

## PROBLEME CURENTE ȘI CONTROVERSE ÎN DIAGNOSTICUL SEROLOGIC AL SIFILISULUI

Oleg Tabuica

Catedra Dermatovenerologie, USMF "Nicolae Testemianu"

### Summary

#### *The current problem and controversies in serological diagnosis of syphilis*

The paper is devoted to current problems and controversies of syphilis diagnosis. Serological tests for syphilis continue to play a major role in the diagnosis and management of the disease and often are the only practical means of diagnosis. The problem acquires special importance in consideration of the high rate of syphilis morbidity in the Republic of Moldova, associated with an enhanced percentage of latent syphilis. Serologic tests provide only indirect evidence of syphilis and may be reactive in the absence of clinical, historical or epidemiologic evidence of syphilis, and are, therefore, very important for the laboratory diagnosis to be as reliable as possible. The study's results suggest that immunoblotting may be considered the most specific treponemal test and must be used as an alternative to other tests - TPHA (Treponema pallidum haemagglutination assay), EIA (Enzyme immunoassay)- when these tests give equivocal or conflicting results.

### Rezumat

Articolul este dedicat problemelor actuale și controverselor în diagnosticul serologic al sifilisului. Reacțiile serologice joacă un rol primordial în diagnosticul sifilisului și, frecvent, sunt unicul criteriu diagnostic. Această întrebare este deosebit de actuală pentru Republica Moldova, unde pe fundalul unei morbidități sporite (69-71 cazuri la 1000000 populație) are loc o redistribuire a formelor clinice de sifilis, sifilisul latent recent constituind 50-55% din toate cazurile înregistrate. Testele treponemice sau specifice trebuie să posede o specificitate și sensibilitate maximale pentru confirmarea testelor netreponemice pozitive și pentru excluderea reacțiilor serologice fals pozitive. Rezultatele studiului au demonstrat că testul imunoblot posedă cea mai înaltă sensibilitate și specificitate și poate fi utilizat în cazurile când alte teste specifice (TPHA și ELISA) dau rezultate echivoce sau fals pozitive.

### Actualitatea

Sifilisul rămâne în continuare o problemă a sănătății publice cauzată de o morbiditate înaltă, tratament dificil și diagnostic problematic (2,7). În ultimele decenii în toată lumea se remarcă o creștere substanțială a sifilisului latent grație patomorfozei infecției sifilitice (2, 7, 11). În Republica Moldova pe fundalul unei morbidități sporite (69-71 cazuri la 1000000 populație) are loc o redistribuire a formelor clinice de sifilis, sifilisul latent recent (SLR) constituind 50-55% din toate cazurile înregistrate. Existența acestei faze clinice silențioase în decursul maladiei, când diagnosticul este posibil în special prin teste serologice, crează o dificultate majoră în depistarea bolii. În plus diagnosticul sifilisului poate fi întârziat sau complicat, pentru că simptomele sale sunt similare cu diverse maladii. Sifilisul este cunoscut și sub denumirea de "marele imitator".

Reeșind din aceste considerente, pentru menținerea controlului asupra morbidității prin sifilis este necesar un diagnostic precis și rapid al acestei maladii. În pofida succeselor diagnosticului de laborator, managementul pacienților cu sifilis latent rămâne dificil (6,7,11,17).

În legătură cu particularitățile evolutiv-clinice ale infecției, modificările complexe imunologice în organismul bolnavului, rămâne actuală atitudinea complexă de diagnostic, ce presupune utilizarea paralelă a mai multor metode serologice.

Testele diagnostice utilizate în diagnosticul sifilisului se împart în două categorii:

1. testele nontreponemice (pentru screening) – PMP (reacția de microprecipitare), VDRL (the Venereal Disease Research Laboratory), RPR (rapid plasma reagin), TRUST (Toluidin Red Unheated Serum Test)
2. testele treponemice (de confirmare) sunt: RIT (se utilizează rar), FTA abs (fluorescent treponemal antibody absorption), TPHA (Treponema pallidum hemagglutination assay), TPPA (Treponema pallidum particle agglutination), ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay), Western Blot, imunocromatografia.

