

## DIAGNOSTICUL DE LABORATOR ÎN SIFILIS

### A. Date generale :

1. Taxonomie *T.pallidum*
2. Evoluția infecției
3. Mecanisme patogene – imunitate
4. Sifilisul dobândit
5. Utilizarea testelor serologice în diagnosticul sifilisului
6. Diagnosticul sifilisului la gravide
7. Diagnosticul sifilisului congenital
8. Diagnosticul sifilisului – cazuri HIV pozitiv

## Sifilisul

Este o infectie contagioasa sistemica cu transmisie sexuala, dar si transplacentara, produsa de *Treponema pallidum*. Se caracterizeaza printr-o succesiune de perioade simptomatice scurte, despartite prin perioade de latentia mai lungi.

### TAXONOMIE (dupa Bergey, 1984)

Ordinul SPIROCHAETALES

Familia SPIROCHAETACEAE

Genul Spirocheta

Cristispira

**TREPONEMA**

Borrelia

### GENUL TREPONEMA

Criteriile de diferentiere in cadrul genului: patogenitatea om/animal si capacitatea de multiplicare in vitro

Speciile patogene pentru om si animal sunt necultivabile

Desi produc tablouri clinice diferite, nu s-au gasit diferente antigenice si morfologice notabile intre ele

*T. pallidum subsp. pallidum*

*T. pallidum subsp. endemicum*

*T. pallidum subsp. pertenue*

*T. carateum*

*T. paraluis-cuniculii*

Speciile nepatogene sunt cultivabile (conditii anaerobe) si au urmatoarea localizare:

- Cavitatea bucala (asociate paradontozei) : *T. denticola*, *T. macrodentium*,  
*T. vincentii*, *T. oralis*,  
*T. scoliodontum*
- Mucoasa genituala (flora genituala normala) : *T. phagedenis*, *T. refringens*,  
*T. minutum*

## Evolutia infectiei treponemice

Poarta de intrare (leziune tegumentara/mucoasa) → X → diseminare  
↓  
LEZIUNE PRIMARA

vase limfatice → ggl. limfatici regionali → X → circulatie limfatica →  
↓  
ADENOPATIE

sistem venos → circulatie generala → invadeaza intreg organismul

(inclusiv tegument, SNC) → X → tranzitoriu circulatie → tesuturi  
↓  
LEZIUNE SECUNDARA

(mai ales cele bogate in colagen -pereti vase) → X ⇒ LEZIUNE TERTIARA

## MECANISME PATOGENE

- Molecule de adeziune ex. receptori pentru fibronectina (extra si intravasculara)
- Mucopolizaharidaza (atasare)
- Hialuronidaza (diseminare, distrugere de capilare)
- Porine (patrundere intracelulara, distrugere)
- Enzime cu activitate de hemolizina (leziuni celulare)

Leziunile (cu exceptia gomelor) sunt produse de multiplicarea treponemelor in tesut (mai eficient in tesuturile bogate in colagen, ex peri si endarterita → necroza).

## IMUNITATEA IN SIFILIS

- Exista un anumit grad de rezistenta naturala la infectie ( anticorpii de grup fata de treponemele comensale)
- Raspuns inflamator fata de infectia primara → infiltrat inflamator in care predomina succesiv PMN, macrofage, limfocite, plasmocite, macrofage

### Fagocitoza

PMN → internalizeaza rapid T.p cu formare da vacuole → fagolizozomi → pierderea integritatii bacteriei

Macrofagele neactivate pot internaliza bacteria si prin alt mecanism : "coil- phagocytosis" → nu se formeaza fagolizozomi → treponeme vii, libere in citoplasma

- Raspunsul imun specific  
Limfocite (T,B) → dupa activarea cel.B → **anticorpi** IgM,G,A,E fata de doua tipuri de antigene (proteice = 3 Osp si 4 flagelere = MAP si lipoproteice = cardiolipina)

Anticorpilor nu opresc evolutia infectiei : ac. **anticardiolipinici = martori de leziune**  
(hetero, auto)

**ac. anti MAP**(proteine antigenice majore) = **martori de infectie**

Opsonizare, fixare de C'...

Limfocitele T citotoxice → hipersensibilitate de tip intarziat → gomele = granuloame

Deși după infecția cu T.p apare imunitate, ea se instalează lent și este eficientă atât cât persistă stimularea antigenică : **premunție** (ca în tuberculoză).

