

Protocollo diagnostico

DIAGNOSI MICROBIOLOGICA DELLA SIFILIDE

Dott.ssa Cristina Pedrotti - U.O. Microbiologia e Virologia

Dott. Claudio Paternoster - U.O. Malattie Infettive

Dott. Franco Urbani – U.O. Dermatologia, Centro per le Malattie a Trasmissione Sessuale

Dott.ssa Danila Bassetti – U.O. Microbiologia e Virologia

Dott. Paolo Lanzafame - U.O. Microbiologia e Virologia

Premessa

Il presente progetto si sviluppa nell'ambito dei programmi di attività volti migliorare l'appropriatezza prescrittiva ed analitica delle indagini di laboratorio.

Obiettivi

Gli obiettivi prefissati dal presente protocollo sono:

1. razionalizzare l'uso delle indagini microbiologiche sulla base di evidenze scientifiche
2. ridurre il numero degli esami inappropriati
3. razionalizzare e migliorare l'utilizzo delle risorse sulla base di evidenze scientifiche

Metodologia di lavoro

Il protocollo diagnostico per la diagnosi sierologica di lue è stato redatto nel 2008 in base ad una revisione della letteratura sull'argomento, ed è stato discusso e concordato con il Centro Malattie a Trasmissione Sessuale dell'U.O. Dermatologia dell'Ospedale di Trento.

A distanza di quattro anni è stato sottoposto a revisione attraverso una ricerca bibliografica aggiornata al fine di evidenziare nuove evidenze scientifiche sull'argomento.

Ricerca delle fonti: La ricerca bibliografica è stata effettuata per mezzo di parole chiave su siti di ricerca generali: Yahoo, Google e su siti di ricerca specialistici: Pubmed, Areas (Cochrane Italia), NGC, Goldenhour, ASM.

La malattia

La sifilide è una malattia infettiva trasmessa principalmente per via sessuale, causata dal *Treponema pallidum subsp.pallidum*, batterio mobile spiraliforme appartenente all'Ordine Spirochetales, Famiglia Treponemataceae.

È una malattia trasmessa principalmente attraverso contatti sessuali, attraverso la placenta o canale del parto (sifilide congenita o connatale) ed ormai raramente con la trasfusione di sangue infetto.

La storia naturale della sifilide in assenza di cure è la seguente: il periodo di incubazione dura, in genere, circa 25 giorni, dopo di che compaiono le lesioni della sifilide primaria che guariscono in 3-8 settimane. La malattia progredisce al secondo stadio in un tempo variabile da 6 a 12 settimane dalla data del contagio. Questo stadio (e le manifestazioni che lo caratterizzano) si completa nel giro di due anni al termine dei quali la malattia entra in una fase di latenza non infettiva che può persistere per la restante vita del paziente, oppure essere interrotta dopo anni o decenni dalla comparsa di lesioni gommose (15%), o di disordini cardiovascolari (10%), o neurologici (8%).

Un adeguato trattamento durante la fase recente della malattia (sifilide primaria e secondaria) previene lo sviluppo delle lesioni della sifilide tardiva. Similmente l'identificazione e il trattamento delle forme latenti asintomatiche permette di prevenire l'evoluzione in infezione attiva che altrimenti si sviluppa in circa un terzo dei casi.

Epidemiologia

Gli ultimi dati disponibili sui nuovi casi di sifilide stimano in 12 milioni di casi la presenza a livello mondiale della malattia con un notevole aumento dei casi anche nei paesi occidentali finora a bassa endemia. Di questi 12 milioni, due sono rappresentati da donne in gravidanza: l'OMS stima che l'infezione luetica materna determini tra 715.000 e 1.575.000 casi di sifilide congenita, morte fetale o perinatale e basso peso alla nascita. I CDC riportano inoltre che il 25% dei casi di sifilide primaria e secondaria si riscontrano in persone HIV positive e che il tasso di incidenza della sifilide in questo gruppo di persone è 77 volte più alto che nella popolazione generale.