Diagnosticul serologic al sifilisului poate crea importante dificultăți în interpretarea rezultatelor obținute din următoarele motive: infecția sifilitică poate evolua mult timp în formă latentă, serologia poate fi negativă când infecția progresează, tratamentul corect administrat vindecă leziunile cutanate iar serologia poate rămâne pozitivă pentru mult timp sau toată viața, copiii pot căpăta anticorpi materni (care dau serologie pozitivă) fără a fi infectați. Apariția și dispariția anticorpilor nu neapărat corelează cu apariția și dispariția agentului patogen (1,4,6). Pe de altă parte, diagnosticul precoce al infecției depinde de sensibilitatea metodelor utilizate (1, 3, 6, 8, 11). Testele nontreponemice în sifilisul latent tardiv și în cel terțiar sunt fals negative în 30-33% din cazuri (1, 3, 6, 12). În sifilisul secundar manifest 2% dintre pacienți generează fenomenul de prozonă (reacții fals negative cauzate de excesul anticorpilor în serul nediluat) (1, 2, 4, 6, 11). Reacțiile serologice cu teste nontreponemice pot fi fals negative la pacienții cu sifilis malign, imunodeficiențe primitive sau secundare (SIDA etc.). Un alt moment în diagnosticul serologic al sifilisului îl constituie faptul că sensibilitatea testelor diagnostice scade odată cu avansarea maladiei. Testele serologice pot fi pozitive în absența datelor epidemiologice, anamnestice și clinice ale sifilisului. O problemă în diagnosticul serologic al sifilisului latent este diferențierea cu reacțiile serologice fals pozitive care pot fi prezente la 1-2% din populația generală (2, 3, 6, 12, 17). Incidența RSFP crește substanțial la unele categorii de pacienți: donatori de sânge - 2,5%, gravide - 28%, lupusul eritematos - 25%, vârstnici peste 75 de ani - 10%, utilizatori de droguri - 15%, diverse infecții (tuberculoză, HIV, lepră, malarie, boala Lyme), neoplasme - 8%, pacienți cu ITS - 3,5% (2, 5, 8, 12, 17). În majoritatea cazurilor ele se întâlnesc în timpul efectuării testelor non-treponemice la sifilis, frecvența lor fiind apreciată între 5 și 15% din cazuri (2, 11, 12, 17). Problema se complică prin faptul că și testele treponemice de confirmare nu au specificitate absolută și pot genera reacții fals pozitive în 1-3% cazuri (5, 8, 14, 15, 17). Diferențierea SLR de RSFP este o chestiune importantă și responsabilă, de rezolvarea promptă a cărei depinde efectuarea măsurilor anti-epidemice adecvate și indicarea tratamentului necesar. Există studii care arată că în 20-25% de cazuri la pacienții cu reacții serologice discrepante ulterior se confirmă sifilis latent tardiv sau cu o durată nederminată (13).

O dilemă diagnostică poate constitui sifilisul congenital, care frecvent este identificat în forma latentă. Diagnosticul sifilisului la făt este mult îngreunat de: pasajul transplacentar al IgG antitreponemice ce duce la serologie pozitivă în absența infecției; posibilitatea infecției materne recente ce elucidează testele prenatale; testele nontreponemice pot fi fals negative în sifilisul congenital tardiv. Anticorpii din cadrul RSFP pot penetra placentă și persista la nou-născuți câteva săptămâni după naștere, ceea ce crează dificultăți în diferențierea cu sifilisul congenital. Diagnosticul se poate stabili prin retestarea serologică a copilului la 6 luni; utilizarea testelor Captia-M sau 19S IgM FTA-ABS, IgM immunoblot dar cel mai frecvent se interpretează contextul clinic (evidențierea infecției materne, eficacitatea tratamentului la mamă, comparația titrurilor materne și fetale) și se administrează tratament în toate cazurile cu risc fetal.

Metodele standarte de tratament al sifilisului nu întotdeauna conduc la negativarea reacțiilor serologice nontreponemice. Corelația directă între prezența infecției și serologia

pozitivă rămâne incertă. Managementul pacienților cu serorezistență este dificil și controversat (9, 10, 11).

Aceste probleme în cadrul diagnosticului serologic pot fi soluționate doar printr-o abordare complexă a serologiei sifilisului, care în diverse situații clinice necesită utilizarea diferitelor teste de laborator pentru confirmarea sau excluderea diagnosticului.

