

LA SIFILIDE

Diagnosi microbiologica

Maria Rita Rossi

Modulo Dipartimentale
di Microbiologia e Sierologia
Azienda Ospedaliera- Universitaria
S.Anna Ferrara



Classificazione

- Famiglia Spirochetaceae
 - Treponema pallidum pallidum -> sifilide
 - Treponema pallidum pertenue -> framboesia
 - Treponema pallidum endemicum -> bejel
 - Treponema carateum → pinta



Sifilide



T.pallidum pallidum si trasmette principalmente per contatto sessuale o durante la gravidanza dalla madre al feto. La spirocheta è in grado di passare attraverso le mucose intatte o la cute danneggiata.

Framboesia o yaws

Noduli del gomito causati dall'infezione da parte di **Treponema pallidum pertenue**

La framboesia (dal francese framboise, «lampono») è una malattia tropicale, molto comune nelle isole dei Caraibi, nelle Filippine, in Africa, in India e in altri paesi tropicali. La framboesia si trasmette per diretto contatto con il fluido proveniente da una lesione di una persona infetta. Il contatto è normalmente di natura **non sessuale**. La malattia è più comune tra i bambini, che la disseminano giocando tra di loro. Il contagio avviene per via diretta, in caso che la secrezione venga in contatto con una ferita aperta, oppure indirettamente, per mezzo delle mosche, come è stato dimostrato recentemente.



Pinta

Lesioni causate da **Treponema carateum**



La pinta è una malattia tropicale simile per manifestazioni alla sifilide, colpisce la cute. Diffusa nel continente del Sud America, dove è considerato un grave problema, si ritrova anche in Messico, si manifesta principalmente in adolescenti di entrambi i sessi. Non è molto contagiosa. La trasmissione richiede il **contatto con una cute non integra**.

Bejel (endemic syphilis)

- *T. pallidum* spp. *endemicum* is transmitted by direct contact, eating and drinking utensils
- Primary lesions are rarely observed
- Secondary lesions consist of oropharyngeal mucous patches, split papules at the corners of the mouth, condylomata lata, periostitis, and regional lymphadenopathy
- Gumma or neurological manifestations are uncommon
- Diagnosis: VDRL positive
- Therapy: penicillin G; precise incidence not known



T.pallidum pallidum



- ✓ Anaerobio stretto, dimensioni 0,2x5-15 micron
- ✓ Non visibile al comune microscopio, visibili in campo oscuro
- ✓ Impregnazione argentea di Fontana Tribondeau o inchiostro di china
- ✓ Forma a spirale, mobilità per rotazione intorno all'asse longitudinale
- ✓ Riproduzione per fissione trasversa (tempo di divisione 30 ore)
- ✓ Coltivabilità in vitro NESSUNA
- ✓ Ceppo Reiter (non patogeno) coltivabile in vitro
- ✓ Ceppo Nichols coltivabile per inoculazione nel testicolo di coniglio (utilizzato nel test di Nelson)
- ✓ Estremamente fragile: muore a 42°C, arsenico, mercurio, bismuto sono treponemicidi
- ✓ Sensibile a penicillina, tetracicline e macrolidi, resistente agli aminoglicosidi

Evoluzione generale della sifilide

Incubazione	Sifilide precoce	Sifilide secondaria	Sifilide latente	Sifilide terziaria
-----	-----	-----	-----	-----
Dall'inoculo	Sifiloma primario cutaneo o mucoso	Lesioni secondarie mucose o viscerali	Asintomatica Sierologica	Cutaneo-mucosa Viscerale, durata indefinita Cardio-vascolare Neuro-sifilide
3 settimane	6-8 settimane	18 mesi-2 anni	3-10 anni	10% dei casi non trattati

Sifilide primaria: sifilomi a livello dei genitali esterni maschili e femminili



Sifilide secondaria



© Elsevier 2004, Infectious Diseases 2e - www.idreference.com

Sifilide congenita





Diagnosi microbiologica diretta:

mette in evidenza il microrganismo o suoi costituenti (proteine o acidi nucleici).

Indicazioni

Lesione primaria: ulcere o erosioni genitali, anali o della bocca in soggetti sessualmente attivi prima di qualsiasi trattamento antibiotico.

Lesioni secondarie (mucose, cutanee); LCR (forme neurologiche); per le forme congenite (liquido amniotico, bolle da pemfigo, muco nasale, LCR).

LUE Esame microscopico	Allestire direttamente un vetrino con l'essudato	Coprire con vetrino coprioggetti e osservare immediatamente al paraboloide
PCR In corso di valutazione	Diagnostica delle forme congenite, neurologiche e reinfezioni	Geni codificanti per proteine di membrana

T.pallidum Struttura antigenica

Antigene **lipideo** disposto esternamente, non ricopre interamente il corpo batterico

ATG lipideo
(Ag cardiolipinico)

Antigene **proteico** termolabile diviso in

ATG proteico

Gruppo specifico

- 1. Gruppo specifico** esterno che caratterizza T.pallidum da T.pertenue da T.carateum
- 2. Ceppo specie specifico** che caratterizza T pallidum ceppo Reiter da ceppo Nichols

Ceppo Specie specifico

Antigene **polisaccaridico** termostabile specie e ceppo specie specifico

ATG polisaccaridico

Potenziale immunogeno mediocre. Non inducono una risposta immunitaria persistente, ma una semplice immunità dalle superinfezioni durante la malattia. Esiste una immunità da superinfezione crociata tra yaws o framboesia e sifilide.

