

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS REAÇÕES DE FLOCULAÇÃO, FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO, IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E MICRO-HEMAGLUTINAÇÃO PASSIVA PARA SÍFILIS *

Augusta Kiyomi TAKEDA **
Paulo Mutuko NAKAMURA **
Sônia França Correia BARBOSA **

RIALAG/484

TAKEDA, A. K.; NAKAMURA, P. M. & BARBOSA, S. F. C. — Estudo comparativo entre as reações de floculação, fixação de complemento, imunofluorescência indireta e micro-hemaglutinação passiva para sífilis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39(2):137-144, 1979.

RESUMO: A possibilidade do emprego da reação de micro-hemaglutinação passiva, para a pesquisa de anticorpos para *Treponema pallidum*, foi examinada. A reação de micro-hemaglutinação passiva foi comparada com as reações de floculação, fixação de complemento e imunofluorescência indireta, em 344 soros distribuídos nos seguintes grupos: doadores de banco de sangue, indivíduos com suspeita clínica de sífilis, pacientes com diagnóstico clínico de sífilis, pacientes clinicamente curados e pacientes com outras doenças capazes de ocasionar reações falso-positivas. Em soros de doadores de banco de sangue foi verificada concordância de 100% entre as reações de imunofluorescência indireta e hemaglutinação passiva para sífilis, não se verificando o mesmo com as demais reações. No grupo dos doentes clinicamente diagnosticados, houve concordância total entre as quatro reações.

DESCRITORES: sífilis, métodos de sorodiagnóstico; *Treponema pallidum*.

INTRODUÇÃO

A reação de micro-hemaglutinação passiva para pesquisa de anticorpo para *Treponema pallidum* é baseada no princípio de BOYDEN¹; foi descrita por RATHLEV^{14, 15} e desenvolvida por TOMIZAWA & KASAMATSU¹⁶, que padronizaram o antígeno e o uso do absorvente para remover reações inespecíficas ou cruzadas. Em soros de indivíduos normais^{5, 7, 9, 10, 18}, sem sinais clínicos e sorológicos de infecção para sífilis, a reação de micro-hemaglutinação passiva para *Treponema pallidum* (MHPTP) foi sempre negativa. Para a sífilis primária^{2, 3, 17} não tratada, tem sido notada menor sensibilidade da MHPTP em relação à reação de anticorpos treponêmicos fluorescentes, procedimento de absorção com soro (ATF-ABS). A existência de resultados falso-positivos^{4, 5, 6, 8},

que ocorrem entre soros dotados de alta concentração de anticorpos heterófilos, não excede a 2,2% segundo JOHNSTON⁵. Por outro lado, a existência de resultados falso-positivos, assim como de falso-negativos para com o antígeno de cardiolipina leva à necessidade de um teste confirmatório, em que seja utilizado antígeno treponêmico específico.

Com o objetivo de introduzir uma técnica ainda não utilizada em nosso meio, qual seja, a reação de micro-hemaglutinação passiva para sífilis que, do ponto de vista técnico parece ser mais simples que a reação de imunofluorescência indireta, e não necessita de equipamento especializado, comparamos as reações de floculação VDRL, fixação de complemento (FC) e imunofluorescência indireta (ATF-ABS), em uso no Instituto Adolfo Lutz, com a reação de MHPTP.

* Realizado na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

- 78 soros de doadores de banco de sangue do IAMSPE*, supostamente sãos;
- 91 soros de indivíduos com suspeita clínica de sífilis, provenientes de clínica dermatológica do IAMSPE;
- 27 soros de pacientes com diagnóstico clínico de sífilis, provenientes da Liga de Combate à Sífilis, do CAOC**;
- 4 soros de pacientes clinicamente curados, provenientes da Liga de Combate à Sífilis do CAOC;
- 144 soros provenientes de pacientes portadores de condições patológicas capazes de ocasionar reações falso-positivas (73 soros de pacientes com lepra lepromatosa; 32, de pacientes com mononucleose infecciosa; 11, de pacientes com sarampo e 28, de pacientes com doenças do colágeno).

Reações sorológicas realizadas

*Reação de floculação em lâmina (VDRL)*¹², utilizando o antígeno de cardioplipina para floculação***.

