prevention of transmission. In this study, three potential antigens (Tp0684, Tp0750 and Tp0792) were selected by the characteristic of being expressed in all stages of syphilis (Brinkman et al. 2006; McGill et al. 2010).

Through the analysis of bioinformatics, it was possible to evaluate in a more rational way the expression characteristics in heterologous systems of these antigens, as well as to infer their antigenicity. The analysis of the physicochemical parameters demonstrated low isoelectric potential (pI) of rTp0684 (Table 1) and we did not have problems to express it. This characteristic can indicate problems in the expression and result insoluble proteins, as reported by previous study (Deka et al. 2004). For rTp0750 an instability index (II) of 51.77 was predicted (Table. 1), this value matches a protein with little stability (Guruprasad et al. 1990), a fact not observed in rTp0684 and rTp0792. Despite the pI values of rTp0684 and II from rTp0750, all proteins presented adequate values of grand average of hydropathicity (GRAVY), which indicates hydrophilic residues. Although these results, the three proteins were expressed in the form insoluble in *E. coli*, it is being necessary to use purification proteins under denaturing conditions. Other studies have also described that although proteins selected as hydrophilic in bioinformatics analyzes, when expressed in *E. coli* were insoluble (Simionatto et al. 2010). These results indicate that the analysis of bioinformatics alone is not sufficient for a rational choice of targets for expression and purification.

To verify antigenicity of proteins of *T. pallidum* expressed in the *E. coli*, Western blot and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA assays) were carried out using sera from patients with syphilis and healthy. The recombinant protein rTp0684, rTp0750 and rTp0792 were specifically recognized by sera from patients with latent syphilis with various titers of the VDRL (1/8 to 1/2048) by Western blot assay and ELISA, confirming the antigenicity of these proteins. The AUC was used to evaluate the diagnostic value. There is no diagnostic value when the AUC is  $<0.5$ , a low diagnostic value when the AUC is  $<0.7$ , a moderate diagnostic value when the AUC is 0.7-0.9, and a significant diagnostic value when the AUC is  $>0.9$  (Zhang et al. 2017). The AUC of the OD value from the Tp0684, Tp0750 and Tp0792-ELISA assays were 0.86 (moderate), 0.9825 (high) and 0.76 (low), respectively.

The recombinant protein rTp0792 had a low positivity rate in ELISA when compared to the other two recombinant proteins evaluated in this study. Tan et al. 2018, constructed three recombinant fragments of Tp0792, both the conserved N-terminal and the C-terminal region, and the middle variable part, and demonstrated that the N-terminal had an increase in the positivity rates for patients with primary and latent syphilis. This could be a good strategy to increase protein sensitivity.

Our results suggest rTp0750 *T. pallidum* protein is promising antigen for the development of a screening test for syphilis infection. However further research is required to evaluate their true potential to be implemented in the routine laboratory as a new diagnostic method using a more number of the sera from patients with syphilis in a different phase of the disease.

## References

- Brautigam CA, Deka RK, Liu WZ, Norgard M V. The Tp0684 (MglB-2) lipoprotein of *Treponema pallidum*: A glucose-binding protein with divergent topology. PLoS One. 2016;11(8).
- Bateman A, Lachlan Coin, Richard Durbin, Robert D. Finn, Volker Hollich, Sam Griffiths-Jones, Ajay Khanna, Mhairi Marshall, Simon Moxon, Erik L. L. Sonnhammer, David J. Studholme, Corin Yeats, Sean R. Eddy, The Pfam protein families database, Nucleic Acids Research, Volume 32, Issue suppl\_1, 1 January 2004, Pages D138–D141, <https://doi.org/10.1093/nar/gkh121>.
- Brasil M da S. Boletim Epidemiológico: Sífilis 2018. 2018;49(45):1–43.
- Brinkman MB, McKeivitt M, McLoughlin M, Perez C, Howell J, Weinstock GM, et al. Reactivity of antibodies from syphilis patients to a protein array representing the *Treponema pallidum* proteome. J Clin Microbiol. 2006;44(3):888–91.
- Centers for Disease Control. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2015. Cent Dis Control Prev [Internet]. 2015;1–156. Available from: <https://www.cdc.gov/std/stats15/std-surveillance-2015-print.pdf>
- Correa ME, Croda J, De Castro ARCM, Do Valle Leone De Oliveira SM, Pompilio MA, De Souza RO, et al. High prevalence of *Treponema pallidum* infection in Brazilian prisoners. Am J Trop Med Hyg. 2017;97(4):1078–84.
- Deka RK, Goldberg MS, Hagman KE, Norgard M V. The Tp38 (TpMg1B-2) Lipoprotein Binds Glucose in a Manner Consistent with Receptor Function in *Treponema pallidum*. J Bacteriol. 2004;186(8):2303–8.
- Doytchinova IA, Flower DR. VaxiJen: A server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. BMC Bioinformatics. 2007;8:1–7.
- Gasteiger E. et al. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker J.M. (eds) The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press.
- Guruprasad K, Reddy BVB, Pandit MW. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting *in vivo* stability of a protein from its primary sequence. "Protein Eng Des Sel [Internet]. 1990;4(2):155–61. Available from: <https://academic.oup.com/peds/article-lookup/doi/10.1093/protein/4.2.155>
- Herring A, Ballard R, Mabey D, Peeling RW. Evaluation of rapid diagnostic tests: syphilis. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2006 Dec;4(12):S33–40. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro1563>
- Houston S, Russell S, Hof R, Roberts AK, Cullen P, Irvine K, et al. The multifunctional role of the pallilysin-associated *Treponema pallidum* protein, Tp0750, in promoting fibrinolysis and extracellular matrix component degradation. Mol Microbiol. 2014;91(3):618–34.
- Houston S, Taylor JS, Denchev Y, Hof R, Zuerner RL, Cameron CE. Conservation of the host-interacting proteins Tp0750 and pallilysin among treponemes and restriction of proteolytic capacity to *Treponema pallidum*. Infect Immun. 2015;83(11):4204–16.
- Hulo N, Amos Bairoch, Virginie Bulliard, Lorenzo Cerutti, Edouard De Castro, Petra S. Langendijk-Genevaux, Marco Pagni, Christian J. A. Sigrist, The PROSITE