Diagnosi sierologica di sifilide

Tests cardiolipinici

VDRL – Venereal Disease
Research Laboratory

RPR- Rapid Plasma Reagent

Tests treponemici

FTA - Fluorescent Treponema
Antibody

TPHA - Treponema Pallidum
Haemagglutination Assay

Test di Nelson-
Immobilizzazione dei treponemi

EIA – Enzyme Immuno Assay

WESTERN BLOTTING
Treponema pallidum

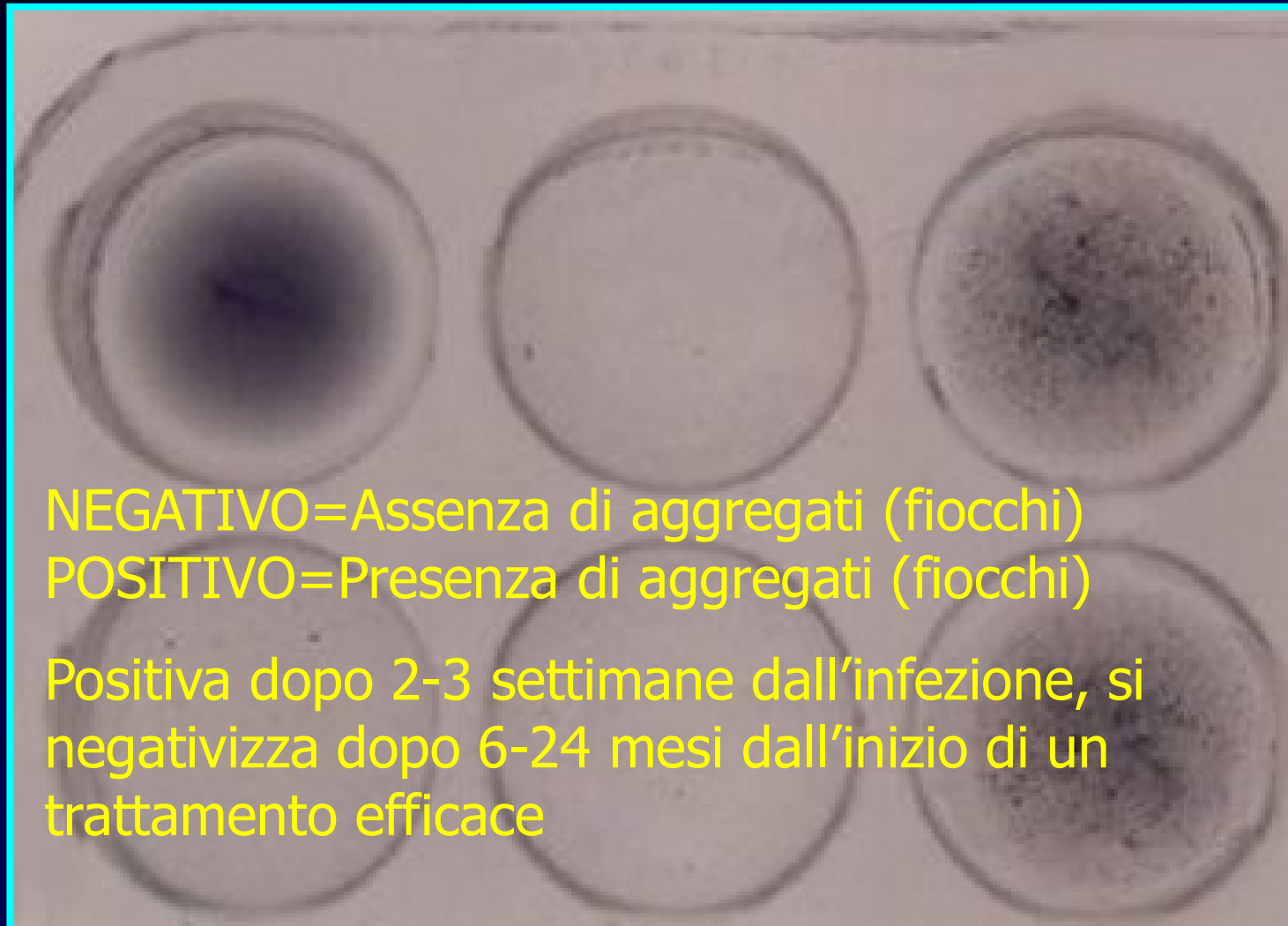
VDRL - Venereal Disease Research Laboratory

PRINCIPIO: Test di flocculazione

<i>ATG lipoideo (Ag cardiolipinico)</i>	
<i>ATG proteico</i>	<i>Gruppo specifico</i>
	<i>Ceppo Specie specifico</i>
<i>ATG polisaccaridico</i>	

- Utilizza ANTIGENE cardiolipinico (disfosfotidilglicerolo + lecitina +colesterolo) estratto dal cuore di bue
- Rileva sostanze anticorpo-simili detti **reagine** (anticorpi non treponemici)
- Tipologia di campioni: si esegue su **siero e CFS**.
(è l'unico test su liquor approvato dal CDC)
- **Procedura**: mettere a contatto il campione e l'antigene cardiolipinico nella concavità di un vetrino per agglutinazione e ruotare per 8 minuti a 180 rpm. Utilizzare in ogni seduta un controllo reattivo medio, forte e negativo
- Test qualitativo e quantitativo

VDRL - Venereal Disease Research Laboratory INTERPRETAZIONE



NEGATIVO=Assenza di aggregati (fiocchi)

POSITIVO=Presenza di aggregati (fiocchi)

Positiva dopo 2-3 settimane dall'infezione, si negativizza dopo 6-24 mesi dall'inizio di un trattamento efficace

RPR-Card Test (Rapid Plasma Reagent)

PRINCIPIO: Flocculazione con coagglutinazione macroscopica delle particelle di carbone-cardiolipina su cartoncino

- Utilizza ANTIGENE **cardiolipinico** estratto dal cuore di bue e **particelle di carbone**
- Rileva ANTICORPI detti **reagine** (anticorpi non treponemici)
- Tipologia di campioni: si esegue su **siero**.
- Eliminare i campioni lipemici o emolizzati

RPR Card Test

PRINCIPIO: Flocculazione con coagglutinazione macroscopica delle particelle di carbone – cardiolipina su cartoncino

- ✓ Procedura: mettere a contatto il campione e l'antigene cardiolipinico nel cerchio di 18 mm di un cartoncino per RPR e ruotare per 8 minuti a 100 rpm (95-110rpm). Utilizzare in ogni seduta un controllo reattivo medio, forte e negativo.
- ✓ Leggere immediatamente illuminando il cartoncino con luce forte
- ✓ Risultato: reattivo medio, forte, negativo. Se il risultato è dubbio titolare il campione
- ✓ Test qualitativo e quantitativo (2-4-8-16-32). Se >32 diluire con siero negativo

RPR Card Test - Limiti e utilità.

- ✓ Avvalorare ogni test positivo con la storia del paziente o con l'evidenza clinica
- ✓ Il test positivo, se titolato, può essere utile per iniziare un trattamento o per valutarne l'efficacia
- ✓ Ogni test positivo deve essere confermato con un test treponemico
- ✓ Alta variabilità di risposta da non reattivo a reattivo ad alte diluizioni nella sifilide terziaria
- ✓ Nella neurosifilide è preferibile la VDRL anche se nel 50% dei casi i risultati sono negativi

RPR Card Test – Falsi positivi biologici

- Mononucleosi
- Lebbra
- Malaria
- Lupus eritematosus
- Vaccinazione antivaiolosa, polmoniti virali
- Gravidanza
- Pinta, yaws, bejel** e altre malattie prodotte da treponemi determinano **positività vere** dei tests cardiolipinici

Tests treponemici

Utilizzano corpi interi, estratti o proteine ricombinanti di *T.pallidum*

<i>ATG lipoideo</i> (Ag cardiolipinico)	
<i>ATG proteico</i>	<i>Gruppo specifico</i>
	<i>Ceppo Specie specifico</i>
<i>ATG polisaccaridico</i>	

- Tests gruppo specifici → antigene estrattivo di *T.pallidum* ceppo Reiter
 - Reazione di Wassermann
(fissazione del complemento oggi in disuso)
- Tests specie ceppo specifici → antigene *T.pallidum* ceppo Nichols
 - TPI, TPHA, FTA, EIA, WBlot