Reação de fixação de complemento, segundo a técnica de Kolmer¹³, a 1/5 de volume, utilizando o antígeno de cardioplipina****.

Reação de fixação de complemento, segundo a técnica de Maltaner¹⁴.

*Reação de imunofluorescência indireta*¹⁵, utilizando o antígeno de *T. pallidum******.

*Reação de hemaglutinação passiva (MHPTP)*¹⁶, utilizando a reagente Serratex*****, que consta de hemácias de carneiro sensibilizadas com antígeno de *Treponema pallidum* (cepa Nichols) liofilizadas, absorvente antígeno solúvel extraído de hemácias bovinas de testículo de coelho, componente celular do treponema de Reiter e soro normal de coelho.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta os resultados das reações de VDRL, FC, ATF-ABS e MHPTP, nos diferentes grupos analisados. De acordo com esta tabela, no grupo de doadores do banco de sangue houve concordância total entre ATF-ABS e MHPTP, pois todas as reações

foram negativas. Neste grupo, a VDRL e a FC apresentaram apreciável número de resultados falso-positivos, sendo em maior número com a VDRL (15 casos) do que com a FC (11 casos).

Nos casos clinicamente confirmados, a concordância foi total entre as quatro reações, enquanto que nos indivíduos clinicamente curados o mesmo não foi verificado. Devido ao pequeno número de casos analisados neste último grupo, não cabe uma análise comparativa.

Em 91 casos de suspeita clínica, não houve concordância entre as quatro reações. No entanto, o que se observou foi que na VDRL o número de casos positivos foi maior do que nas outras reações.

No grupo de soros provenientes de pacientes portadores de condições patológicas capazes de ocasionar resultados falso-positivos, observou-se que, nos soros com lepra lepromatosa, 2 foram positivos em todas as reações, podendo-se concluir que, provavelmente, estes soros pertenciam a indivíduos leprosos sífilíticos, enquanto que 4 apresentaram reações inespecíficas devidas, talvez, a altas concentrações de anticorpos heterófilos presentes nestes soros. No grupo da mononucleose infecciosa, apenas 2 de 32 soros analisados foram positivos somente na reação de FC. Já no grupo de sarampo, houve concordância nas 4 reações, não se verificando nenhuma reação positiva. No grupo da doença do colágeno, constatou-se que 2 soros apresentaram reações inespecíficas, uma vez que foram positivos na VDRL e FC e negativos nas reações MHPTP e ATF-ABS.

A tabela 2 mostra a percentagem de concordância entre as 4 reações. Nos 344 soros analisados houve concordância de 89,2%. Entre os soros discordantes, 3,2 foram positivos somente para VDRL, provavelmente por serem de indivíduos que apresentavam anticorpos falso-positivos, devido a certas condições, tais como: período pós-vacinação, gestação, vício em drogas e outras condições patológicas. Ainda, entre os resultados discordantes, 3,8% apresentavam reação negativa, quando o antígeno era de origem treponêmica e positiva, quando o antígeno era de origem não-treponêmica, ou seja, cardioplipina; 1,1% apresentaram reações VDRL, FC e MHPTP positivas, sendo negativa a reação ATF-ABS; em 0,9%, a reação foi negativa somente para ATF-ABS e FC e, portanto, uma provável explicação para a positividade da reação de MHPTP seria por não haver remoção total

* Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual, São Paulo, SP.

** Centro Acadêmico Oswaldo Cruz, USP, São Paulo, SP.

*** Sylvania Company, Milburn, New Jersey, EUA.

**** Intermat Ind. Com. Ltda., São Paulo, SP.

***** Bio Mérieux Prod. Lab. Reagents, Charbonnières-les-Bains, França.

***** Miles Laboratories Inc., Elkhart, Indiana, EUA.

dos anticorpos heterófilos pelo absorvente utilizado nesta reação. Finalmente, 0,6% dos soros foram positivos para VDRL e ATF-ABS, talvez devido à maior duração dos anticorpos circulantes nestes casos, uma vez que foram detectados somente nos grupos dos clinicamente curados; somente 1,2% foram positivos exclusivamente na FC, fato este verificado em casos de doença do colágeno e de mononucleose infecciosa, possivelmente devido à maior concentração de anticorpos heterófilos, ou ainda devido a antígenos cruzados.