Una din cele mai performante metode de diagnostic în serologia sifilisului este reacția immunoblot (Western blot). În cadrul reacției se utilizează antigenele *Tr. pallidum* cu imunogenitate maximală, având masa moleculară de 15, 17, 45 și 47 kDa, ce permit detectarea anticorpilor în serul bolnavilor în toate fazele maladiei și excluderea seropozitivității nespecifice (4, 5, 8, 12, 14, 15).

### Scopul

Aprecierea sensibilității și specificității reacției immunoblot în sifilisul latent, determinarea valorii diagnostice în diferențierea cu reacțiile serologice fals pozitive.

### Materiale și metode

În studiu au fost incluși 128 pacienți cu sifilis latent, 81 pacienți cu reacții serologice fals pozitive pentru sifilis, 81 pacienți cu sifilis manifest (lotul de control) și 101 pacienți dermatologici (lotul de control).

Pentru aprecierea eficacității tratamentului s-au studiat 31 pacienți cu sifilis serorezistent.

În studiu au fost aplicate testele diagnostice: RMP (o variantă a VDRL), TPHA, ELISA, WESTERN BLOT (IMMUNOBLLOT)

La prima etapă am verificat **sensibilitatea** reacției immunoblot în comparație cu reacțiile serologice clasice în sifilisul manifest când avem o corelație evidentă între datele clinice și cele de laborator și nivelul anticorpilor este foarte înalt, iar sensibilitatea reacțiilor serologice clasice se apropie de 100 % (tab.1).

**Tabel 1. Rezultatele testelor serologice de laborator la pacienții cu sifilis manifest (rezultate pozitive)**

Forma sifilisului manifest (81 cazuri)	RMP	RW	ELISA	TPHA	Imunoblot
Sifilis primar (20 pacienți)	20	20	20	18	20
	100%	100%	100%	90%	100%
Sifilis secundar (61 pacienți)	61	61	61	61	61
	100%	100%	100%	100%	100%

Sensibilitatea diagnostică a fost calculată după formula:

$$SE = \frac{RP}{RP+FN} \cdot 100,$$

unde SE - reprezintă sensibilitatea diagnostică, iar RP - rezultate veridic pozitive (în consensus și acord cu rezultatele altor reacții serologice și datelor clinico-anamnestice, evaluării contactului sexual), FN –rezultatele fals negative.

Datele din acest tabel demonstrează o sensibilitate de 100% a reacției immunoblot, fiind în consens cu rezultatele testelor serologice clasice (concordanță de 100% cu RMP, RW și ELISA și 90 % cu TPHA).

Pentru a aprecia **specificitatea** testelor de laborator utilizate în diagnosticul diferențiat între pacienții cu SLR și RSFP, am testat serologic 128 pacienți din lotul de control (pacienți dermatologici, adică apriori fără sifilis) (tab.2).

**Tab. 2 Rezultatele testelor treponemice și netreponemice la lotul de control (128 pacienți dermatologici) (rezultate pozitive)**

Testele serologice	RMP	RW	TPHA	ELISA	Immunoblot
Slab pozitive	5 (3,90±1.71%)	4 (3,1±1.54%)	1(0,78±0.78%)	1(0,78±0.78%)	0
pozitive	4 (3,12±1.54%)	2(1,56±1.09)	1(0,78±0.78%)	3 (2,34±1.3%)	0
Brusc pozitive	1 (0,78±0.78%)	1(0,78±0.7%)	0	0	0
Nedeterminate	0	0	0	0	0

Specificitatea testelor diagnostice a fost apreciată după formula:

$$S = \frac{RN}{RN+FP} \times 100, \text{ unde}$$

S –specificitatea, RN –rezultatele negative, FP- rezultatele fals pozitive.

Rezultatele din acest tabel evocă clare diferențe de specificitate a testelor serologice aplicate în studiu; specificitatea de 100% (128/128) al reacției Immunoblot, pe când testele TPHA și ELISA au manifestat specificitatea de 98,4% (2/128) și 96,8% (4/128) respectiv. Nivelul cel mai jos de specificitate au dat dovadă RMP (92,2%) și RW (94,5%) .