La diagnosi di laboratorio

La diagnosi di sifilide richiede obbligatoriamente la conferma laboratoristica mediante: la dimostrazione del *Treponema pallidum* nelle lesioni (diagnosi diretta) o la dimostrazione della presenza nel sangue e/o nei liquidi biologici di anticorpi specifici (diagnosi sierologica).

L'utilizzo di tecniche in biologia molecolare nella diagnosi di sifilide è ancora controverso. Una recente meta-analisi ha confrontato la letteratura sull'argomento: non sono state riscontrate differenze significative in relazione ai metodi di PCR usati e, in sintesi, la sensibilità della PCR su sangue nella sifilide latente è del 31,2% con l'83,5% di specificità, la sensibilità è invece del 75,9% nelle forme di sifilide primaria se la PCR è eseguita su materiale prelevato da ulcera con un 96,5% di specificità.

L'indagine sierologica rappresenta, fin dal primo stadio della malattia, il pilastro diagnostico della lue.

Nel corso dell'infezione luetica è possibile dimostrare la comparsa di anticorpi IgM a partire dalla seconda settimana dopo l'infezione e di anticorpi IgG a partire dalla quarta settimana. Al momento della comparsa dei sintomi e segni della malattia, la maggior parte dei pazienti presenta positività sia per IgG che per IgM. L'intensità della risposta immunitaria nei pazienti affetti da sifilide è variabile, ma generalmente correlata alla durata dei sintomi. Raggiunge i massimi livelli nella sifilide secondaria e latente recente, decresce nella sifilide latente tardiva.

Nella sifilide congenita, gli anticorpi materni presenti nel neonato vengono eliminati tra il 5° ed il 6° mese, allorquando questi vengono sostituiti dai propri con inizio di produzione a partire dal 3°, 4° mese. La reattività IgM è massima nella sifilide recente primaria e secondaria, mentre purtroppo, nelle forme tardive e latenti tardive può essere presente a bassi livelli o anche essere assente.

Le finalità per le quali vengono effettuati i test sierologici sono fondamentalmente tre:

- *Screening*
- *Conferma diagnostica*
- *Valutazione dell'attività dell'infezione e della risposta al trattamento*

La sierodiagnosi della lue si sviluppa su due livelli: i sieri risultati positivi ai tests di screening devono essere sottoposti ad un test supplementare di conferma ed a una valutazione quantitativa dei livelli anticorpali, con il triplice scopo di ottenere la certezza diagnostica, di valutare il grado di attività della malattia e di porre le basi per il monitoraggio dell'efficacia della terapia.

I test utilizzati nella diagnosi sierologica di lue si dividono in test non treponemici e test treponemici. I test non treponemici (RPR, VDRL) sono correlati direttamente con l'attività della malattia, una variazione di almeno due diluizioni del titolo assume un significato clinico (deve essere però eseguito nello stesso laboratorio con gli stessi prodotti). Solitamente questi test si negativizzano dopo la terapia, anche se in alcuni pazienti possono persistere a lungo (in rari casi tutta la vita). I test treponemici (TPHA/TPPA, FTA-Abs, EIA, Immunoblotting, etc) sono più specifici, rimangono generalmente positivi tutta la vita, indipendentemente dalla terapia e

dall'attività dell'infezione. Sono in genere utilizzati in associazione ai test non treponemici sia nello screening che nella conferma diagnostica. Non sono correlati all'attività di malattia e non possono essere utilizzati per controllare la risposta al trattamento farmacologico. L'FTA-Abs è un test di immunofluorescenza indiretta, rileva anticorpi specifici per *T. pallidum*, permane positivo anche dopo terapia, è utilizzato come test di conferma dei test non treponemici ma ha una bassa sensibilità pur presentando elevata specificità.

I test immunoenzimatici attualmente sono utilizzati sia per lo screening (IgG+IgM+IgA) sia per la diagnosi e la stadiazione dell'infezione (IgG e IgM). La sensibilità è estremamente elevata ma la specificità, in particolare delle IgM, appare non soddisfacente.