Com relação ao nível de anticorpos detectados nas diferentes reações, a análise da tabela 3 evidencia a inexistência de qualquer relação entre estes níveis. Assim, por exemplo, para o título 1:4 na VDRL, comparada com a MHPTP, encontramos títulos desde negativos até 1:2.560, passando por valores intermediários; esta tabela não mostra qualquer relação entre os níveis de anticorpos.

Na tabela 4, onde foram comparadas as reações de VDRL, FC segundo Kolmer, a 1/5 do volume, e ATF-ABS com a reação de Maltaner, também não foi verificada qualquer relação entre os níveis de anticorpos detectados, apesar de tanto a reação de Kolmer

como a de Maltaner detectaram anticorpos fixadores de complemento. Foi utilizada a reação de Maltaner devido a sua preferência pelos sífilígrafos para observarem a evolução da infecção sífilítica em seus pacientes.

CONCLUSÃO

As reações onde são usados os antígenos de cardioplipina podem levar a resultados falso-positivos ou falso-negativos, ocorrência esta desde há muito apontada por pesquisadores. A preocupação de testes confirmatórios com agentes treponêmicos específicos levou ao uso preferencial da reação de ATF-ABS. De acordo com os resultados obtidos pelos autores do presente trabalho, que coincidem com os de outros autores, concluiu-se que a reação de MHPTP substitui a reação de imunofluorescência indireta ATF-ABS, principalmente nos trabalhos de rotina diagnóstica em laboratórios e em bancos de sangue, devido a sua sensibilidade e especificidade. A fácil execução e interpretação dos resultados da reação MHPTP, sem a necessidade de aparelhagem sofisticada, credencia seu uso nos locais onde não há maiores possibilidades técnicas.

TABELA 1

Resultado dos exames das amostras de soro analisados segundo as reações de VDRL, FC, ATF-ABS e MHPTP.

Reações Grupos	VDRL		FC		ATF-ABS		MHPTP		Total de amostras
	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	
Banco de sangue Doentes clinicamente diagnosticados	15	63	11	67	-	78	-	78	78
Pacientes clinicamente curados	26	1	26	1	26	1	26	1	27
Indivíduos com suspeita clínica	3	1	-	4	2	2	-	4	4
Pacientes com lepra lepromatosa	81	10	75	16	70	21	73	18	91
Pacientes com mononucleose infecciosa	6	67	3	70	2	71	6	67	73
Pacientes com sarampo	-	32	2	30	-	32	-	32	32
Pacientes com doença do colágeno	-	11	-	11	-	11	-	11	11
	2	26	2	26	-	28	-	28	28
Total	133	211	119	225	100	244	105	239	344

TABELA 2

Divergência nos resultados das amostras analisadas pelas reações de VDRL, FC, ATF-ABS e MHPTP

	Indivíduos com suspeita clínica, doadores, curados *	Doadores	Outros casos				Total	
			Lepra lepromatosa	Doença do colágeno	Mononucleose infecciosa	Sarampo	N.º	%
Concordância entre as quatro reações (pos.-neg.)	108	63	69	26	30	11	307	89,2
FC, ATF-ABS, MHPTP (neg.)								
VDRL (pos.)	7	4	-	-	-	-	11	3,2
ATF-ABS, MHPTP (neg.)								
VDRL e FC (pos.)	2	11	-	-	-	-	13	3,8
ATF-ABS (neg.)								
MHPTP, VDRL e FC (pos.)	3	-	1	-	-	-	4	1,1
FC, ATF-ABS (neg.)								
VDRL, MHPTP (pos.)	-	-	3	-	-	-	3	0,9
FC, MHPTP (neg.)								
VDRL, ATF-ABS (pos.)	2	-	-	-	-	-	2	0,6
VDRL, MHPTP, ATF-ABS (neg.)								
FC (pos.)	-	-	-	2	2	-	4	1,1
Total	122	78	73	28	32	11	344	-

* Com suspeita clínica, 91 casos; doadores, 27 e curados, 4.

TAKEDA, A. K.; NAKAMURA, P. M. & BARBOSA, S. F. C. — Estudo comparativo entre as reações de floculação, fixação de complemento, imunofluorescência indireta e micro-hemaglutinação passiva para sífilis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39(2):137-144, 1979.