Unul din markerii activității procesului infecțios, deci și a prezenței agentului patogen în macroorganism este detectarea imunoglobulinelor de clasa M în serul bolnavilor. Literarura de specialitate indică că imunoglobulinele M pot persista la bolnavii de sifilis după tratament timp de 12-18 luni (6, 9, 11). La momentul actual sunt date limitate, controversate despre cinetica imunoglobulinelor M în sifilis atât în evoluția infecției sifilitice, cât și dinamica lor postterapeutică. In opinia a mai multor cercetători aprecierea IgM denotă persistența Trep. pall. active în organismul bolnavului (6,9).

Bolnavii cu sifilis serorezistent (pacienții la care nu are loc micșorarea titrelor testelor non-trponemice de cel puțin de 4 ori după un an de la finisarea tratamentului) din studiul nostru au fost supuși testării serologice prin testul ELISA IgM și reacția immunoblot IgM (tab.3).

**Tab.3 Rezultatele testelor serologice la pacienții cu serorezistență incluși în studiu**

Testul serologic	ELISA IgM	Immunoblot IgM
Pacientii cu sifilis serorezistent (n=31)	8 (25,8%)	13 (41,93%)

După cum se observă din tabel, la 41,93% din pacienții cu sifilis serorezistent au fost determinate IgM, fapt care demonstrează persistența Trep. pallide. Sensibilitatea reacției

immunoblot s-a dovedit a fi superioară testului ELISA (41,93% teste pozitive față de 25,8%). După tratamentul suplimentar administrat la pacienți s-a constatat o dinamică pozitivă a titrelor reacțiilor non-treponemice.

### Concluzii

Reacția immunoblot posedă un înalt potențial ca test de referință și poate fi recomandat în calitate de test suplimentar de confirmare aplicat în situațiile clinice neclare, echivoce influențând managementul diagnostic și conduita terapeutică a pacienților cu sifilis. Aplicarea în practică a testului imunoblot va optimiza diagnosticul serologic al sifilisului.

Reacția immunoblot cu detectarea IgM poate servi un suport adăugător în evaluarea eficacității tratamentului și poate fi recomandată drept o metodă de monitorizare postterapeutică în situațiile clinice dificile și ar putea servi ca un criteriu suplimentar în luarea deciziei terapeutice sau a conduitei ulterioare la bolnavii cu sifilis serorezistent.

### Bibliografie

1. Barrett L., Lukehart Sh., Schmidt B. Serodiagnosis of sifilis. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, 41 (8): 36685.
2. Brown DL, Frank JE. Diagnosis and management of syphilis. *Am Fam Physician.* 2003; 68: 283-90.
3. Castro R., Prieto E.S., Santo I., et al. Evaluation of an enzyme immunoassay technique for detection of antibodies against *Treponema pallidum*. *J Clin Microbiol* **2003**; 41:250-3.
4. Cole MJ, Perry RK, Parry V. Comparative evaluation of 15 serological assays for the detection of syphilis infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, **2007**; 26:705–713
5. Ebel A., Vanneste L., Cardinales M. Validation of INNO-LIA Syphilis Kit as a confirmatory assay for *Trep. Pallidum*. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, 9(2): 215-219.
6. Egglestone SI, Turner AJ. Working Group. Serological diagnosis of syphilis. *Communicable Disease Public Health.* 2000; 3:158-162.
7. Fenton, K.A., Breban, R., Vardavas, R., Okano J.T., Martin, T., Aral, S., Blower, S. Infectious syphilis in high-income settings in the 21<sup>st</sup> century. *Lancet Infect Dis.*, (2008), **8**: 244–253
8. Hagedorn.H , Bosschere K. Evaluation of INNO-UA syphilis assay as a confirmatory test of syphilis. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, 40(3): 973-978.
9. Lin LR, Tong ML, Fu ZG, Dan B, Zheng WH, Zhang CG, Yang TC, Zhang ZY. Evaluation of a colloidal gold immunochromatography assay in the detection of *Tr. pallidum* specific IgM antibody in syphilis serofast reaction patients: a serologic marker for the relapse and infection of syphilis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011 May;70(1):10-6.
10. Pope S., Fears V., Captia M. Syphilis IgM an enzyme immunoassay for treponemal antibodies. *A manual test of syphilis (9<sup>th</sup> edition)*, 1998, p. 289-303.
11. Ratnam S. The laboratory diagnosis of syphilis. *Canad. J. Infect. Dis. Med. Microb.*, 2005, Jan (16): 45-51.
12. Sambri V., Marangoni A., Ceverini R. Western immunoblotting with five *Tr.pallidum* recombinant antigens for serologic diagnosis of sifilis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2001, 8 (3): 534-539.
13. Woznicova V, Valisova Z. Performance of CAPTIA SelectSyph-G enzyme-linked immunosorbent assay in syphilis testing of a high-risk population: analysis of discordant results. *J Clin Microbiol.* 2007 Jan;45 (6);1794-7.
14. Кубанова А.А. Опыт использования метода иммуноблоттинга для диагностики сифилиса / Кубанова А.А., Фриго Н.В., Ротанов С.В., Нестеренко В.Г., Ловенецкий А.Н., Дударева Л.А. // Вестник дерматологии и венерологии. – 2006. - №2. – С. 4-11.