Tests treponemici - Finalità e limiti

- Verificare la specificità dei tests cardiolipinici
- Svelare l'infezione luetica in soggetti negativi per tests non treponemici ma con evidenza clinica di lue tardiva (late syphilis)
- Non sono indicativi della risposta al trattamento
- Il risultato è di tipo qualitativo
- Solo TPI è indicata come una procedura standard per testare LCR

TPI-Treponema pallidum Immobilization Test

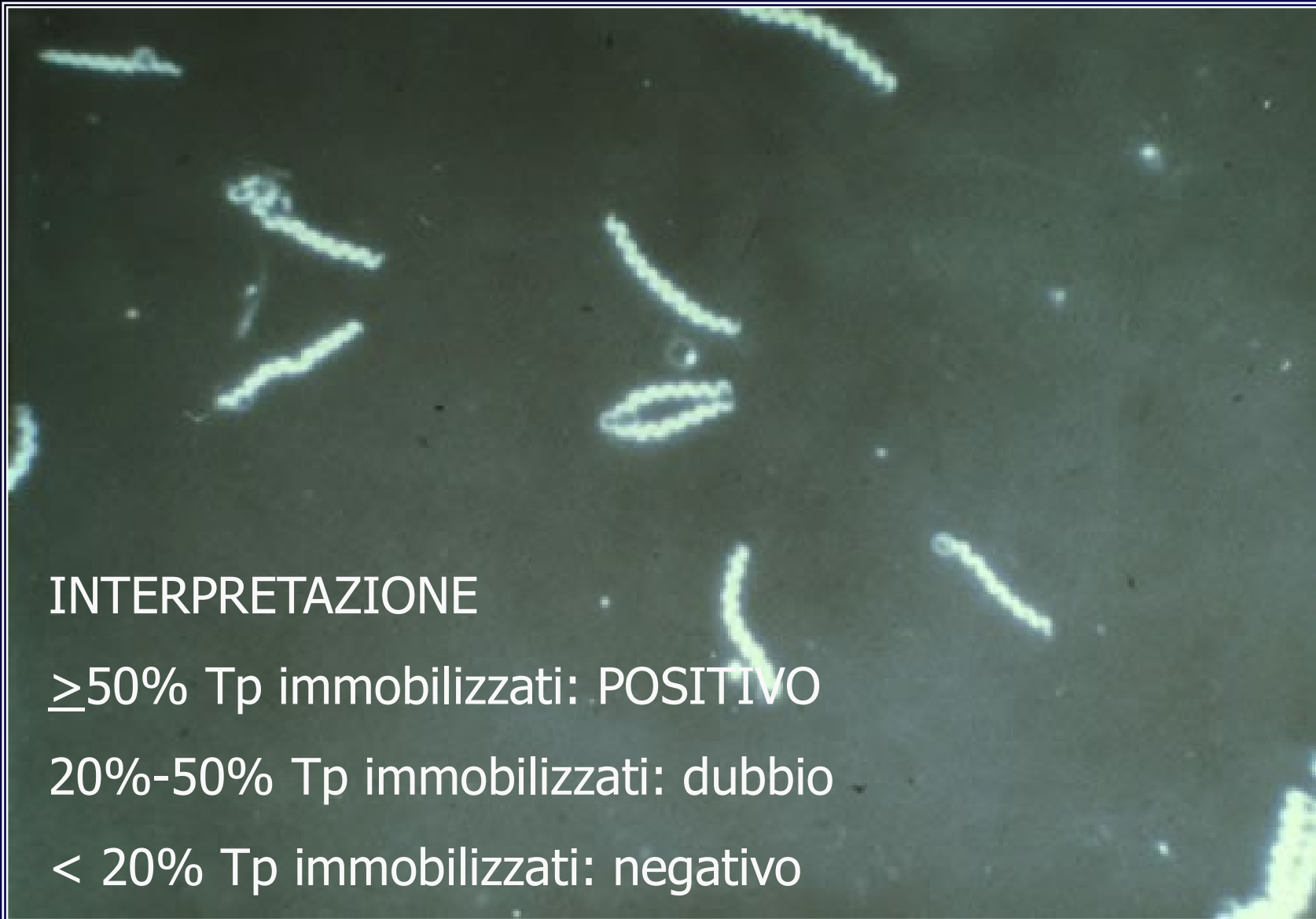
- Introdotto nel **1949** da Nelson e Meyer, fu il primo test specifico per antigene treponemico
- Utilizzato come gold standard per valutare gli altri tests
- Non utilizzato negli USA perché impegnativo e dispendioso
- Test di scelta per CRF, fa diagnosi nel caso di VDRL dubbia

PRINCIPIO

Immobilizzazione di *Treponema pallidum* da parte di anticorpi specifici presenti nel siero di soggetti sifilitici in presenza di complemento di cavia. La reazione avviene in anaerobiosi durante una incubazione che dura 20 ore.



TPI-Treponemal pallidum Immobilization Test



INTERPRETAZIONE

$\geq 50\%$ Tp immobilizzati: POSITIVO

20%-50% Tp immobilizzati: dubbio

$< 20\%$ Tp immobilizzati: negativo

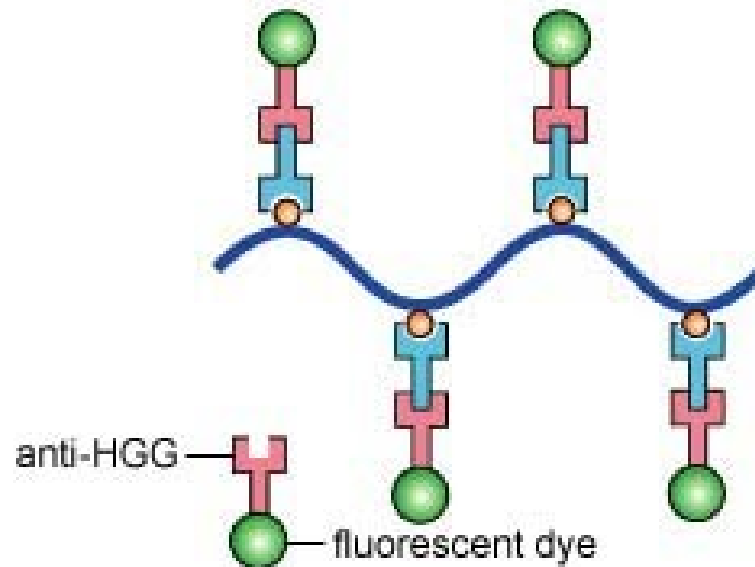
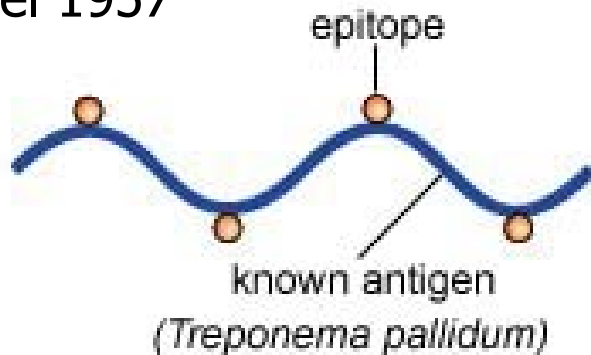
FTA- ABS Fluorescent treponemal antibody **absorption**