I test in immunoblotting hanno una sensibilità e specificità prossime al 100%. Sono attualmente i test di conferma più sicuri, spesso sono associati a test non treponemici (VDRL) per associare la stadiazione alla attività dell'infezione. Numerosi studi hanno confermato l'elevato valore diagnostico soprattutto delle IgM e sono molto utili per la stadiazione dell'infezione e il monitoraggio della risposta alla terapia. Nell'infezione primaria si ha una risposta particolarmente intensa verso il polipeptide di 47 kD, e in misura minore verso altri antigeni. Nella sifilide secondaria e latente recente è possibile dimostrare un'intensa reazione verso tutte le componenti antigeniche. Nelle fasi tardive dell'infezione si ha positività soprattutto per gli antigeni di 15, 17, 47 kD e di entità non marcata. L'intervento terapeutico, in qualunque stadio, determina una perdita generalizzata di anticorpi verso i singoli antigeni, una certa costanza si ha nella perdita degli anticorpi contro la 47 kD anche se l'affievolimento della risposta anticorpale verso un determinato antigene non riveste un particolare significato prognostico.

Neurolye

Nei pazienti luetici, l'interessamento del sistema nervoso centrale (SNC) è evenienza frequente (circa il 40% dei casi). La neurosifilide include diverse entità cliniche: neurosifilide asintomatica, meningite sifilitica acuta, neurosifilide cerebrovascolare, paralisi progressiva, tabe dorsale. L'invasione del sistema nervoso centrale comporta pleiocitosi, aumento della proteinorachia, e positivizzazione dei tests per la lue sul liquor. La maggior parte dei pazienti, anche in assenza di trattamento, evolve in guarigione con normalizzazione del quadro liquorale nel giro di 2 anni dall'infezione. Un 15 - 25 % di casi, tuttavia, mantiene l'infezione del sistema nervoso centrale e la positività liquorale anche negli stati tardivi della malattia. Poiché l'infezione del sistema nervoso centrale può essere svelata e trattata con successo prima della comparsa dei sintomi, l'esame del liquido cefalo-rachidiano (CFS) nei pazienti luetici riveste grande importanza ed è raccomandato soprattutto nei seguenti casi:

- Sifilide di incerta durata e sifilide tardiva sia sintomatica sia latente
- Titolo sierico di TPHA > 1/2560
- Coesistenza dell'infezione da HIV
- Presenza di sintomi riferibili ad interessamento del SNC

Non esiste un singolo test in grado di diagnosticare tutti i casi di neurolye. La conferma diagnostica di neurosifilide è data dall'associazione di più fattori: alterazioni liquorali: pleiocitosi (> 5 WBC/mm³) e aumento della proteinorachia (>0,45g/L) che sono generalmente ben correlate con l'attività della malattia. VDRL-CFS positiva: la VDRL è l'unico test il cui uso è stato raccomandato sul liquor. La sua positività, in assenza di significativa contaminazione ematica del liquor, è considerata diagnostica di neurosifilide. Tuttavia la sua negatività non esclude la neurosifilide essendo stato dimostrato che il 20 -30 % dei pazienti con neurolye presenta VDRL-CFS negativa. Nessun test di laboratorio è stato comunque approvato come test diagnostico di neurolye.

Sifilide conntatale

I figli di madri luetiche sono a rischio di contrarre l'infezione in utero o durante il passaggio attraverso il canale del parto. Per questo motivo tutte le donne vanno sottoposte a screening per la sifilide all'inizio della gravidanza. Nelle popolazioni ad alto rischio o con alta prevalenza della malattia i tests sierologici vanno ripetuti alla 28° settimana di gestazione e al momento del parto. Tutti i neonati di donne sieropositive per sifilide vanno accuratamente esaminati clinicamente e

sierologicamente per svelare la presenza di una sifilide congenita. In questi bambini la diagnosi di laboratorio può non essere semplice a causa del passaggio transplacentare di anticorpi materni che può determinare una positività sierologia in assenza d'infezione. Per stabilire se gli anticorpi presenti nel siero del neonato sono di origine materna oppure no è necessario ricorrere alla ricerca degli anticorpi della classe IgM in quanto, non essendo in grado di oltrepassare la placenta, possono essere solo di origine neonatale. Fra i vari tests per la ricerca delle IgM sono da preferire i test Immunoblotting IgM i quali presentano maggiore sensibilità rispetto agli altri tests IgM. Il test Immunoblotting offre le maggiori garanzie di accuratezza per la presenza, solo in caso di infezione neonatale, di positività per gli antigeni di 37 e 47 kD.