- database, Nucleic Acids Research, Volume 34, Issue suppl\_1, 1 January 2006, Pages D227–D230,
- Jiang C, Xiao J, Xie Y, Xiao Y, Wang C, Kuang X, et al. Evaluation of FlaB1, FlaB2, FlaB3, and Tp0463 of *Treponema pallidum* for serodiagnosis of syphilis. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2016;84(2):105–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.10.005>
- Jiang C, Zhao F, Xiao J, Zeng T, Yu J, Ma X, et al. Evaluation of the recombinant protein TpF1 of *Treponema pallidum* for serodiagnosis of syphilis. *Clin Vaccine Immunol*. 2013;20(10):1563–8.
- Kubanov A, Runina A, Deryabin D. Novel *Treponema pallidum* Recombinant Antigens for Syphilis Diagnostics: Current Status and Future Prospects. *Biomed Res Int* [Internet]. 2017;2017:1–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28523273><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5421087><https://www.hindawi.com/journal/s/bmri/2017/1436080/>
- LaFond RE, Molini BJ, Van Voorhis WC, Lukehart SA. Antigenic Variation of TprK V Regions Abrogates Specific Antibody Binding in Syphilis. *Infect Immun* [Internet]. 2006 Nov 1;74(11):6244–51. Available from: <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.00827-06>
- McGill MA, Edmondson DG, Carroll JA, Cook RG, Orkiszewski RS, Norris SJ. Characterization and serologic analysis of the *Treponema pallidum* proteome. *Infect Immun*. 2010;78(6):2631–43.
- McKevitt M, Brinkman MB, McLoughlin M, Perez C, Howell JK, Weinstock GM, et al. Genome scale identification of *Treponema pallidum* antigens. *Infect Immun*. 2005;73(7):4445–50.
- Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico: Sífilis 2017. Ministério da Saúde [Internet]. 2017;48(36):41. Available from: <http://www.aids.gov.br/indicadores>,
- NCBI. PSORTb 3.0 [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=%3A+PSORTb+3.0%3A+improved+protein+subcellular+localization+prediction+with+refined+localization+subcategories+and+predictive+capabilities+for+all+prokaryotes>
- Newman L, Rowley J, Vander Hoorn S, Wijesooriya NS, Unemo M, Low N, et al. Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. Meng Z, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Dec 8;10(12):e0143304. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0143304>
- Osbak KK, Houston S, Lithgow K V., Meehan CJ, Strouhal M, Šmajš D, et al. Characterizing the Syphilis-Causing *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* Proteome Using Complementary Mass Spectrometry. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(9):1–29.
- Petersen TN, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* [Internet]. 2011;8(10):785–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1701>
- Ramos CRR, Abreu PAE, Nascimento ALTO, Ho PL. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-

- terminal his-tagged fusion peptide. *Brazilian J Med Biol Res.* 2004;37(8):1103–9.
- Shen H Bin, Chou KC. Gneg-mPLoc: A top-down strategy to enhance the quality of predicting subcellular localization of Gram-negative bacterial proteins. *J Theor Biol* [Internet]. 2010;264(2):326–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2010.01.018>
- Simionatto S, Marchioro SB, Galli V, Hartwig DD, Carlessi RM, Munari FM, et al. Cloning and purification of recombinant proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* [Internet]. 2010;69(2):132–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2009.09.001>
- Smajs D, Mckevitt M, Howell JK, Norris J, Cai W, Palzkill T, et al. Transcriptome of *Treponema pallidum*: Gene Expression Profile during Experimental Rabbit Infection Transcriptome of *Treponema pallidum*: Gene Expression Profile during Experimental Rabbit Infection †. *J Bacteriol.* 2005;187(5):1866–74.
- Smith BC, Simpson Y, Morshed MG, Cowen LLE, Hof R, Wetherell C, et al. New proteins for a new perspective on syphilis diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2013;51(1):105–11.
- Sun AH, Mao YF, Hu Y, Sun Q, Yan J. Sensitive and specific ELISA coated by TpN15-TpN17-TpN47 fusion protein for detection of antibodies to *Treponema pallidum*. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(3):321–6.
- Tan M, Xu M, Xiao Y, Xie Y, Jiang C, Zheng K, et al. Screening and identification of immunoactive FlaB protein fragments of *Treponema pallidum* for the serodiagnosis of syphilis. *Pathog Dis* [Internet]. 2018;76(2). Available from: <https://academic.oup.com/femspd/article/doi/10.1093/femspd/ftx122/4693838>
- Wilkins M, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez J, Williams K, Appel R, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol.* 1999;112(531):52.
- Workowski KA, Bolan GA. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2015. *Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2015 Aug;64(3):34–49. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00008480-200308000-00006>
- Xie Y, Xu M, Wang C, Xiao J, Xiao Y, Jiang C, et al. Diagnostic value of recombinant Tp0821 protein in serodiagnosis for syphilis. *Lett Appl Microbiol.* 2016;62(4):336–43.
- Xu M, Xie Y, Jiang C, Xiao Y, Kuang X, Zhao F, et al. A novel ELISA using a recombinant outer membrane protein, rTp0663, as the antigen for serological diagnosis of syphilis. *Int J Infect Dis.* 2016;43:51–7.
- Yu C-S, Lin C-J, Hwang J-K. Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Sci* [Internet]. 2004;13(5):1402–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2286765&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Yu NY, James R. Wagner, Matthew R. Laird, Gabor Melli, Sébastien Rey, Raymond Lo, Phuong Dao, S. Cenk Sahinalp, Martin Ester, Leonard J. Foster, Fiona S. L. Brinkman, PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes,

Bioinformatics, Volume 26, Issue 13, 1 July 2010, Pages 1608–1615,  
Zhang L, Deng M, Zhang X, Yin W, Liu W, Luo X, et al. Serological evaluation of  
antigen Tp0693 for diagnosis of syphilis. *Exp Ther Med*. 2017;14(5):4729–36.  
Zhou H, Skolnick J. Template-based protein structure modeling using TASSER(VMT.).  
*Proteins* [Internet]. 2012;80(2):352–61. Available from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3291807/pdf/nihms325345.pdf>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3291807&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

## 5. Conclusão geral

- ✓ Através de um estudo racional do proteoma do *T. pallidum* utilizando ferramentas de bioinformática foram selecionadas 3 proteínas envolvidas na patogênese da sífilis, a Tp0684, a Tp0750 e aTp0792;
- ✓ Foi possível realizar a clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes rTp0684, rTp750 e rTp792 de *T. pallidum* em *E. coli* como sistema heterólogo;
- ✓ Os antígenos recombinantes rTp0684, rTp0750 e rTp0792 demonstraram antigenicidade através da técnica de *Western blot* e ELISA com soros de pacientes com sífilis primária e latente;
- ✓ O antígeno recombinante rTp750 demonstrou ser um bom candidato para ser utilizado no diagnóstico sorológico da sífilis quando comparamos com os outros dois antígenos de *T. pallidum* avaliados contra um painel de soros testados neste estudo;
- ✓ É necessário avaliar os antígenos recombinantes com uma quantidade maior de amostras de soros, como também avaliar pacientes em outras fases da sífilis.