PRINCIPIO

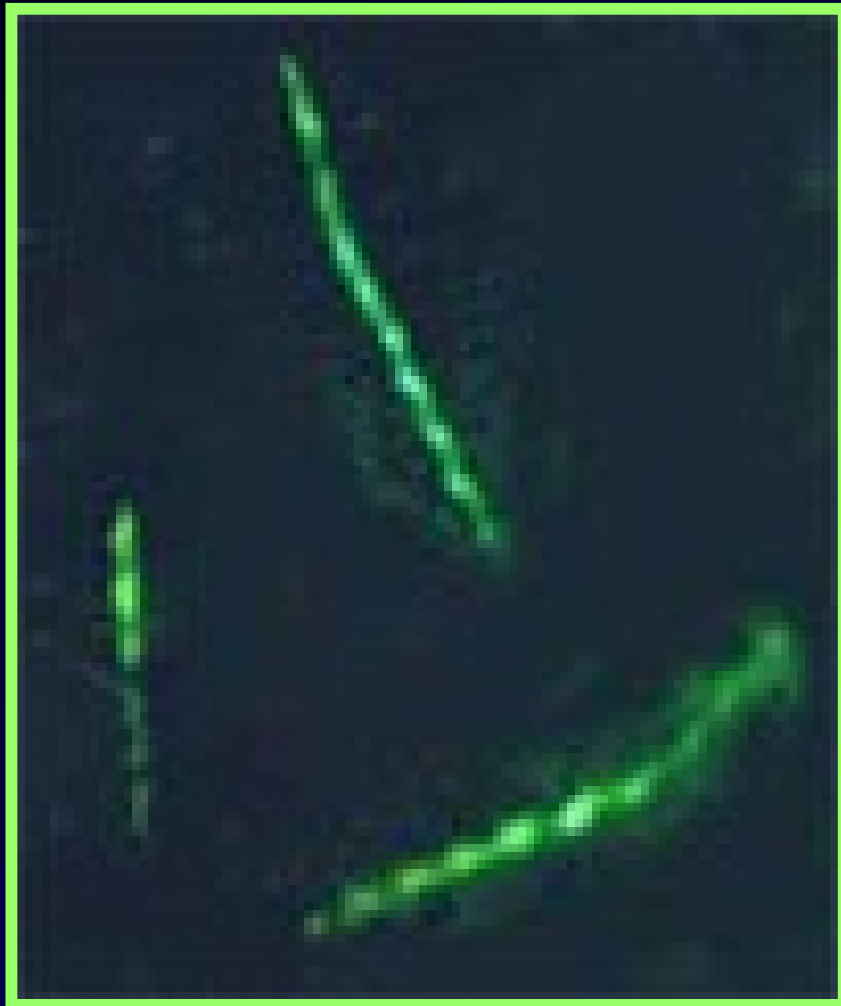
(assorbimento con estratto di treponemi ceppo Reiter per eliminare reazioni aspecifiche)

1. Gli anticorpi del paziente presenti nel campione si legano ai treponemi
2. Anticorpi anti-uomo marcati con fluoresceina si legano all'immunocomplesso
3. I treponemi sono visibili al microscopio a fluorescenza

Nasce
nel 1957



FTA- ABS Fluorescent treponemal antibody absorption



INTERPRETAZIONE

Negativo: negativo o
1+ di fluorescenza

Positivo: da 2+ a 4+ di
fluorescenza

Rileva IgG/IgM o IgM

COMMENTI

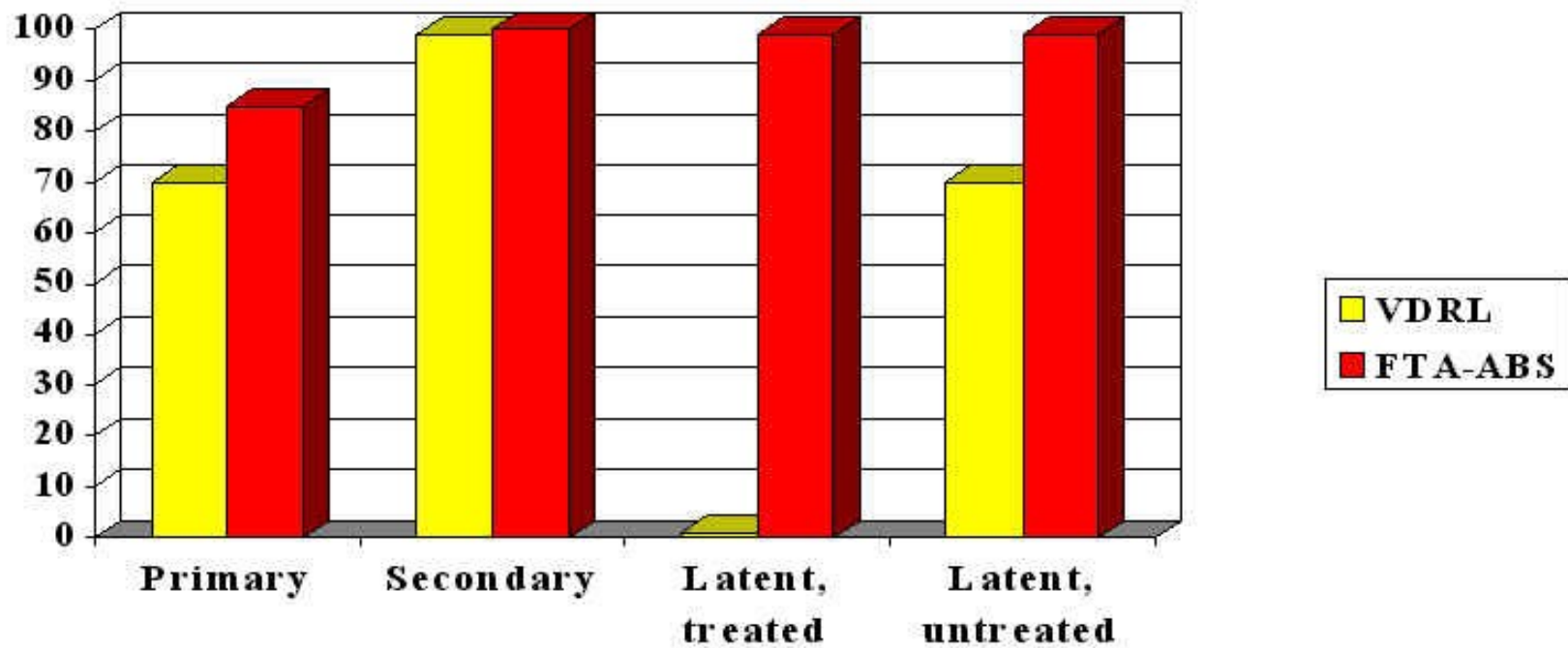
È un test altamente specifico
ma richiede **esecuzione
meticolosa ed esperienza
nella lettura**