Oltre alla ricerca delle IgM specifiche è necessario eseguire in tutti i neonati sieropositivi per sifilide:

- *Ricerca con titolazione degli anticorpi antilipoidei nel sangue mediante VDRL o RPR* (indispensabili per seguire il paziente dopo terapia)
- *Esame del liquor cefalo-rachidiano* per escludere la neurosifilide.

Tutti i bambini sieropositivi vanno poi sottoposti ad un accurato follow-up sierologico con prelievi ogni 2-3 mesi fino a negativizzazione della sierologia o riduzione dei titoli anticorpali di almeno 4 volte.

I bambini non infetti devono negativizzare ogni positività sierologica per tests treponemici entro i 18 mesi di vita. Un test treponemico positivo dopo questa età è diagnostico di lue congenita. Gli esami seriatati sono anche consigliati per svelare la presenza di IgM tardive le quali possono comparire alcune settimane dopo la nascita essendo, al momento del parto, la loro sintesi inibita dagli elevati livelli di IgG di origine materna.

Di seguito si riporta uno schema che riassume le caratteristiche dei tests sierologici più in uso:

	% di sensibilità e stadi dell'infezione				% Specificità
	Primaria	Secondaria	Latente	Tardiva	
RPR	86	100	98	73	98
VDRL	78	100	95	71	98
TPHA	83	100	98	96	96
FTA-Abs	84	99	99	96	97
EIA IgTotali	97	97	97	97	99
EIA IgG	93	94	94	94	98
EIA IgM	95	//	//	//	73
Immunoblotting	99	99	99	99	100

Protocollo diagnostico

La revisione della letteratura effettuata al fine di verificare l'attualità del protocollo in uso e di segnalare nuove evidenze scientifiche sull'argomento, conferma la validità dell'attuale protocollo perfettamente in accordo con le Linee Guida Europee per la diagnosi di sifilide.

Screening:

Lo screening viene effettuato con metodica EIA per la ricerca delle Ig totali (IgG+IgA+IgM) su sistema automatizzato Architect (Abbott).

Conferma:

I test di conferma utilizzati sono RPR e TPPA, che consentono di ottenere sensibilità e specificità ottimali e distinguere tra infezione in atto o recente e pregressa. Tale procedura viene utilizzata anche di routine per il controllo sierologico nei donatori di organi e tessuti.