## 6. Referências

- ARORA, N. et al. Origin of modern syphilis and emergence of a pandemic *Treponema pallidum* cluster. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 16245, 5 jan. 2017.
- BEHRHOF, W. et al. PCR testing for *Treponema pallidum* in paraffin-embedded skin biopsy specimens: Test design and impact on the diagnosis of syphilis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 61, n. 3, p. 390–395, 2008.
- BRAUTIGAM, C. A. et al. The Tp0684 (MglB-2) lipoprotein of *Treponema pallidum*: A glucose-binding protein with divergent topology. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, 2016.
- BRAUTIGAM, C. A. et al. Crystal structures of MglB-2 (TP0684), a topologically variant D-glucose-binding protein from *Treponema pallidum*, reveal a ligand-induced conformational change. **Protein Science**, v. 27, n. 4, p. 880–885, abr. 2018.
- BRINKMAN, M. B. et al. Reactivity of antibodies from syphilis patients to a protein array representing the *Treponema pallidum* proteome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 888–891, 2006.
- BUFFET, M. et al. Diagnosing *Treponema pallidum* in secondary syphilis by PCR and immunohistochemistry. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 10, p. 2345–2350, 2007.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2015. **Centre of Disease Control and Prevention**, p. 1–156, 2015.
- CHEN, C. Y. et al. Diagnosis of gastric syphilis by direct immunofluorescence staining and real-time PCR testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3452–3456, 2006.
- FABRICIUS, T. et al. Osteitis in the dens of axis caused by *Treponema pallidum*. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 1, 2013.
- FRASER, C. M. et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. **Science**, v. 281, n. 5375, p. 375–388, 1998.
- GAO, K. et al. Origin of Nontreponemal Antibodies During *Treponema pallidum* Infection: Evidence From a Rabbit Model. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 218, n. 5, p. 835–843, 2018.
- GAYET-AGERON, A. et al. Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse biological samples. **Sexually Transmitted Infections**, v. 85, n. 4, p. 264–269, 2009.
- GAYET-AGERON, A. et al. Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis: A systematic review and meta-analysis. **Sexually Transmitted Infections**, v. 89, n. 3, p. 251–256, 2013.
- GAYET-AGERON, A. et al. Use of *Treponema pallidum* PCR in testing of ulcers for diagnosis of primary syphilis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 127–129, 2015.
- GIACANI, L. et al. Identification of the *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* TP0092 (RpoE) regulon and its implications for pathogen persistence in the host and syphilis pathogenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 4, p. 896–907, 2013.
- GIACANI, L.; LUKEHART, S. A. The endemic treponematoses. **Clinical Microbiology**

**Reviews**, v. 27, n. 1, p. 89–115, 2014.

GRANGE, P. A. et al. Evaluation of a PCR test for detection of *Treponema pallidum* in swabs and blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 546–552, 2012.

GUEDES, L. et al. First Paleogenetic Evidence of Probable Syphilis and Treponematoses Cases in the Brazilian Colonial Period. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–8, 10 out. 2018.

HEYMANS, R. et al. Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 497–502, 2010.

HO, EL., AND LUKEHART, S. Review series Syphilis : using modern approaches to understand an old disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 12, p. 4584–4592, 2011.

HOUSTON, S. et al. The multifunctional role of the pallilysin-associated *Treponema pallidum* protein, Tp0750, in promoting fibrinolysis and extracellular matrix component degradation. **Molecular microbiology**, v. 91, n. 3, p. 618–634, 2014.

HOUSTON, S. et al. Conservation of the host-interacting proteins Tp0750 and pallilysin among treponemes and restriction of proteolytic capacity to *Treponema pallidum*. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 11, p. 4204–4216, 2015.

HOUSTON, S. et al. Functional insights from proteome-wide structural modeling of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*, the causative agent of syphilis. **BMC Structural Biology**, v. 18, p. 1–18, 2018.

IZARD, J. et al. Cryo-electron tomography elucidates the molecular architecture of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 24, p. 7566–7580, 2009.

JIANG, C. et al. Evaluation of the recombinant protein TpF1 of *Treponema pallidum* for serodiagnosis of syphilis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 10, p. 1563–1568, 2013.

JIANG, C. et al. Evaluation of FlaB1, FlaB2, FlaB3, and Tp0463 of *Treponema pallidum* for serodiagnosis of syphilis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 84, n. 2, p. 105–111, 2016.

KAHAKURA, M. et al. Neurosyphilis and classical music : the great composers and “The Great Imitator ”. n. August, p. 791–794, 2018.

KELESIDIS, T. The cross-talk between spirochetal lipoproteins and immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. JUN, p. 85–88, 2014.

KUBANOV, A.; RUNINA, A.; DERYABIN, D. Novel *Treponema pallidum* Recombinant Antigens for Syphilis Diagnostics: Current Status and Future Prospects. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–12, 2017.

LAFOND, R. E.; LUKEHART, S. A. Biological Basis for Syphilis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 29–49, 1 jan. 2006.

LI, D. et al. Clinical Evaluation of Fully Automated Elecsys ® Syphilis Assay for the Detection of Antibodies of *Treponema pallidum*. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 30, n. 6, p. 1164–1168, nov. 2016.

LIN, L. R. et al. Development of a colloidal gold-immunochromatography assay to detect immunoglobulin G antibodies to *Treponema pallidum* with TPN17 and TPN47. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, n. 3, p. 193–200, 2010.

LIU, H. et al. New Tests for Syphilis : Rational Design of a PCR Method for Detection of *Treponema pallidum* in Clinical Specimens Using Unique Regions of the DNA Polymerase I Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1941–1946, 2001.