FTA- ABS Fluorescent treponemal antibody absorption

- ❖ Falsi positivi nel Lupus eritematosus i treponemi sono irregolarmente colorati e presentano granulazioni
- ❖ Nella sifilide i treponemi sono colorati in modo uniforme
- ❖ Si positivizza dopo 20-30 giorni dal contagio, si negativizza raramente dopo terapia
- ❖ Non è indicato come test di screening
- ❖ Utile come test di conferma

NOTA: Il test FTA è più sensibile del TPHA nella sifilide primaria, la sensibilità è sovrapponibile nella secondaria

Positive results to VDRL/FTA



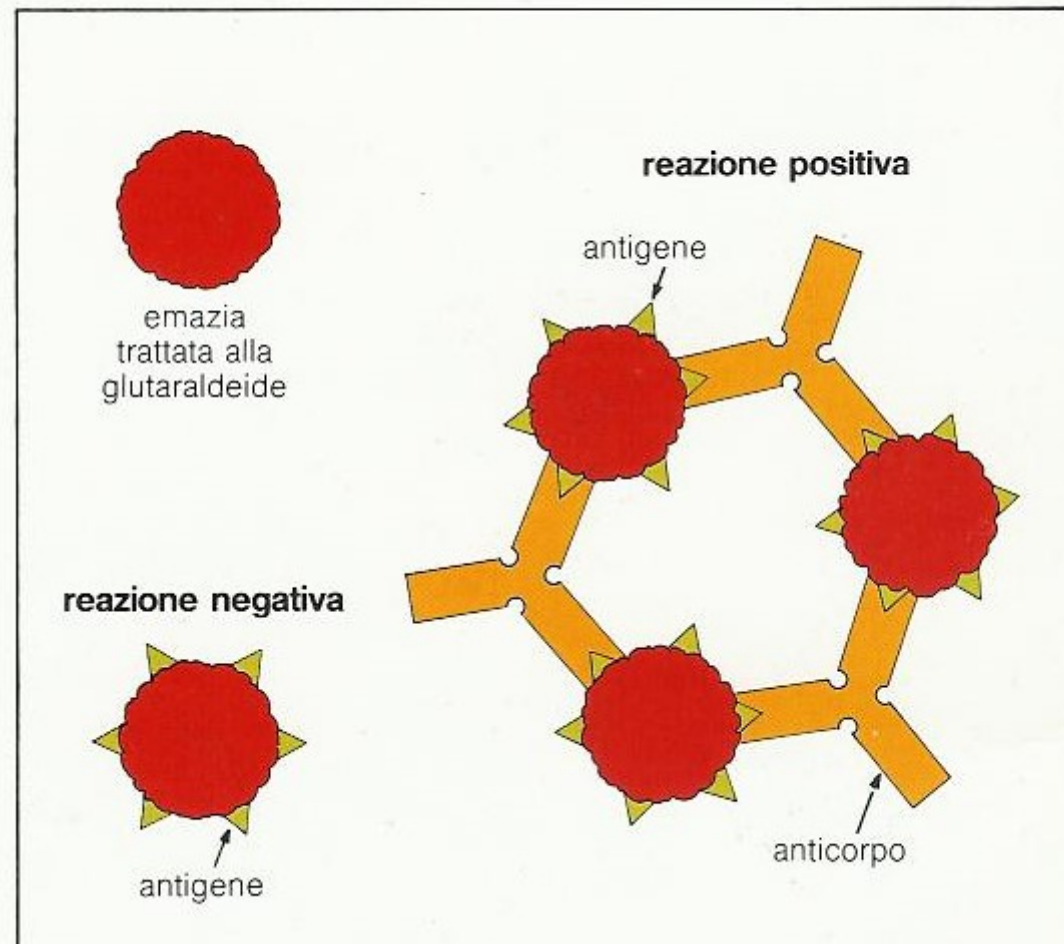
TPHA Treponema Pallidum Haemagglutination Assay (MHA-TP micrometodo in piastra in automazione) 1966

PRINCIPIO:

Emoagglutinazione
indiretta passiva

Agglutinazione di
emazie sensibilizzate
con antigene di
Treponema pallidum
ceppo Nichols da
parte di specifici
anticorpi

Emoagglutinazione passiva

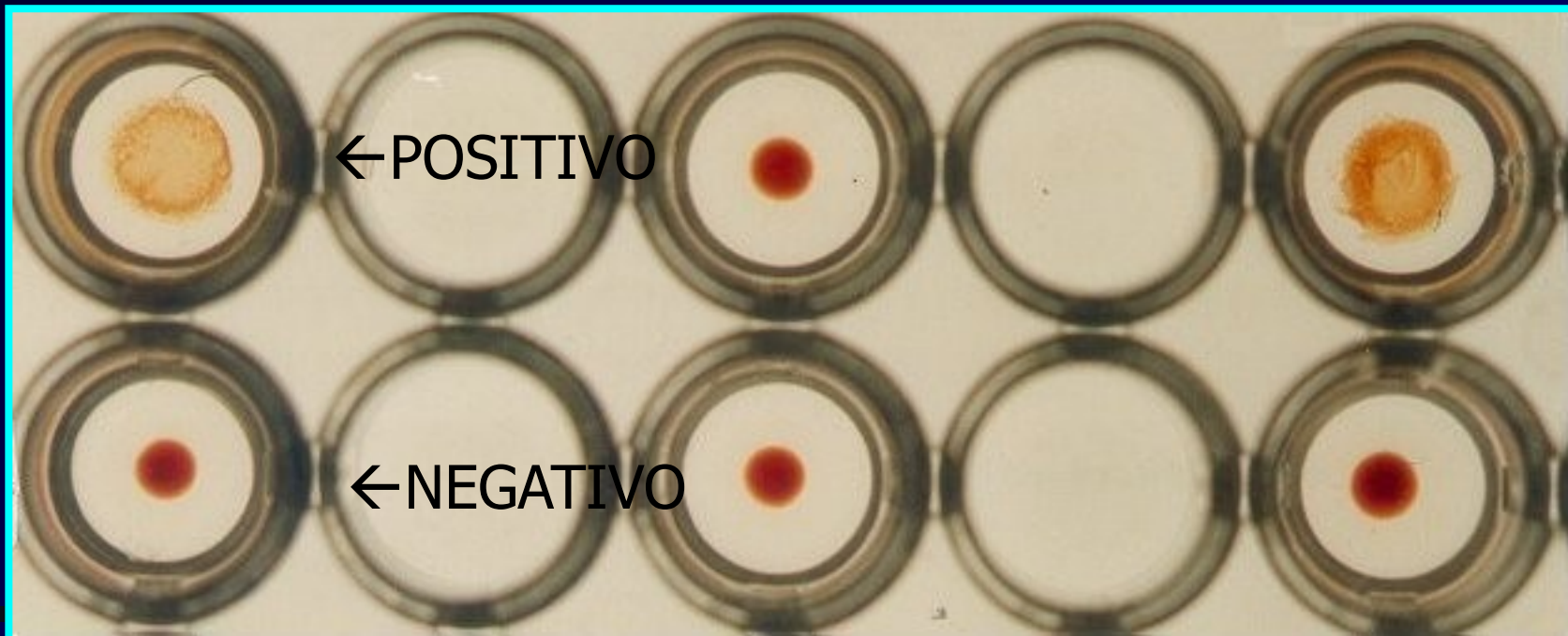


TPHA Treponema Pallidum Haemagglutination Assay
(MHA-TP micrometodo in piastra in automazione) 1966