TABELA 3

Comparação de títulos entre as reações VDRL, FC, ATF-ABS e MHPTP

MHPTP	VDRL, FC, ATF-ABS										
	Negativo	1	2	4	8	16	32	64	256	512	1024
Negativo	17 - ○ 11 - △	6 - ○	1 - ○ 2 - △	1 - ○	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	3 - □	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	1 - □	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	1 - □	-	2 - □	-	-	-	-
32	-	-	1 - □	-	-	1 - □	-	-	-	-	-
64	-	-	-	-	-	1 - □	-	-	-	-	-
80	-	-	2 - ○ 2 - △	1 - ○	1 - ○ 1 - □	1 - ○ 1 - □	1 - ○ 1 - △ 1 - □	1 - △	-	-	-
128	-	-	-	-	-	-	-	1 - □	-	-	-
160	-	-	2 - ○ 2 - △	-	-	1 - ○ 1 - □	-	-	-	-	-
320	-	-	2 - ○	1 - ○ 2 - △	2 - ○ 2 - △	1 - △	1 - ○ 1 - △ 2 - □	-	-	-	-
640	-	2 - ○	3 - △	-	2 - ○ 1 - △	2 - ○ 1 - △	3 - ○ 4 - △ 1 - □	-	-	2 - □	1 - □
1280	-	1 - △	2 - ○ 2 - △	5 - ○ 2 - △	4 - ○ 2 - △	1 - ○ 3 - △	1 - ○	1 - △	-	-	-
2560	-	-	1 - ○ 3 - △	2 - ○	1 - ○	1 - ○ 2 - △	3 - ○ 3 - △	2 - ○ 4 - △	-	-	-
5120	-	-	-	-	1 - ○ 1 - △	-	1 - ○	1 - ○ 2 - △	-	-	-

○ = VDRL
 △ = FC
 □ = ATF-ABS

TABELA 4
Comparação de títulos entre as reações de VDRL, FC, ATF, ABS e Maltaner

VDRL FC ATF ABS	MALTANER													
	2,9	2,5	3,1	4,9	11,2	18,6	27,1	39,5	53,7	57,3	62,5	132	271	287,9
Negativo	1 - □	2 - □	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	1 - ○	1 - △	1 - ○	-	1 - ○	1 - △	-	-	-	-	-	-	-	-
4	1 - △	-	1 - △	-	-	1 - ○	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	1 - ○	-	-	1 - ○	1 - △	-	-	1 - ○	1 - △	1 - △	-	1 - △	-
16	-	-	-	-	1 - □	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	1 - △	1 - □	1 - △	1 - △	-	-	-	1 - ○	2 - ○	1 - ○	1 - ○	-	1 - ○	-
32	-	-	-	-	-	-	-	-	1 - △	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 - □	-
80	-	-	-	-	-	2 - □	1 - □	-	-	-	-	-	-	-
128	-	-	1 - △	1 - □	-	-	-	-	1 - □	-	1 - △	1 - ○	-	-
320	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 - □	-	-	-
512	-	-	1 - □	-	-	-	-	-	-	1 - □	-	1 - □	-	1 - □
1024	1 - △	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 - ○	2 - △	-	1 - ○
2048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 - △

○ = VDRL △ = FC □ = ATF-ABS

RIALA6/484

TAKEDA, A. K.; NAKAMURA, P. M. & BARBOSA, S. F. C. — Comparative study of flocculation, complement-fixation, indirect immunofluorescence and passive microhaemagglutination reactions for syphilis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39(2):137-144, 1979.

SUMMARY: The possibility of using the passive microhaemagglutination reaction for *Treponema pallidum* (MHPTP) as a routine diagnostic procedure is examined. MHPTP was compared with flocculation, complement-fixation and indirect immunofluorescence reactions in 344 sera from blood-bank donors and patients suffering from syphilis and some other diseases. In the blood-bank donor group, the MHPTP agreed 100% with indirect immunofluorescence reaction but not with complement fixation or flocculation test. In the group of patients with clinical diagnosis of syphilis, there was total agreement among the four reactions.