MARRA, C. M.; GHANEM, K. CDC Syphilis Summit. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 45, n. 9, p. 1, 2018.

MARTIN, I. E. et al. Macrolide Resistance and Molecular Types of *Treponema pallidum* Causing Primary Syphilis in Shanghai, China. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 4, p. 515–521, 2009.

MCGILL, M. A. et al. Characterization and serologic analysis of the *Treponema pallidum* proteome. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 6, p. 2631–2643, 2010.

MCKEVITT, M. et al. Genome scale identification of *Treponema pallidum* antigens. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 7, p. 4445–4450, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico: Sífilis 2017. **Ministério da Saúde**, v. 48, n. 36, p. 41, 2017.

MORSHED, M. G.; SINGHB, A. E. Recent trends in the serologic diagnosis of syphilis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 2, p. 137–143, 2015.

NANDWANI, R.; EVANS, D. T. P. Are You Sure It's Syphilis? A Review of False Positive Serology. **International Journal of STD & AIDS**, v. 6, n. 4, p. 241–248, 25 jul. 1995.

NEWMAN, L. et al. Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0143304, 8 dez. 2015.

NORRIS, S. J. Polypeptides of *Treponema pallidum*: progress toward understanding their structural, functional, and immunologic roles. *Treponema pallidum* Polypeptide Research Group. **Microbiological reviews**, v. 57, n. 3, p. 750–79, 1993.

OSBAK, K. K. et al. Characterizing the Syphilis-Causing *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* Proteome Using Complementary Mass Spectrometry. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 9, p. 1–29, 2016.

PALLESEN, L.; HINDERSSON, P. Cloning and sequencing of a *Treponema pallidum* gene encoding a 31.3-kilodalton endoflagellar subunit (FlaB2). **Infection and Immunity**, v. 57, n. 7, p. 2166–2172, 1989.

PARK, I. U. et al. Performance of treponemal tests for the diagnosis of syphilis. **Clinical Infectious Diseases**, n. July 2018, 2018.

PARK, Y. et al. Evaluation of a fully automated treponemal test and comparison with conventional VDRL and FTA-ABS tests. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 136, n. 5, p. 705–710, 2011.

PASTER, B.; DEWHIRST, F. Phylogenetic foundation of spirochetes. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, n. 2, p. 341–344, 2000.

PEELING, R. W. et al. Primer: Syphilis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 2017.

PĚTROŠOVÁ, H. et al. Resequencing of *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* Strains Nichols and SS14: Correction of Sequencing Errors Resulted in Increased Separation of Syphilis Treponeme Subclusters. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–8, 2013.

PILLAY, A. CDC Syphilis Summit - Diagnostics and Laboratory Issues. **Sexually transmitted diseases**, p. 1, 2018.

RADOLF, J. D. et al. *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete: Making a living as a stealth pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 12, p. 744–759, 2016.

SANTOS, A. L.; GARDNER, M. T.; ALLSWORTH-JONES, P. Treponematoses in Pre-Columbian Jamaica: A biocultural approach to the human cranium found in Bull Savannah. **Journal of Archaeological Science**, v. 40, n. 1, p. 490–496, 2013.

SCHUENEMANN, V. J. et al. Historic *Treponema pallidum* genomes from Colonial Mexico retrieved from archaeological remains. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, p. 1–20, 2018.

SEÑA, A. C.; WHITE, B. L.; SPARLING, P. F. Novel *Treponema pallidum* Serologic Tests: A Paradigm Shift in Syphilis Screening for the 21st Century. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 6, p. 700–708, 2010.

SHIELDS, M. et al. A longitudinal evaluation of *Treponema pallidum* PCR testing in early syphilis. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 353, 2012.

SMAJS, D. et al. Transcriptome of *Treponema pallidum* : Gene Expression Profile during Experimental Rabbit Infection Transcriptome of *Treponema pallidum* : Gene Expression Profile during Experimental Rabbit Infection †. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 5, p. 1866–1874, 2005.

SMITH, B. C. et al. New proteins for a new perspective on syphilis diagnosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 105–111, 2013.

SUN, A. H. et al. Sensitive and specific ELISA coated by TpN15-TpN17-TpN47 fusion protein for detection of antibodies to *Treponema pallidum*. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 47, n. 3, p. 321–326, 2009.

TIPPLE, C. et al. Rapid *Treponema pallidum* Clearance from Blood and Ulcer Samples following Single Dose Benzathine Penicillin Treatment of Early Syphilis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. 1–10, 2015.

TIPPLE, C.; TAYLOR, G. P. Syphilis testing, typing, and treatment follow-up: A new era for an old disease. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 28, n. 1, p. 53–60, 2015.

TONG, M. et al. Whole genome sequence of the *Treponema pallidum* subsp . *pallidum* strain Amoy : An Asian isolate highly similar to SS14. p. 1–10, 2017.

TROUTBECK, R.; CHHABRA, R.; JONES, N. P. Polymerase chain reaction testing of vitreous in atypical ocular syphilis. **Ocular Immunology and Inflammation**, v. 21, n. 3, p. 227–230, 2013.

VAN VOORHIS, W. C. et al. Serodiagnosis of syphilis: Antibodies to recombinant Tp0453, Tp92, and Gpd proteins are sensitive and specific indicators of infection by *Treponema pallidum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3668–3674, 2003.

XIE, Y. et al. Diagnostic value of recombinant Tp0821 protein in serodiagnosis for syphilis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 336–343, 2016.

XU, M. et al. A novel ELISA using a recombinant outer membrane protein, rTp0663, as the antigen for serological diagnosis of syphilis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 43, p. 51–57, 2016.

ZOBANÍKOVÁ, M. et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum* strain DAL-1. p. 12–21, 2012.

## **7. Anexos**

### **Anexo I – Norma da revista**

#### **Revista 1:**

**Título:** International Journal of Infectious Diseases

**Qualis/Biodiversidade:** -

**Escopo:** A revista International Journal of Infectious Diseases (IJID) é publicada mensalmente pela Sociedade Internacional para Doenças Infecciosas. A IJID é uma revista de acesso aberto revisada por pares e publica pesquisa clínica e laboratorial original, juntamente com relatos de ensaios clínicos, revisões e alguns relatos de casos relacionados à epidemiologia, diagnóstico clínico, tratamento e controle de doenças infecciosas.