### **EVITAREA MECANISMELOR IMUNE**

- Anvelopa externă prezintă puține proteine integrale, care se pot internaliza (greu de recunoscut)
- Bacteria este acoperită de un strat mucoid format din macromolecule de origine umană (și mai greu de recunoscut ca străină).
- Pozează echipamentul genetic necesar variației antigenice.
- Diseminarea rapidă în nișe protejate (țesuturi profunde, org. încapsulate) și localizarea intracelulară ( cel. epiteliale, plasmocite, macrofage)
- Se poate transforma în sferoplasti sub presiunea antibioticelor.

**DEFINITII DE CAZ - SIFILIS DOBANDIT**

STADIU	DESCRIERE CLINICA	CRITERII - DIAGNOSTIC DE LABORATOR
PRIMAR	Infectie cu <i>T.p</i> caract. prin prezenta 1-n ulcere (sancru); Leziunea poate prezenta multiple aspecte clinice	- <b>evidentierea T.p in specimen clinic prin microscopie directa (camp intunecat), imunofluorescenta directa, echivalent</b> - clasificare caz <u>probabil</u> : caz clinic compatibil cu serologie pozitiva = VDRL/RPR pozitiv TPHA/FTA-Abs pozitiv <u>confirmat</u> : caz clinic compatibil, confirmat de laborator
SECUNDAR	Infectie cu <i>T.p.</i> caract prin leziuni mucocutanate localizate sau difuze, frecvent cu limfadenopatie generalizata; leziunea primara poare sa persiste	- <b>evidentierea T.p in specimen clinic prin microscopie directa (camp intunecat), imunofluorescenta directa, echivalent</b> - clasificare caz <u>probabil</u> : caz clinic compatibil cu titru VDRL/RPR > 1/4 TPHA/FTA-Abs pozitiv <u>confirmat</u> : caz clinic compatibil, confirmat de laborator
LATENT	Infectie persistenta cu <i>T.p.</i> , <b>asimptomatica</b>	- clasificare caz probabil: lipsa semnelor sau a simptomatologiei de sifilis si prezenta unuia din urmatoarele - <b>serologie pozitiva</b> , fara antecedente - tratament pentru sifilis in antecedente si crestere de 4x a titrului VDRL/RPR
- RECENT	Infectia a fost dobandita intr-o perioada < de 12 luni (contact suspect / confirmat sau simptomatologie sugestiva pentru sifilis primar/secundar in ultimele 12 luni)	- probabil latent recent: - seroconversie sau crestere a titrului VDRL/RPR de 4x in ultimele 12 luni - <b>serologie pozitiva</b> la o persoana cu expunere exclusiv in ultimele 12 luni
- TARDIV	Infectia initiala a fost dobandita cu mai mult de un an anterior	- probabil latent tardiv: - <b>serologie pozitiva</b> - titrul si varsta nu corespund criteiilor pt. sifilis latent de durata nedeterminata
- DURATA NEDETERMINATA	Infectia initiala nu a fost dobandita in anul precedent, varsta 13-35 ani	- probabil latent: - <b>serologie pozitiva</b> , titrul VDRP/RPR > 1/32
TERTIAR Cu alte manifestari decat neurologice	Infectie cu <i>T.p</i> netratata, clinic manifesta dupa o perioada de 15-30 ani; leziuni inflamatorii ale sistemului cardiovascular, piele, oase (rar sist. respirator, gura, ochi, org. abdominale, ggl. limfatici, muschi scheletici) fara alte cauze cunoscute	- <b>evidentierea T.p in specimen clinic prin microscopie directa (camp intunecat), imunofluorescenta directa, echivalent</b> - clasificare caz probabil : caz clinic compatibil cu serologie pozitiva = VDRL/RPR +/- TPHA/FTA-Abs pozitiv fara modificari ale LCR* sau manifestari clinice de neurosifilis <u>confirmat</u> : caz clinic compatibil, confirmat de laborator * in evaluarea sifilisului tertiar este necesara analiza LCR pentru a se exclude neurosifilisul

## **NEUROSIFILIS**

### Descriere clinica

Infectia cu T.p. la nivelul SNC (poate surveni in orice stadiu)