PROCEDURA: si esegue una titolazione del siero in piastra microtiter; la soluzione tampone utilizzata per allestire le diluizioni **assorbe gli anticorpi aspecifici** in quanto contiene un estratto di Treponemi ceppo Reiter. Per ogni campione si esegue un controllo con emazie non sensibilizzate.

TPHA Treponema Pallidum Haemagglutination Assay

- ❑ Possibile effetto prozona
- ❑ False positività in soggetti con malattie del tessuto connettivo
- ❑ Positività più tardiva rispetto a FTA, dopo 40-60 giorni dal contagio
- ❑ Si negativizza raramente dopo terapia
- ❑ Concorda di più con TPI che con FTA



EIA- Enyme Immuno Assay

con antigeni ricombinanti per la ricerca di Ig totali anti-Treponema pallidum ceppo Nichols

PRINCIPIO

- Test sandwich indiretto
- Antigeni ricombinanti legati ad una fase solida

Recombinant antigen	Function	Size (KDa)
TP 47	Membrane protein	47
TP 17	Membrane protein	17
TP 15	Membrane protein	15

EIA- Enyme Immuno Assay

Lettura spettrofotometrica

Risultato espresso attraverso un indice

INDICE= D.O. campione

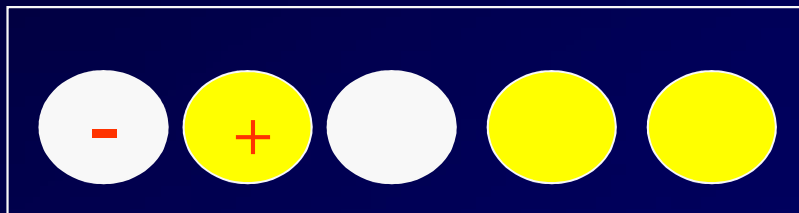
D.O. standard low (cutoff)

Indice ≤ 1 campione negativo

Indice ≥ 1 campione positivo

VANTAGGI

- Alta sensibilità e specificità
- IgG ed IgM insieme o separate
- No assorbimento
- Eseguitibile in automazione
- Marchio CE



EIA-IgM a CATTURA

antigeni ricombinanti per la ricerca di **IgM**
anti-Treponema pallidum ceppo Nichols

PRINCIPIO

- ✓ **Anticorpi di coniglio anti IgM umane** specifici per la catena μ sono adesi al pozzetto
- ✓ Durante la prima incubazione le IgM presenti nel campione vengono CATTURATE dagli anticorpi sul pozzetto
- ✓ Dopo lavaggio viene aggiunto antigene treponemico purificato + anticorpi monoclonali anti-TP biotilinato + streptavidina coniugata con perossidasi
- ✓ Dopo incubazione e lavaggio viene aggiunto il substrato tetrametil-benzidina
- ✓ L'intensità di colorazione sviluppata è proporzionale alla quantità di anticorpi presenti nel campione

Ricerca di **IgM** anti-Treponema pallidum ceppo Nichols



INDICAZIONI

- ◆ **Diagnosi della sifilide congenita**
- ◆ Diagnosi di sifilide primaria
- ◆ Diagnosi della sifilide avanzata non curata
- ◆ Monitoraggio della terapia

Western blot IgG – IgM – IgA 1989

- Le diverse proteine treponemiche **separate attraverso migrazione elettroforetica** sono **trasferite su una striscia di nitrocellulosa**
- Attraverso una reazione immunoenzimatica si evidenzia la reazione anticorpale al *T. pallidum* per mezzo dei **legami che i singoli anticorpi formano con le singole proteine**

Prima incubazione

siero umano opportunamente diluito
 $\text{Ab} + \text{Ag} = 1^\circ \text{ immunocomplesso}$

Seconda incubazione

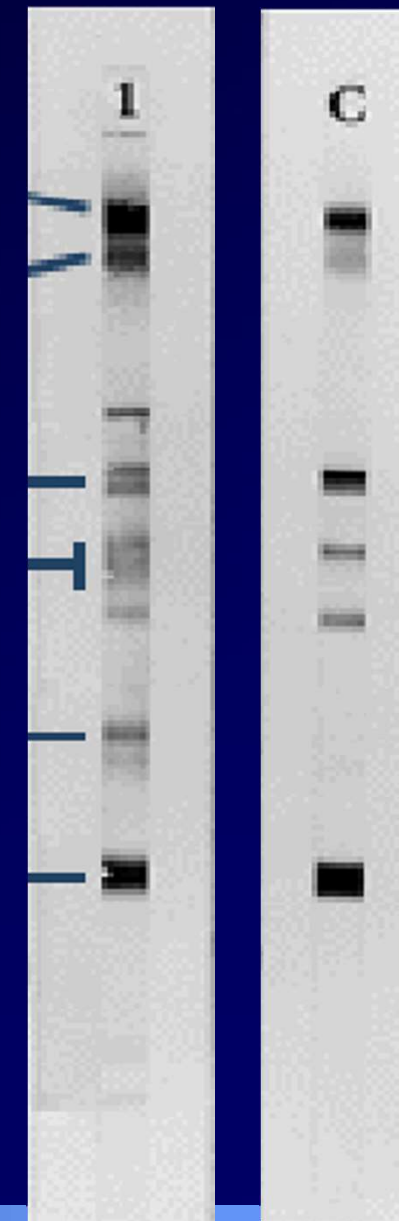
siero contenente Ab anti Ig umane
marcati con traccianti enzimatici
 $\text{Ab} + \text{Ag} = 1^\circ \text{ immunocomplesso}$
 $+ \text{Ab}^{\text{enzima}} = 2^\circ \text{ immunocomplesso}$