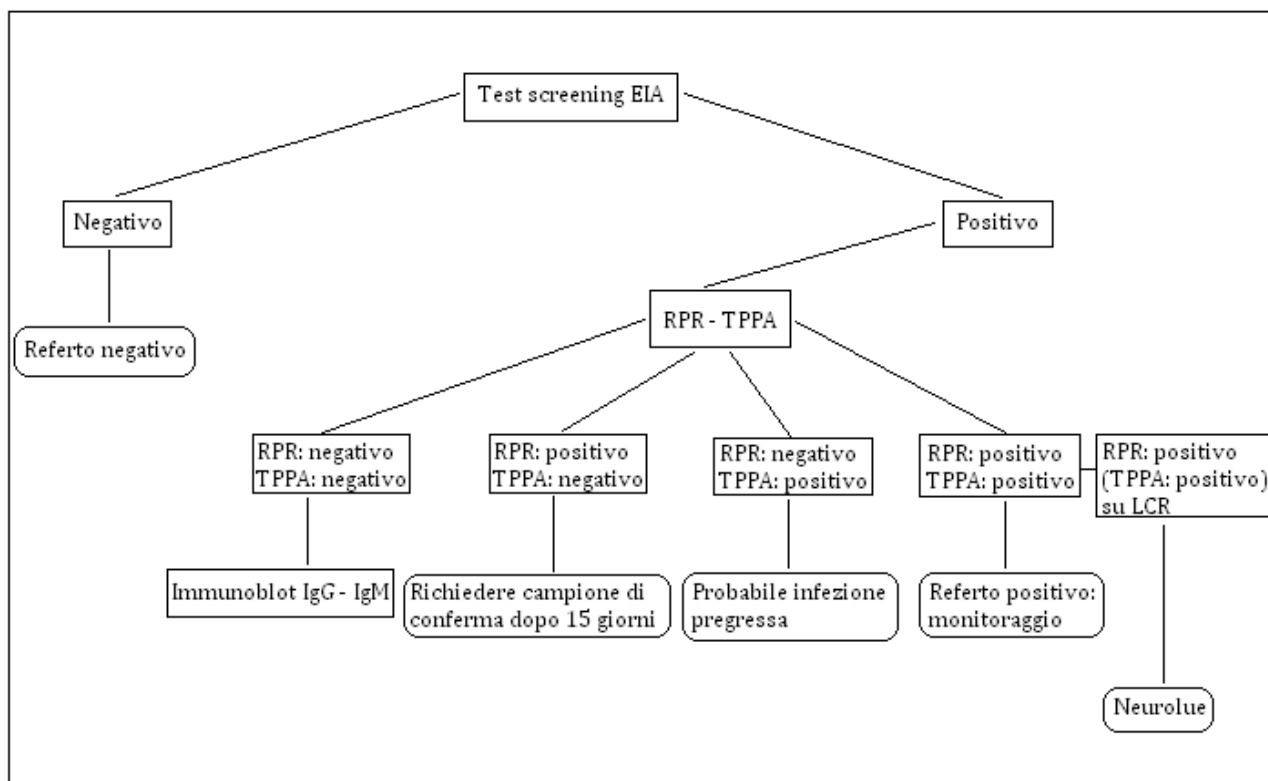
Conferma di 2° livello e stadiazione dell'infezione:

Qualora sia necessario dirimere dubbi diagnostici o nella diagnosi di lue congenita saranno effettuate le ricerche di IgG e IgM con metodica di immunoblotting. In particolare l'immunoblot per la ricerca di IgG e di IgM viene eseguito nei casi di risultati controversi tra test di screening e test di conferma (vedi algoritmo 1), mentre la ricerca di sole IgM è riservata ai casi di sospetta lue congenita: la negatività di IgM non esclude una sifilide congenita, ma la loro positività può essere considerata come fortemente suggestiva d'infezione anche nei casi asintomatici.

I reparti non richiedono più i singoli test ma per loro, sulla scheda di richiesta, è prevista esclusivamente la voce "Sierologia lue" (cod. LUE), sarà compito del laboratorio eseguire i test ulteriori rispetto allo screening nei casi previsti. Sulle richieste, a cura del reparto richiedente, dovrà essere specificato il motivo della richiesta (screening, monitoraggio terapia, lue congenita, donatore d'organo o tessuto, etc.) al fine di consentire al laboratorio l'appropriata esecuzione dei test diagnostici necessari.

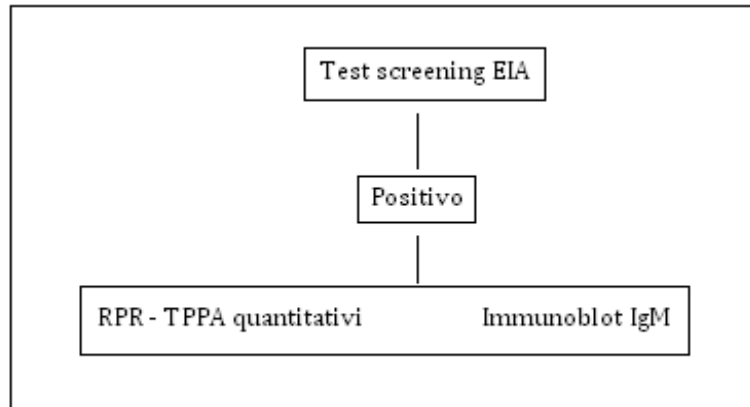
Algoritmo della diagnosi sierologica di sifilide presso l'APSS di Trento

1.