**Link para acesso às normas de publicação:**

<https://www.elsevier.com/journals/international-journal-of-infectious-diseases/1201-9712/guide-for-authors>

## **Anexo II – Outras atividades desenvolvidas (Artigo completo)**

### **Revista 2:**

**Título:** Journal of Biosciences.

**Qualis/Biodiversidade:** B1.

**Escopo:** O Journal of Biosciences é um jornal trimestral publicado pela Academia Indiana de Ciências, Bangalore. Abrange todas as áreas da Biologia e é a principal revista do país no seu âmbito. Ele é indexado em Current Contents e em outros bancos de dados padrão de Biologia e Medicina.

### **Link para acesso às normas de publicação:**

[http://www.springer.com/cda/content/document/cda\\_downloaddocument/JB-instruction+for+authors.pdf?SGWID=0-0-45-412498-p173709705](http://www.springer.com/cda/content/document/cda_downloaddocument/JB-instruction+for+authors.pdf?SGWID=0-0-45-412498-p173709705)

## **Comparison of PCR with serological techniques for *T. pallidum* detection**

**Running Title:** Comparison of PCR with serological tests.

**Júlio Henrique Ferreira de Sá Queiroz<sup>1,3</sup>, Maisa Estopa Correa<sup>2,3</sup>, Silvana Beutinger Marchioro<sup>2,3</sup>, Simone Simionatto<sup>1,2,3\*</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral/Bioprospecção, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados MS, Brasil; <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados MS, Brasil; <sup>3</sup>Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados MS, Brasil.

\*Corresponding author: Simone Simionatto. Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde/Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados - Itahum, km 12, Cidade Universitária, CEP: 79804970, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil. Phone: 55 (67) 3410-2225; Fax: 55 (67) 3410-225623  
E-mail: [simonesimionatto@ufgd.edu.br](mailto:simonesimionatto@ufgd.edu.br)

## ABSTRACT

**Background:** Syphilis diagnosis is based on clinical data and serological analysis. Due to the low degree of sensitivity and specificity of the available serological tests, new strategies need to be developed. The aim of this study was to use the Polymerase Chain Reaction (PCR) and serological techniques for *Treponema pallidum* detection. **Methods:** Human blood samples were submitted to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). ELISA-reactive samples were serially diluted by Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) test. For the PCR, *T. pallidum* DNA was extracted from whole blood and *polA* gene was amplified. The specificity of the primers was evaluated for various pathogens. **Findings:** A total of 353 blood samples reactive in ELISA were evaluated in PCR and the DNA of *T. pallidum* was amplified in 92.63% (327/353) of these. The PCR were positive in 181 latent syphilis patients. But then, 26 positive samples in ELISA were negative by PCR targeting the *polA*. The primers showed 100% specificity for the micro-organism evaluated. **Main conclusions:** These results indicate that PCR has the potential to be used as a diagnostic method for *T. pallidum* detection, especially useful in patients with latent syphilis. May be used to complementing serologic methods to enhance the diagnosis of syphilis.

**Keywords:** Syphilis; VDRL; gene *polA*; molecular diagnosis.

## Introduction

Syphilis is an infectious disease caused by the *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*, being sexually transmitted, direct contact with an infected lesion or by vertical transmission during pregnancy<sup>(1)</sup>. Since the early 2000s, the incidence of syphilis has increased worldwide, with an estimated 6 million new cases per year worldwide<sup>(2)</sup>. According to the Ministry of Health, there was a steady increase in the number of syphilis cases in Brazil between 2010 and 2017. In 2017, 119.800 cases of acquired syphilis were reported, 49.013 cases of syphilis in pregnant women and 24.666 cases of congenital syphilis, with 206 deaths of newborns<sup>(3)</sup>.

Based on clinical data, syphilis is divided into three infections stages (primary, secondary and early latent) and two non-infectious stage (late latent and tertiary). This data contributes to the orientation of the treatment and follow-up of this infection<sup>(4)</sup>. Its diagnosis remains a challenge, due to the difficult to in vitro culture of *T. pallidum*, which leads the search for alternative methods for its diagnosis<sup>(5)</sup>.

The dark field microscopy (DFM) is a specific method for direct detection of *T. pallidum* when lesions are present in the patient, but requires a trained laboratory team<sup>(6)</sup>. In the absence of lesions, serological tests are used for the indirect detection of *T. pallidum*. Treponemal tests detect antibodies specific for *T. pallidum* proteins, whereas nontreponemal tests detect antibodies against the lipid antigen. The sensitivity and specificity of both tests varies with the type of technique used, as well as the stage of syphilis<sup>(5)</sup>. The use of only one type of serological test for diagnosis is not recommended, due to may result in false-negative cases in the primary syphilis, where serological tests have low sensitivity, approximately 75% in nontreponemal tests<sup>(4)</sup>.

Polymerase Chain Reaction (PCR) technique for molecular identification of *T. pallidum* can be used as a reference test in the primary and secondary stages of syphilis.

Therefore, it is more precise than DFM, it requires less expertise and still has better reproducibility to be used in routine diagnosis<sup>(7)</sup>. Among the strategies used to detect *T. pallidum* DNA, several studies have used the amplification of *T. pallidum* genes, such as *bmp*, *tpp47* and the *polA*<sup>(6,8)</sup>. The PCR has been used to detect the treponemal DNA in several samples, such as whole blood, serum, plasma, cerebrospinal fluid, lesion exudate, fixed tissues, gastric lesions, urine and intraocular fluid<sup>(9-14)</sup>.

In addition, this molecular tool has the potential to provide an early and reliable diagnosis in the infectious stage of syphilis, especially in places where it is not possible to perform DFM. Early detection helps to prevent the transmission of this agent and, consequently, contributes to the reduction in the number of cases of this infection<sup>(15,16)</sup>. Therefore, the aim of this study was to compare the PCR technique with serological techniques for *T. pallidum* detection.

## **Materials and Methods**

### **Biological samples and serology testing**

In this study we evaluated blood samples from patients with no signs or symptoms of syphilis and reactive for a treponemal test - enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of anti-*Treponema pallidum* IgM and IgG antibodies (ICE Syphilis, DiaSorin, UK). A serial dilution for the titration of Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) (Mures, UK) was performed in the ELISA reactive samples<sup>(17)</sup>.