### Criterii - diagnostic de laborator :

- **teste serologice pozitive si LCR cu VDRL pozitiv**

### Clasificare caz

Probabil: sifilis in orice stadiu cu LCR cu VDRL negativ si

- LCR cu nivel crescut de proteine/nr.celule fara alte cauze cunoscute
- Simptome clinice sau semne compatibile cu neurosifilisul fara alte cauze cunoscute

Confirmat: sifilis in orice stadiu care indeplineste criteriile de laborator pentru neurosifilis

## **SIFILIS CONGENITAL**

### Descriere clinica:

Infectie cu T.p *in utero*, cu spectru larg de severitate. La nastere, numai cazurile severe sunt simptomatice.  
Echivalent sifilis primo-secundar.

### Criterii - diagnostic de laborator

- **evidentierea T.p in specimene clinice din leziuni, placenta, cordon ombilical sau material necroptic, prin microscopie directa (camp intunecat), imunofluorescenta directa.**

### Clasificare caz

Probabil: afectiunea a unui copil a carui mama avea la nastere sifilis netratat (sau tratat incomplet), indiferent de semnele copilului sau, un nou nascut sau copil care are un test treponemic pozitiv si oricare din urmatoarele

- orice dovada de sifilis congenital la examenul fizic
- orice dovada de sifilis congenital pe radiografiile oaselor lungi
- LCR cu VDRL pozitiv
- LCR cu nivel de proteine sau nr. celule crescut
- ELISA-IgM pozitiv

Confirmat: caz care indeplineste criteriile de laborator

\*La copiii mai mari de doi ani deosebirea intre sifilisul congenital si cel dobandit poate fi dificila (abuz sexual).  
Semnele radiologice sunt f. importante in aceasta decizie, ca si istoricul mamei.

Pt. raportare in sifilisul congenital sunt incluse si cazurile de moarte in utero la gravide cu sifilis ca si cele de copii cu sifilis dobandit

## UTILIZAREA TESTELOR SEROLOGICE ÎN DIAGNOSTICUL SIFILISULUI

### A. Se utilizează pentru diagnostic în toate stadiile dar cuplate: netreponemic + treponemic; singur, niciunul nu acoperă toate stadiile

- **VDRL / RPR**, teste netreponemice, nespecifice, identifică anticorpi IgG și IgM antilipidali (VDRL: ser inactivat și LCR; RPR: ser și plasmă neinactivate).
    - reactivitatea depinde de stadiul infecției, răspunsul gazdei
    - se pozitivează după 3-6 săptămâni → sensibilitate scăzută stadiu precoce
    - specificitate scăzută → reacții BFP ← confirmare cu test treponemic
    - **teste de depistare** (exceptie VDRL-LCR confirmă neurosifilisul), infecții active : **martori leziune**
    - în sifilisul secundar poate apărea fenomenul de prozonă
    - titrul scade → negativ către stadiul tardiv sau după tratament corect
    - titrul RPR mai mare decât cel VDRL, seroreversia VDRL mai rapidă
  - **TPHA / FTA-Abs**, teste treponemice, specificitate înaltă, **confirmă serurile reactive cu VDRL /RPR**
    - identifică anticorpi treponemici TPHA :IgM+IgG; FTA-Abs IgG, alte variante IgM
    - ca și pentru testele netreponemice, titrul variază cu stadiul infecției dar, după o scădere spre stadiul tardiv, rămân pozitive ani de zile : **martori de infecție**; seroreversia se produce extem de rar (exceptie, TPHA la pacienți HIV pozitiv, tratați). FTA-Abs pantă mai bruscă.
    - Sensibilitate :
      - FTA-Abs crescută în sifilisul primar (85%), scade în tardiv
      - TPHA ≅ VDRL/RPR în sifilisul primar precoce (65%), mai mare în stadiile tardive (100%).
- Nu se utilizează în urmărirea evoluției bolii și după tratament (exceptie sifilisul congenital → 18-24 luni)

### B. Urmărirea pacienților după tratament: test netreponemic, semicantitativ

Pacienții trebuie să fie informați despre importanța testărilor repetate pentru a se confirma vindecarea.

Urmărirea se face la cazurile confirmate cu VDRL/RPR semicantitativ (diluții binare), obligatoriu cu același test și preferabil, în același laborator.