Algoritmo della diagnosi sierologica di sifilide presso l'APSS di Trento nel sospetto di infezione congenita

2.



Bibliografia:

1. Danielsen AG, Weismann K, Jorgensen BB, Heidenheim M, Fugleholm AM. Incidence, clinical presentation and treatment of neurosyphilis in Denmark 1980-1997. *Acta Derm Venereol* 2004;84:459-62.
2. Parkes R, Renton A, Meheus A, Laukamm-Josten U. Review of current evidence and comparison of guidelines for effective treatment in Europe. *Int J STD AIDS* 2004;15:73-88.
3. Wheeler HL, Agarwal S, Goh BT. Dark ground microscopy and treponemal tests in the diagnosis of early syphilis. *Sex Transm Infect* 2004;80:411-4.
4. Egglestone SI, Turner AJL, for the PHLs Syphilis Serology Working Group. Serological diagnosis of syphilis. *Commun Dis Public Health* 2000;3:158-62.
5. French P. **Syphilis**. *BMJ* 2007; 334: 143-147
6. Doherty L, Fenton KA, Jones J, Paine TC, Higgins S, Williams D, Palfreeman A. Syphilis: old problem, new strategy. *BMJ* 2002; 325: 153-156.
7. UK national guidelines on the management of syphilis 2008. NGC - 7153
8. Syphilis. NGC - 8820
9. P. French, M. Gomberg, M. Janier, B. Schmidt, P. van Voorst Vader, H. Young. IUSTI: 2008 European Guidelines on the Management of Syphilis. *International Journal of STD & AIDS* 2009; 20: 300-309.
10. P.L. Mattei, T.M. Beachkofsky, R.T. Gilson, O.J. Wisco. Syphilis: A Reemerging Infection. *American Family Physician*; Vol. 86, Number 5, September 1, 2012.
11. K. G. Ghanem, K. A. Workowski. Management of Adult Syphilis. *CID* 2011;53 (Suppl 3)
12. Gruppo multidisciplinare "Malattie infettive in ostetricia-ginecologia e neonatologia" (AMCLI, SIMaST, SIMIT, SIN, SIP). *Percorsi diagnostico-assistenziali in Ostetricia e Neonatologia*. Sifilide; Aprile 2012.
13. *MMWR* December 17, 2010; Vol. 59 / RR-12: 26-39.
14. Gayet-Ageron, S. Lautenschlager, B. Ninet, T. V Perneger, C. Combescure. Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiology. STI Online First*, published on September 28, 2012.
15. P. A. Grange, L. Gressier, P. L. Dion, D. Farhi, N. Benhaddou, P. Gerhardt, P. Morini, Deleuze, C. Pantoja, A. Bianchi, F. Lassau, M. F. Avril, M. Janier, and N. Dupina. Evaluation of a PCR Test for Detection of *Treponema pallidum* in Swabs and Blood. *JCM* March 2012; Vol 50 Number 3: 546-552.
16. C. Tipple, M.O.F. Hanna, S. Hill, J. Daniel, D. Goldmeier, M.O. McClure, G.P. Taylor. Getting the measure of syphilis: qPCR to better understand early infection. *Sex Transm Infect* 2011; 87:479-485.
17. P. García, B. Grassi, F. Fich, A. Salvo, L. Araya, F. Abarzúa, J. Soto, H. Poggi, M. Lagos, P. Vásquez., E. P. León, C. Pérez, A. Wozniak. Laboratory diagnosis of *Treponema pallidum* infection in patients with early syphilis and neurosyphilis through a PCR-based test. *Rev Chil Infect* 2011; 28 (4): 310-315.
18. J.D. Tucker, J. Bu, L.B. Brown, Y-P. Yin, X-S. Chen, M.S. Cohen. Accelerating worldwide syphilis screening through rapid testing: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 381-86.