### **Construction of the synthetic gene**

For PCR positive control, the gene *polA* cloned into the pUC57-Amp vector (Genewiz, NJ, USA) was synthesized and named pUC57/*polA*. After propagation, in *E.*

*coli* TOP10 (Invitrogen, USA), the plasmid DNA was purified by the GenElute Plasmid Miniprep kit (Sigma, USA).

### **DNA extraction**

The *T. pallidum* genomic DNA was extracted from 200 µL whole blood with the QIAamp DNA Blood Mini kit (Quiagen, USA) following the manufacturer's recommendations. Subsequently, the samples were quantified by the BioDrop µLITE equipment (BioDrop, UK) and the integrity of the samples analyzed by electrophoretic on agarose gel 1% stained with GelRed 100X (Uniscience, USA). The DNA samples were stored at -20 °C.

### **PCR detection of *T. pallidum***

The PCR assay for the detection of *T. pallidum* DNA was based on amplification of the *polA* gene using primers as described<sup>(18)</sup>. The PCR reaction for the *polA* gene was performed to a final 25 µL volume containing approximately 50 ng genomic DNA, 1x PCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.5, 50 mM KCl), 0.2 mM each dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6 µM of each primer (Forward -5' AGACGGCTGCACATCTTCTCCA 3'; Reverse – 5' AGCAGACGTTACATCGAGCG GA 3'), 1.5 units of Taq DNA Polymerase (Sigma, USA). The reaction was subjected to amplification in T100 (Bio-Rad, USA) thermocycler with the following cycling conditions: denaturation at 94 °C for 5 min; 40 cycles: 94 °C for 1 min, 58 °C for 1 min, 72 °C for 1 min; followed by the final extension at 72 °C for 5 min. For positive and negative control assays, pUC57/*polA* and ultrapure water were used, respectively. Also, to assess the integrity and sufficiency of DNA of each sample for amplification, two primers that amplify the β-globin gene (268 base pairs) <sup>(19)</sup> and represent the internal control of the reaction, were used.

## PCR specificity test

The specificity of the primers was evaluated using DNA extracted from 18 pathogenic microorganisms, one yeast, 3 viruses and 13 bacteria, two of which were spirochetes, such as *Borrelia burgdorferi* and *Leptospiras interrogans* (**Table I**).

**Table 1.** Microorganisms used in the specificity test for PCR.

| Microorganisms                     | Type                   | Provenance                 |
|------------------------------------|------------------------|----------------------------|
| <i>Leptospiras interrogans</i>     | Spirochete bacteria    | (CDTec/UFPel) <sup>a</sup> |
| <i>Borrelia burgdorferi</i>        | Spirochete bacteria    |                            |
| <i>Neisseria meningitidis</i>      | Gram-negative bacteria | (LACEN/MS) <sup>b</sup>    |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>       | Gram-negative bacteria |                            |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>     | Gram-negative bacteria | (LPCS/UFGD) <sup>c</sup>   |
| <i>Serratia marcescens</i>         | Gram-negative bacteria |                            |
| <i>Escherichia coli</i>            | Gram-negative bacteria |                            |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i>  | Gram-positive bacteria |                            |
| <i>Streptococcus pyogenes</i>      | Gram-positive bacteria |                            |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>    | Gram-positive bacteria |                            |
| <i>Streptococcus mitis</i>         | Gram-positive bacteria | (LACEN/MS) <sup>b</sup>    |
| <i>Streptococcus parasanguinis</i> | Gram-positive bacteria |                            |
| <i>Streptococcus oralis</i>        | Gram-positive bacteria |                            |
| <i>Cryptococcus neoformans</i>     | Yeast                  |                            |
| Human papillomavirus (HPV)         | Virus                  | (LPCS/UFGD) <sup>c</sup>   |
| Human Immunodeficiency Virus (HIV) | Virus                  | (LAC/UFMS) <sup>d</sup>    |
| Hepatitis B Virus                  | Virus                  |                            |

<sup>a</sup>(CDTec/UFPel) - Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas; <sup>b</sup>(LPCS/UFGD) - Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados; <sup>c</sup>(LACEN/MS) - Laboratório Central de Saúde Pública do Mato Grosso do Sul; <sup>d</sup>(LAC/UFMS) - Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

## Ethics

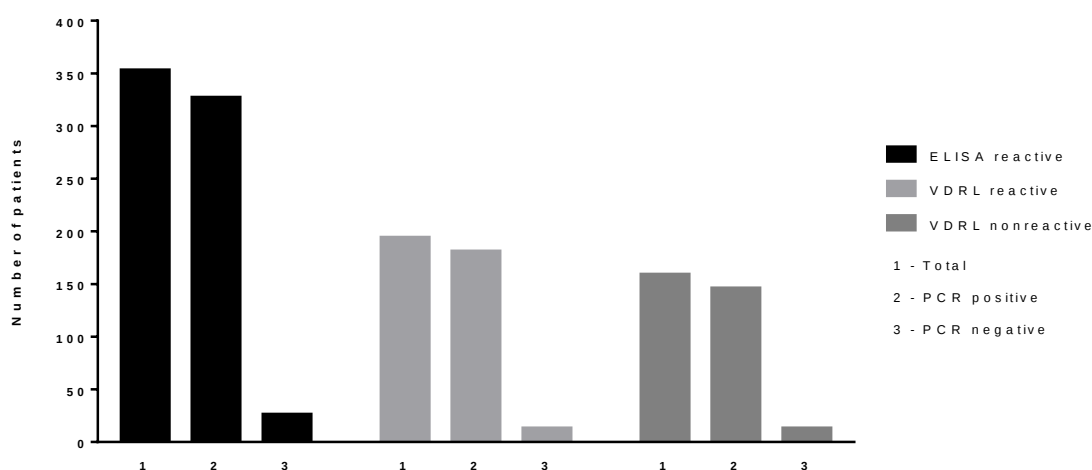
This study was approved by the research ethics committee at the Universidade Federal da Grande Dourados (no. 191.877).