DESCRIPTORS: syphilis serodiagnosis, methods; *Treponema pallidum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOYDEN, S. V. — The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent haemagglutination by antiprotein sera. *J. exp. Med.*, 93:107-20, 1951.
2. COX, P. M.; LOGAN, L. C. & NORINS, L. C. Automated quantitative microhemagglutination assay for *Treponema pallidum* antibodies. *Appl. Microbiol.*, 18:485-9, 1969.
3. GARNER, M. F.; BACKHOUSE, J. L.; DASKALOPOULOS, G. & WALSH, J. L. — *Treponema pallidum* haemagglutination test for yaws. Comparison with the TPI and FTA-ABS tests. *Br. J. vener. Dis.*, 48:479-82, 1972.
4. GARNER, M. F.; BACKHOUSE, J. L.; DASKALOPOULOS, G. & WALSH, J. L. — The *Treponema pallidum* haemagglutination (TPHA) test in biological false-positive and leprosy sera. *J. clin. Path.*, 26:258-61, 1973.
5. JOHNSTON, N. A. — *Treponema pallidum* haemagglutination test for syphilis. Evaluation of a modified micro-method. *Br. J. vener. Dis.*, 48:474-8, 1972.
6. KAFFMAN, R. E.; WEISS, S.; MOORE, J. D. F. & WIESNER, P. J. — Biological false positive serological tests for syphilis among drug addicts. *Br. J. vener. Dis.*, 50:350-3, 1974.
7. KIRÁLY, R. & PREVAN, H. — Evaluation of the *T. pallidum* haemagglutination (TPHA) test for syphilis on "problem" sera. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION, Geneva, 1973. (WHO working document WHO/VDS/RES/309.)
8. LESINSKI, J.; DUDZISZ, B.; KADZIEWICZ, E.; KRACH, J. & SZYMCAK, M. — Investigations on the specificity of the TPHA test and its value as a screening and verification test in syphilis diagnosis. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION, Geneva, 1974. 18 p. (WHO working document WHO/VDS/RES/74.317)
9. LUGER, A. & SPENDLINGWIMMER, I. — An appraisal of the *Treponema pallidum* haemagglutination (TPHA) test. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION, Geneva, 1972. (WHO working document WHO/VDS/RES/284)
10. O'NEILL, P.; WARNER, R. W. & NICOL, C. S. — *Treponema pallidum* haemagglutination assay in the routine serodiagnosis of treponemal diseases. *Br. J. vener. Dis.*, 49:427-31, 1973.
11. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD — *Manual de reacciones serológicas para el diagnóstico de la sífilis*. Traduzido da edição original em inglês. Washington, D.C., OPS, 1966. p. 48. (Publ. cient. n. 144)
12. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD — *Manual de reacciones para el diagnóstico de la sífilis*. Traduzido da edição original em inglês. Washington, D.C., OPS, 1975. p. 36. (Publ. cient. n. 311)
13. *Ibid.* p. 68.
14. RATHLEV, T. — Hemagglutination tests utilizing antigens from pathogenic and apathogenic *Treponema pallidum*. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION, Geneva, 1972. (WHO working document WHO/VDS/RES/77.65)

TAKEDA, A. K.; NAKAMURA, P. M. & BARBOSA, S. F. C. — Estudo comparativo entre as reações de floculação, fixação de complemento, imunofluorescência indireta e micro-hemaglutinação passiva para sífilis. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39(2):137-144, 1979.

15. RATHLEV, T. — Hemagglutination test utilizing pathogenic *Treponema pallidum* for the serodiagnosis of syphilis. *Br. J. vener. Dis.*, 43:181-5, 1967.
16. SEQUEIRA, P. J. L. & ELDRIDGE, A. E. — Treponemal haemagglutination test. *Br. J. vener. Dis.*, 49:242-8, 1973.
17. SHORE, R. N. — Hemagglutination tests and related advances in serodiagnosis of syphilis. *Arch. Dermatol.*, 109:854-7, 1974.
18. TOMIZAWA, T. & KASAMATSU, S. — Hemagglutination test for the diagnosis of syphilis. A preliminar report. *Jap. J. med. Sci. Biol.*, 19:305-8, 1966.
19. WADSWORTH, E.; MALTANER, F. & MALTANER, E. — Quantative studies of the complement fixation reactions with syphilitic serum and tissue extract: technic of practical quantitative test. *J. immun.*, 35:217-34, 1938.

Recebido para publicação em 1.º de março de 1979.