15. Чернова Т., Гордеева Г. Линейный иммуноблот – новый диагностический тест для серодиагностики сифилиса. Клинич. дерматол. и венерология. 2005, 21-24
16. Чернова Т.А. Гордеева Г.В., Прокопьева А.Е. Трудности лабораторной диагностики сифилиса в современных условиях / Т.А. Чернова, // Клиническая дерматология и венерология. 2006. - №3. - С. 15-16.
17. Фриго Н.В. Современные аспекты дифференциальной диагностики истинной и ложной серопозитивности серологических тестов на сифилис // Вестн. дерматол. венерол. 2004. - № 2. - С.51-54.

## **BOALA LYME. ASPECTE CLINICO-EVOLUTIVE ȘI SOCIALE**

**Irina Șchiopu**

(Cond. șt., Dr. în medicină, Conf. universitar Grigore Morcov)

### **Summary**

#### *Lyme disease – clinical and social aspects*

This article represents a retrospective research of 23 cases (men-2, women-21) of Lyme disease, that were admitted and assisted at the Dermatovenerology Clinic of USMF "N. Testemițanu", localized in the Public Medico-Sanitary Institution DDVR. A prevalence of females was determined, with age between 5 and 68 years, from rural regions, which appeared after follicle mite's bite, with the transmission of *Borrelia spirochete*. The great value of this work is the correlative estimation of Lyme disease severity index depending on cutaneous and extracutaneous manifestations which allow a better assessment of clinical admittance criteria of these patients in respective medical institutions.

### **Rezumat**

Acest articol reprezintă un studiu retrospectiv a 23 cazuri (barbați-2, femei-21) de Boala Lyme, spitalizați și asistați în Clinica Dermatovenerologie a USMF "Nicolae Testemițanu", amplasată în incinta Instituției Medico-Sanitare Publice DDVR. S-a constatat o prevalență a femeilor cu vârsta cuprinsă între 5 și 68 ani, provenite din mediul rural, apărută în urma înțepăturii de capușă, cu transmiterea spirochetei *Borrelia*. O importanță majoră are estimarea corelativă a indicilor de severitate a Bolii Lyme în dependență de manifestările cutanate și cele extracutanate, care și permite aprecierea mai obiectivă a criteriilor de internare al acestor bolnavi în comisiile medicale de profil.

### **Generalități**

Boala Lyme este o maladie infecțioasă cu o evoluție cronică recidivantă, indusă de microorganisme din genul *Borrelia*, transmisă prin înțepături de capușă, cu afectarea pielii, articulațiilor, sistemului nervos central (SNC), organelor interne. Pe tegumente se manifestă prin prezența unor macule eritemo-edematoase de formă rotundă-ovalară cu marginile bine delimitate, cu centrul palid, iar la periferie se observa un halou eritematos evident.

În 1909 suedezul Afzelius numește boala "eritem migrator", apoi în 1912-1923, în urma studiilor efectuate de către austriacul Lipschutz, a fost denumită "eritem cronic migrator". În 1975 în localitatea Lyme din SUA au fost înregistrate cazuri de eritem cronic migrator, de unde și a primit denumirea Boala Lyme.

Agentul patogen care cauzează boala este *Borrelia*, face parte din ordinul *Spirochaetales*, familia *Spirochaetaceae*, genul *Borrelia* și a fost izolată în 1982 din intestinul capușei *Ixodes dammini* de către Dr. Willy Burgdorfer, al cărui nume îl poartă. Studiul diferențelor antigenice dintre tulpinile izolate în America și Europa a permis recunoașterea implicării în patologia