## Results

In this study we evaluated blood samples of 353 patients that were reactive in ELISA. The reactive samples in the ELISA were submitted to VDRL and PCR. In the VDRL, 194 (55%) were reactive with titration from 1/2 to 1/2048 and these patients were classified as latent syphilis (no signs or symptoms of syphilis and reactive ELISA confirmed by reactive VDRL)<sup>(20)</sup> (**Table II**). In the PCR assay, 327 (92.63%) samples were positive. Out of these, 181 reactive in VDRL were PCR positive (**Figure 1**). The 26 samples negative in PCR for *polA* gene were positive for the amplification of the human  $\beta$ -globin gene, which demonstrates the absence of PCR inhibitors in the samples analyzed. Also, the samples contained undegraded human DNA and undetectable amounts of *T. pallidum* DNA. The primers used in PCR did not amplify genetic material from any of the microorganisms listed in table 1 and were then considered to be 100% specificity.

**Table 2.** Results of samples positive in VDRL and PCR.

|              |              | PCR results |          |       |
|--------------|--------------|-------------|----------|-------|
|              |              | Positive    | Negative | Total |
| VDRL results | 1/2          | 47          | 3        | 50    |
|              | 1/4          | 42          | 0        | 42    |
|              | 1/8          | 30          | 4        | 34    |
|              | 1/16         | 14          | 3        | 17    |
|              | 1/32         | 8           | 1        | 9     |
|              | 1/64         | 20          | 0        | 20    |
|              | 1/128        | 9           | 1        | 10    |
|              | 1/256        | 3           | 1        | 4     |
|              | 1/512        | 2           | 0        | 2     |
|              | 1/1024       | 1           | 0        | 1     |
|              | 1/2048       | 5           | 0        | 5     |
|              | Non-reactive | 146         | 13       | 159   |
|              | Total        | 327         | 26       | 353   |



**Figure 1.** Results obtained with 353 samples assessed by ELISA, VDRL and PCR.

## Discussion

Syphilis is considered a serious problem of public health worldwide. The diagnosis of this disease is difficult, especially when there are no visible clinical manifestations. Thus, accurate diagnosis is essential for the immediate onset of treatment in the early or latent stages of this infection. Without treatment the syphilis can progress and lead to irreversible neurological or cardiovascular complications.

In this study, PCR was compared with serological techniques for *T. pallidum* detection and 93.3% (181/194) of samples from patients with latent syphilis were positive in PCR. Some studies showed the *T. pallidum* detection using PCR, with 61% (8/13)<sup>(21)</sup>, 27.5% (19/69)<sup>(22)</sup> and 6.2% (5/81)<sup>(23)</sup> of rate detection in blood samples from patients with latent syphilis. However, ours results showed that PCR was more sensitive that previous reports<sup>(21-23)</sup>. In latent syphilis, the number of *T. pallidum* cells/mL of blood is low when compared with secondary syphilis, where it is associated with the greater spread of this bacterium. This may explain the variations in PCR detection described, further the reasons for these discrepancies may be related to specimen type, DNA purity, and other factors.

Despite some disadvantages of using whole blood, such as the presence of PCR inhibitors and the low *T. pallidum* load, our results demonstrated the capacity of PCR to detect the presence of the pathogen in asymptomatic patients with persistent infection.

In our study, *T. pallidum* DNA was detected in 146 patients with reactive ELISA and nonreactive in VDRL. Thus, these patients may be old untreated syphilis or early syphilis and PCR can be used like as a confirmatory treponemal test, since then a treponemal tests may be reactive prior to nontreponemal tests<sup>(24)</sup>. On the other hand, the 13 samples positive in ELISA, nonreactive in the VDRL e negative in PCR, may represent treated syphilis and the serological test detected immunological memory IgG. Some individuals with reactive treponemal tests will present reactive results for all, regardless of treatment or infection activity, which demonstrates the false-positive ELISA result<sup>(5)</sup>. Regarding 6.7% (13) negative samples in the PCR and reactive in the VDRL and ELISA, these patients may have been medicated and the DNA of *T. pallidum* is no longer in the bloodstream, as showed in previous study that after 56 hours of benzathine penicillin treatment, the DNA *T. pallidum* is not detected in blood samples by real-time PCR. In addition, all negative PCR samples were tested for the  $\beta$ -globin gene, demonstrating that in these clinical samples there were no PCR inhibitors. Further, the primers used in our study showed more specific that reported by Liu et al., (2001)<sup>(25)</sup>, and not amplified DNA for several microorganisms evaluated as like *Leptospira interrogans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus parasanguis* and *Borrelia burgdorferi*. The *polA* gene of *T. pallidum* has 24 amino acid cysteine. This is an important characteristic that differs to *T. pallidum* DNA polymerase I from other species<sup>(25)</sup>.

The results obtained in our study were consistent with the serological diagnosis of syphilis with a treponemal test, indicating that the PCR technique can be a useful,

sensitive and low-cost tool as a screening method for patients with active and latent infection. In addition, the PCR targeting the *polA* gene can be more sensibility and specificity than serological test. However, new studies are needed to determine the number of copies of the *T. pallidum* genome that PCR is able to detect in clinical sample, aiming the implementation of this assay for syphilis diagnostic.

### **Acknowledgements**

This work was partially supported by the Foundation for Support to the Development of Education, Science and Technology in the State of Mato Grosso do Sul (FUNDECT grant 092/2015 and 041/2017). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

### **Authors' contributions**

Study conception and design: JHFSQ, MEC, SBM and SS. Acquisition of data: JHFSQ and MEC. Analysis and interpretation of data: JHFSQ, MEC, SBM and SS. Wrote and/or revised the manuscript: JHFSQ, SBM and SS. All authors read and approved the final manuscript.