Proba de control, la care se raportează rezultatele succesive, se recoltează în ziua 0 de tratament; o scădere a titrului de  $\geq 4x$  este semnificativă (doar 2 diluții).

Testele cardiolipinice semicantitative se repetă la 1, 3, 6 și 12 luni, sau cât este necesar, până se negativează.

În urma unui **tratament eficient în sifilisul primar-secundar**, leziunile se vindeca rapid, titrul testelor VDRL/RPR scade, testele pot deveni negative în medie în 9-12 luni.

Testele treponemice rămân pozitive de cele mai multe ori ani de zile sau uneori permanent. **Seroreversia TPHA** la 3 ani în 13% din pacienți cu sifilis primar tratați precoce; se mai semnaleză la HIV pozitiv și alte tipuri de imunodepresii

Dacă testul VDRL rămâne pozitiv la titru mare > 1an sau dacă titrul continuă să crească (4x) se recomandă **un nou tratament**, mai intensiv.

**Recăderea clinică și serologică** nu este frecventă dar uneori apare, în special în lunile 6-9 după tratament, afectând de obicei sistemul nervos. Trebuie luată în considerare și posibilitatea de **reinfectie, numai dacă urmează unei negativari de lungă durată**. Ambele cazuri necesită un nou tratament intensiv.

**Dacă toate examenele clinice și serologice rămân satisfacatoare pentru o perioadă de doi ani după tratament, bolnavul poate fi considerat vindecat.**

Pacienții cu **sifilis latent** sunt ținuți sub observație și testați la 3,6,12,18, și 24 luni; cei cu teste persistent pozitive (serofast) vor fi examinați anual pe perioadă nedeterminată. Dacă titrul se păstrează constant sau scade lent, prognosticul este bun.

Pacienții cu **sifilis terțiar benign** vor fi examinați regulat după tratament iar cei cu **sifilis cardiovascular toată viața**.

Pentru **neurosifilis asimptomatic** examinarea LCR se face la 6 luni până când este normal timp de 2 ani; LCR anormal se examinează la 3 luni până devine normal și apoi la 6 luni încă doi ani.

**Ca și anevrismul aortic, tabes dorsalis nu se remite în urma tratamentului.**

**Este necesar ca toți pacienții cu sifilis să fie sfatuiți să-și facă testările pentru HIV; cei cu sifilis primar sau secundar care au rezultat negativ trebuie retestați la 6-9 luni.**

### **Teste pentru diagnosticul serologic de rutină al sifilisului:**

**Sucesiunea pozitivării testelor serologice :**

- **in prima saptamana de la aparitia leziunii : FTA-Abs**
- **in a doua saptamana de la aparitia leziunii : TPHA**
- **in a doua-treia saptamana de la aparitia leziunii : VDRL / RPR**



- La depistare : VDRL (sau RPR) și TPHA

REZULTATE POSIBILE	INTERPRETARE
VDRL negativ TPHA negativ	Exclude infecția sau Debut infecție, se repetă peste 21zile
VDRL pozitiv* TPHA negativ	Debut infecție, se repetă peste 21zile BFP, dacă rămâne la fel
VDRL pozitiv*, TPHA pozitiv	Sifilis confirmat, în evoluție, tratat sau nu
VDRL negativ, TPHA pozitiv	Sifilis tratat, debut infecție

\* Serurile VDRL pozitive se repetă semicantitativ

- Urmărire pacienți confirmați, tratament : VDRL semicantitativ ; se continuă până când titrul scade cel puțin de 4x (două diluții, ex. 1/16 →1/4) sau se negativeaza
- Urmărire gravide pentru prevenirea și controlul sifilisului congenital:

Două testări obligatorii pentru gravide: una la prima vizită antenatală și a doua în trimestrul III

Dacă nu a fost posibil, obligatoriu la internare gravida și copilul la naștere.

Datele asupra prevalenței sifilisului la femeile gravide pot fi considerate ca o aproximație asupra prevalenței sifilisului în populația generală

(WHO/CDS/CSR/ISR/99.2, Anexa A<sub>50-52</sub>)

## Σ Western-Blotting (imunobloting)

Se strict foloseste numai ca test de confirmare, deoarece are specificitate mare dar sensibilitate mai mica.