Terza incubazione - rivelazione

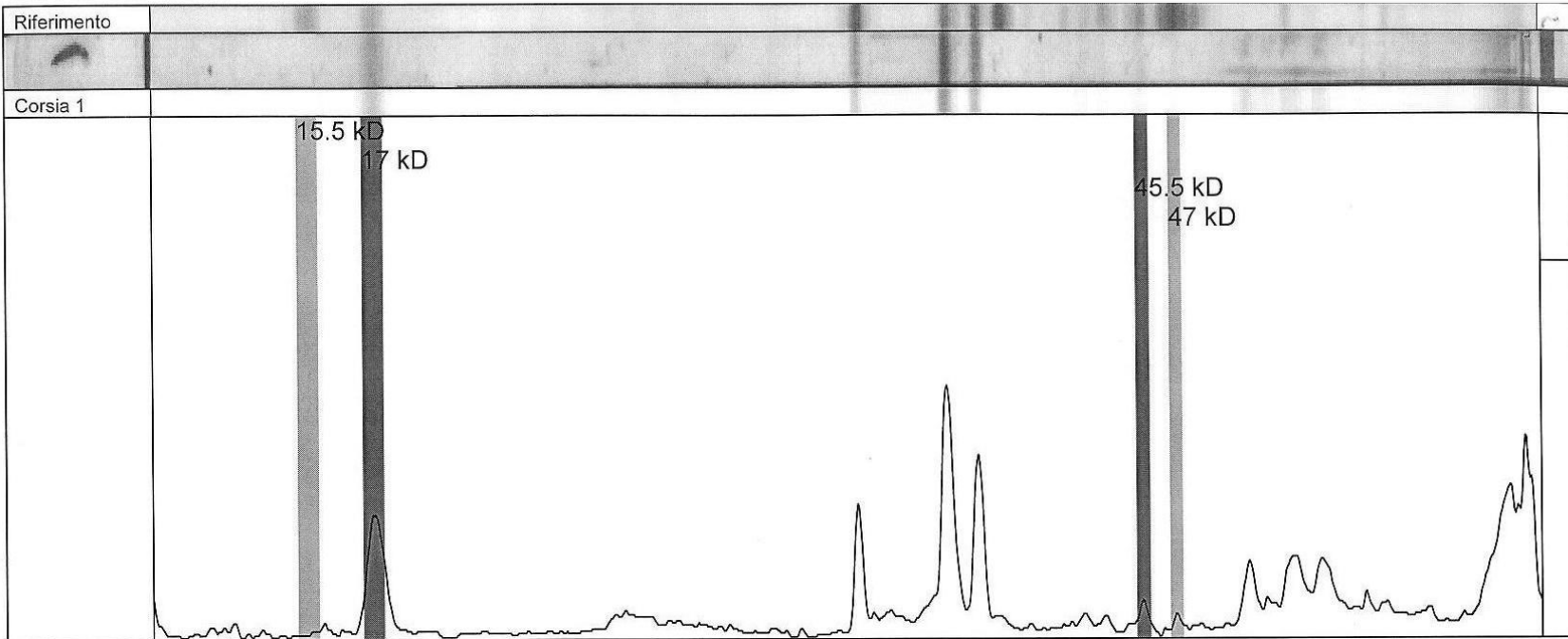
Aggiunta del substrato che reagisce
con lo specifico enzima
 $\text{Ab} + \text{Ag} = 1^\circ \text{ immunocomplesso}$
 $+ \text{Ab}^{\text{enzima}} = 2^\circ \text{ immunocomplesso}$

REAZIONE COLORIMETRICA

Immunoblot



Gi 17. Giu 2004 Paziente:



positivo - consultare l'aiuto in linea.

Antigene: Treponema IgM

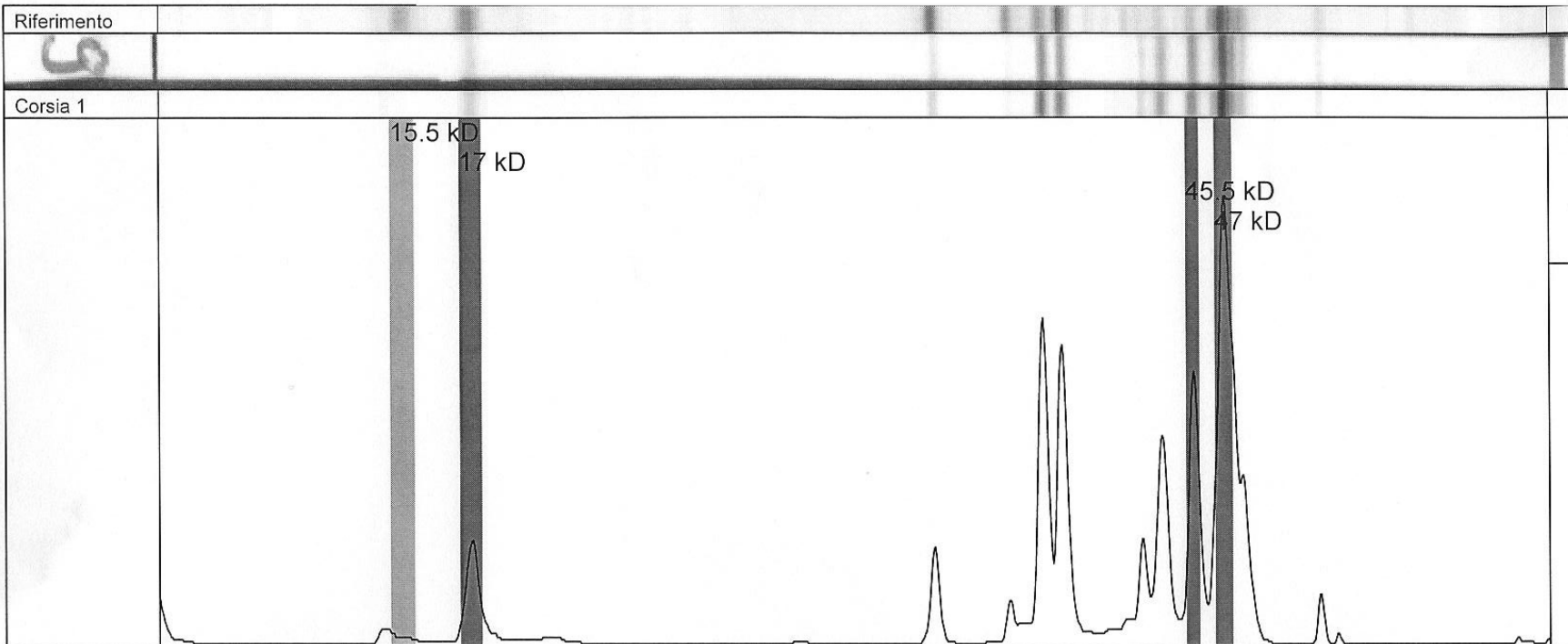
POSITIVO banda specifica ++

Cutoff: 10%

Livello dell'immunodosaggio: 96%

17 kD	45.5 kD
53% ++	10% (+)

Me 10. Dic 2003 Paziente:



positivo - consultare l'aiuto in linea.