## References

1. Behrhof W, Springer E, Bräuninger W, Kirkpatrick CJ, Weber A. PCR testing for *Treponema pallidum* in paraffin-embedded skin biopsy specimens: Test design and impact on the diagnosis of syphilis. *J Clin Pathol*. 2008;61(3):390–5.
2. Brasil M da S. Boletim Epidemiológico: Sífilis 2018. 2018;49(45):1–43.
3. Buffet M, Grange PA, Gerhardt P, Carlotti A, Calvez V, Bianchi A, et al. Diagnosing *Treponema pallidum* in secondary syphilis by PCR and immunohistochemistry. *J Invest Dermatol*. 2007;127(10):2345–50.
4. Casal CAD, Silva MO da, Costa IB, Araújo E da C, Corvelo TC de O. Molecular detection of *Treponema pallidum* sp. *pallidum* in blood samples of VDRL-seroreactive women with lethal pregnancy outcomes: a retrospective observational study in northern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2011;44(4):451–6. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822011000400010&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822011000400010&lng=en&tlng=en).
5. Castro R, Prieto E, Águas MJ, Manata MJ, Botas J, Santo I, et al. Detection of *Treponema pallidum* sp *pallidum* DNA in latent syphilis. *Int J STD AIDS*. 2007;18(12):842–5.
6. Centers for Disease Control. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2015. *Cent Dis Control Prev* [Internet]. 2015;1–156. Available from: <https://www.cdc.gov/std/stats15/std-surveillance-2015-print.pdf>.
7. Chen CY, Chi KH, George RW, Cox DL, Srivastava A, Rui Silva M, et al. Diagnosis of gastric syphilis by direct immunofluorescence staining and real-time PCR testing. *J Clin Microbiol*. 2006;44(9):3452–6.

8. Correa ME, Croda J, De Castro ARCM, Do Valle Leone De Oliveira SM, Pompilio MA, De Souza RO, et al. High prevalence of *Treponema pallidum* infection in Brazilian prisoners. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;97(4):1078–84.
9. Gayet-Ageron A, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger T V., Combescure C. Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis: A systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect*. 2013;89(3):251–6.
10. Gayet-Ageron A, Ninet B, Toutous-Trellu L, Lautenschlager S, Furrer H, Piguet V, et al. Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse biological samples. *Sex Transm Infect*. 2009;85(4):264–9.
11. Gayet-Ageron A, Sednaoui P, Lautenschlager S, Ferry T, Toutous-Trellu L, Cavassini M, et al. Use of *Treponema pallidum* PCR in testing of ulcers for diagnosis of primary syphilis. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(1):127–9.
12. Grange PA, Gressier L, Dion PL, Farhi D, Benhaddou N, Gerhardt P, et al. Evaluation of a PCR test for detection of *Treponema pallidum* in swabs and blood. *J Clin Microbiol*. 2012;50(3):546–52.
13. 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.
14. Jiang C, Xiao J, Xie Y, Xiao Y, Wang C, Kuang X, et al. Evaluation of FlaB1, FlaB2, FlaB3, and Tp0463 of *Treponema pallidum* for serodiagnosis of syphilis. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2016;84(2):105–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.10.005>
15. LaFond RE, Lukehart SA. Biological Basis for Syphilis. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2006 Jan 1;19(1):29–49. Available from: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.19.1.29-49.2006>.

16. Liu H, Rodes B, Chen C, Steiner B. New Tests for Syphilis: Rational Design of a PCR Method for Detection of *Treponema pallidum* in Clinical Specimens Using Unique Regions of the DNA Polymerase I Gene. J Clin Microbiol. 2001;39(5):1941–6.
17. 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):163–6.
18. Marra CM, Ghanem K. CDC Syphilis Summit. Sex Transm Dis [Internet]. 2018;45(9):1. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00007435-9000000000-98248>.
19. Martin IE, Gu W, Yang Y, Tsang RSW. Macrolide Resistance and Molecular Types of *Treponema pallidum* causing Primary Syphilis in Shanghai, China. Clin Infect Dis [Internet]. 2009;49(4):515–21. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/600878>.
20. Morshed MG, Singhb AE. Recent trends in the serologic diagnosis of syphilis. Clin Vaccine Immunol. 2015;22(2):137–43.
21. Newman L, Rowley J, Vander Hoorn S, Wijesooriya NS, Unemo M, Low N, et al. Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. Meng Z, editor. PLoS One [Internet]. 2015 Dec 8;10(12):e0143304. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0143304>.
22. Shields M, Guy RJ, Jeoffreys NJ, Finlayson RJ, Donovan B. A longitudinal evaluation of *Treponema pallidum* PCR testing in early syphilis. BMC Infect Dis [Internet]. 2012;12(1):353. Available from: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-12-353>.

23. Tristão W, Ribeiro RMP, Oliveira CA de, Betiol JC, Bettini J de SR. Epidemiological study of HPV in oral mucosa through PCR. *Braz J Otorhinolaryngol* [Internet]. 2011 Apr;78(4):66–70. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1808-86942012000400013](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-86942012000400013).
24. Troutbeck R, Chhabra R, Jones NP. Polymerase chain reaction testing of vitreous in atypical ocular syphilis. *Ocul Immunol Inflamm*. 2013;21(3):227–30.
25. 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* [Internet]. 2018;7(1):83. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41426-018-0085-2>.



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Estudo multicêntrico da prevalência de tuberculose e doenças sexualmente transmissíveis na população privada de liberdade e profissionais do sistema prisional do Estado do Mato Grosso do Sul

**Pesquisador:** JULIO HENRIQUE ROSA CRODA

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 05598912.0.0000.5160

**Instituição Proponente:** Fundação Universidade Federal da Grande Dourados/UFMS

**Patrocinador Principal:** FUND. DE APOIO E DE DESENV. DO ENSINO, CIENCIA E TECN. DO ESTADO DO MS (FUNDECT)

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 191.877

**Data da Relatoria:** 26/01/2013

**Apresentação do Projeto:**

Adequada, com grande parte das modificações sugeridas pelo último parecer do colegiado.

**Objetivo da Pesquisa:**

Adequado.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

TCLE ainda minimiza riscos:

"A sua participação poderá acarretar pequenos riscos a sua saúde, como danos psicológicos, pequenos hematomas após a coleta de sangue ou aplicação da prova tuberculínica." Sugere-se a exclusão do termo "pequenos"

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Adequada.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O termo de compromisso da AGEPEM está conforme o exigido.

TCLE Ainda minimiza riscos. (Citado no item AVALIAÇÃO DOS RISCOS E BENEFÍCIOS)

Possível problema de redação do TCLE: "Você não perderá qualquer benefício ao qual você tem direito. Se você desistir do estudo, isso não implicará na continuidade do seu tratamento. Você não será proibido de participar de novos estudos. Você poderá ser solicitado a sair do estudo"

**Endereço:** Rua João Rosa Góes, 1761

**Bairro:** Vila Progresso

**CEP:** 79.825-070

**UF:** MS

**Município:** DOURADOS

**Telefone:** (67)3410-2328

**Fax:** (67)3411-3637

**E-mail:** cep@ufgd.edu.br