In prezent sunt utilizate antigene de *Treponema pallidum* native si/sau recombinante

Toți pozitivii serologic au IgG față de 6 polipeptide antigenice treponemice majore (MAP):

Σ<sub>1</sub> 45, 33, 30, 15, 42, 16,5

Σ<sub>2</sub>, latent recent 6 MAP + alte 16 polipeptide

Σ latent tardiv 6 MAP + alte 4-5 polipeptide

În toate stadiile apare și P37 - polipeptidul filamentelor axiale

Interpretarea rezultatelor se face conform trusei utilizate

## DIAGNOSTICUL SEROLOGIC AL SIFILISULUI ÎN CAZURILE HIV POZITIV

SIFILISUL, ca și celelalte ITS, favorizează transmiterea HIV, în consecință este deosebit de important să convingem pacienții cu sifilis confirmat să respecte recomandarea pentru testarea HIV și invers, ca pacienții HIV pozitiv să se asigure de absența sau să trateze corespunzător sifilisul.

PARADOXAL din toate punctele de vedere:

- În ciuda imunodepresiei caracteristice, la majoritatea pacienților, diagnosticul serologic pe schema VDRL/TPHA dă rezultate corecte
- Evoluția infecției netratate primare, secundare nu este agravată
- S-a descris însă seroreversie destul de rapidă a TPHA, după tratament, acompaniată de pantă mai lentă a VDRL
- S-a descris în caz de neurosifilis, după tratament, seroconversia VDRL
- S-au descris rezultate fals pozitive, mai frecvente decât fals negative (numar scăzut de CD<sub>4</sub>).

În ciuda acestor aspecte neașteptate, este foarte important că se pot totuși depista și urmări infecțiile duble, mai ales când se pune problema stabilirii exacte a etiologiei modificărilor nervoase care apar la pacienții HIV pozitiv

## Reactii Biologic Fals Pozitive (BFP)

- Se definesc ca reacții netreponemice VDRL / RPR repetat pozitive, însoțite de reacții treponemice TPHA persistent negative, care apar la persoane fără sifilis dar cu alterări funcționale la nivel celular, de țesut sau organ.
- Responsabili pentru reactivitatea acestor seruri la VDRL sunt anticorpii anti-lipoidali prezenți în proba respectivă, anticorpi apăruți ca răspuns al organismului la o agresiune non self sau chiar a selfului.
- Titrurile sunt în general mici, uzual < 1/8 dar, cam în 10% din totalul cazurilor, pot depăși acest titru.
- În lipsa testului de confirmare (TPHA, FTA-Abs), persoanele cu reactivitate BFP sunt diagnosticate eronat cu sifilis.
- În funcție de durata acestei seroreactivități BFP, care apare mai frecvent la femei, se descriu:
  - **BFP acute**, durează 2- 9 luni, afectează persoane până la 30 ani;
  - **BFP cronice** care depășesc această perioadă și pot rămâne pozitive ani, cu mici fluctuații, afectează persoane mai vârstnice.
- ex. BFP acute : sarcina, infecții virale ( mononucleoză, varicelă, pneumonii, hepatită), vaccinări;
- ex. BFP cronice: "înaintarea în vârstă", consum de droguri injectabile, boli autoimune colagenovasculare, sindromul antifosfolipidic, boli asociate cu anomalii ale imunoglobulinelor (inclusiv HIV), afecțiuni maligne avansate, infecții cronice cu bacterii și protozoare intracelulare (lepră, infecții cu mycoplasma, toxoplasmoză, malarie, leishmanioză)

Detectarea reacțiilor BFP poate semnala existența unor afecțiuni serioase în faza subclinică, orientând pacientul spre investigații suplimentare

***BIBLIOGRAFIE***

1. **European STD Guidelines, Intl.J. STD&AIDS, 2001:12(suppl)**
2. **Laboratory Tests for the Detection of Reproductive Tract Infections, WHO 1999**
3. **Gudelines for STD Prevention, Medical and Laboratory Services, CDC, 1999**
4. **Manual for Tests for Syphilis, APHA USA, 1998**
5. **Directives de Laboratoire Applicables au Diagnostic des Maladies Sexuellement Transmissibles, WHO/VDT/89.443**
6. **Clinical Practice in Sexually Transmissible Diseases, Robertson et al., 1989**