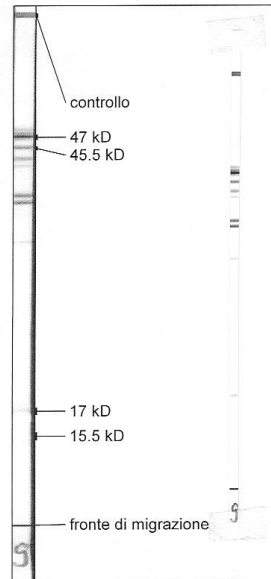
Cutoff: 20%

Antigene: Treponema IgG

Livello dell'immunodosaggio: 77%

POSITIVO PRESENZA 3 BANDE SPECIFICHE(17 KD(+)-47KD(+++)-45.5KD(++))

17 kD	45.5 kD	47 kD
34% +	90% ++	100% +++



Data: Me 10. Dic 2003

Antigene: Treponema

Anticorpo: IgG

Frazioni proteiche positive:

17 kD:	34 %	+
45.5 kD:	90 %	++
47 kD:	100 %	+++

Legenda:
0 % - 19 % = negativo
20 % - 24 % = (+) indeterminato
25 % - 49 % = + debolmente positivo
50 % - 99 % = ++ positivo
100 % = +++ fortemente positivo

RISULTATO:

COMMENTI:

POSITIVO PRESENZA 3
BANDE SPECIFICHE(17
KD(+)-47KD(+++)-45.5KD(++)

firma

Western blot *Treponema pallidum* IgG – IgM – IgA

	BANDE PRESENTI			
FASE malattia	47 KD	45,5 KD	17 KD	15,5 KD
Primitiva	+	+++	-	+++
Secondaria	++	+++	+	+++
Latente precoce	++	+++	+	+++
Latente tardiva	-	+++	-	+++
Tardiva	-	+++	-	+++

Western blot *Treponema pallidum*

IgG

- ❑ Risultato positivo: presenza di 2 o più bande
- ❑ Risultato indefinito: presenza di una sola banda
- ❑ Risultato negativo: assenza di bande

La valenza delle 4 proteine è diversa. La p17 e la p47 hanno valenza maggiore per cui nei casi in cui sono presenti solo 2 bande è possibile distinguere tra campioni debolmente positivi (p15,5 e p45,5) e campioni positivi (p17 e p47)

Western blot *Treponema pallidum* *IgM e IgA*

- ❖ Risultato positivo: presenza di una banda
- ❖ Risultato negativo: assenza di bande

Limiti del metodo: il test va interpretato in relazione al quadro clinico e ai dati diagnostici ed epidemiologici.

La ricerca di IgM con Western blot è indicata soprattutto in caso di sospetta sifilide congenita.

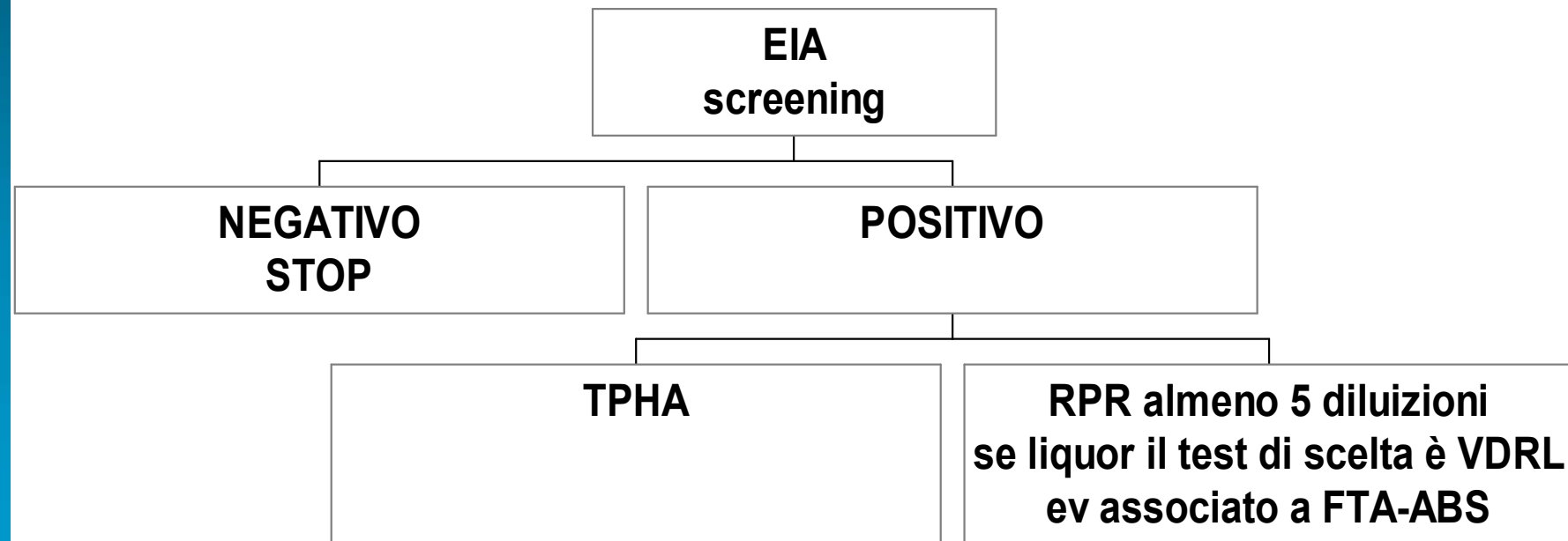
Interpretazione dei tests sierologici - Limiti

- Area geografica-malattie correlate alla sifilide dovute a treponemi diversi da *T.pallidum*
- Capacità del paziente di produrre anticorpi
- Stadio della malattia
- Antibiotico-terapia precedente
- Modalità con cui vengono condotti gli esami sierologici
- Falsi biologici legati a particolari condizioni

Sierologia LUE

Schema operativo ADULTO/ GRAVIDA

Accertamento dello stadio della malattia



Sierologia LUE

Schema operativo ADULTO/ GRAVIDA

Follow-up terapia

**RPR
TITOLATO**

**A 3- 6 -12
mesi dall'inizio della terapia**

LUE sospetta infezione connatale

SU sangue neonato

- Test di screening EIA POSITIVO
- TPHA e RPR quantitativi
- Immunoblot IgM

Su sangue materno

- Test di screening EIA POSITIVO
- TPHA e RPR quantitativi

La presenza di IgM specifiche nel sangue del neonato o un titolo del TPHA o RPR \geq a 4 diluizioni nel neonato rispetto alla madre indicano infezione probabile

Correlazione tra stadio malattia e risultati dei test

	EIA	TPHA	RPR
Infezione sospetta	Positivo o Border Line	Dubbio	Positivo o dubbio
Infezione primaria/secondaria	Positivo o Border Line	Positivo (titolo medio-medio basso)	Positivo o dubbio
Infezione latente	Positivo	Positivo (titolo medio/alto)	Negativo (limiti metodica)
Infezione terziaria	Positivo	Positivo (titolo alto)	Positivo o dubbio (limiti metodica)
Infezione pregressa trattata	Positivo o Border Line	Positivo (titolo medio-basso)	Negativo (dopo 1-2 anni dal trattamento)

Cinetica degli anticorpi

