

Determinazioni anticorpali nella diagnosi di patologie infettive

Diagnosi di laboratorio della sifilide: patologia antica, tecnologie moderne (Rassegna)

Antonella Marangoni, Silvia Accardo, Francesca Cavrini, Elisa Storni, Vittorio Sambri

Sezione di Microbiologia, DMCSS, Alma Mater Studiorum, Università degli Studi, Policlinico S.Orsola-Malpighi, Bologna

La sifilide (o lue) è una malattia venerea cronica che evolve a stadi, coinvolgendo numerosi organi e sistemi. Il periodo di incubazione varia da 10 a 90 giorni, con una media di circa 3 settimane. L'agente eziologico è rappresentato da *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, un batterio Gram negativo, appartenente all'ordine *Spirochaetales*, mobile, microaerofilo, non coltivabile *in vitro*. Le fonti possibili di infezione sono varie: il sifiloma primario, le lesioni papulo-erosive, il sangue (contagio per trasfusione), lo sperma (in caso di epididimite), la saliva e le secrezioni vaginali. La trasmissione per via orizzontale più comune è mediante il rapporto sessuale (95% dei casi) e la penetrazione del batterio nell'organismo ospite avviene per via transcutanea/mucosale o per via parenterale. E' possibile anche la trasmissione verticale, ovvero dalla madre al feto, durante la gravidanza o, più raramente, al momento del parto.

MANIFESTAZIONI CLINICHE

L'evoluzione della sifilide si divide in due stadi: sifilide precoce (che comprende le forme di sifilide primaria, secondaria e latente precoce) e sifilide tardiva (che comprende le forme di sifilide latente tardiva e sifilide terziaria, distinta a sua volta in cardiovascolare e neurologica)¹.

La lue primaria è caratterizzata dalla presenza di una papula non dolente nella sede di inoculo (sifiloma), la quale può successivamente trasformarsi in nodulo ed andare incontro ad una lesione ulcerativa e ad una adenopatia loco-regionale non dolente e non suppurativa. Il sifiloma tipicamente si autorisolve, anche in assenza di terapia, in 3-12 settimane. La sifilide primaria non trattata evolve nella forma secondaria in 4-10 settimane per disseminazione ematogena e linfatica dei treponemi. Le manifestazioni cliniche possono essere aspecifiche e simil-influenzali (febbre, malessere, artralgie, linfadenopatia generalizzata non dolente, anemia, astenia), cutanee (rash maculopapulare, *condyloma lata* e placche mucose) o sistemiche (meningite, epatite, infiammazione faringo-tonsillare, ecc.). Alla sifilide secondaria fa seguito un periodo di latenza, in cui la sierologia del paziente resta positiva, ma non sono presenti manifestazioni cliniche. Si parla di sifilide latente precoce, se l'infezione dura da meno di un anno, e di sifilide latente tardiva, se la durata dell'infezione è superiore ad un anno.

La sifilide terziaria si sviluppa dopo 10-30 anni dall'infezione, nel 25% circa dei soggetti non trattati, dando origine ad endoarteriti obliteranti dei piccoli vasi con localizzazione cutanea (lesioni gommose) o vascolare. La sifilide cardiovascolare si manifesta più frequentemente con aortiti, insufficienza aortica, aneurisma aortico, angina, stenosi corona-

ria. La neurosifilide è data dall'infezione da parte dei treponemi del liquido cerebrospinale e può presentarsi con quadri alquanto diversi: si va da forme quiescenti, a forme di meningite asettiche, fino ad arrivare a forme meningovascolari, paresi, tabe dorsale e demielinizzazione delle vie nervose. La sifilide congenita viene trasmessa dalla madre per via transplacentare e perinatale durante la gravidanza o al momento del parto per contatto del neonato con lesioni genitali materne. Lo stadio della malattia materna e l'epoca di gestazione in cui si verifica la trasmissione del batterio sono i due fattori più importanti nel determinare il quadro clinico neonatale².

EPIDEMIOLOGIA

Nei paesi in via di sviluppo la sifilide è un vero e proprio problema di salute pubblica: in Africa si registrano 4 milioni di casi/anno. Più in generale, nel 1999 le stime del WHO riportavano 12 milioni di nuovi casi l'anno di sifilide di cui il 90% circa a carico di paesi in via di sviluppo³. Nonostante i tassi di infezione siano piuttosto bassi nei paesi industrializzati, vari focolai epidemici si sono registrati in diverse città europee e statunitensi, principalmente a carico di omosessuali maschi⁴. L'Italia è un paese a bassa endemia con focolai epidemici (l'Istituto Superiore di Sanità, ISS ha contato 150 casi di sifilide precoce nel 1995; la sifilide rappresenta il 12% di tutte le malattie a trasmissione sessuale notificate). E' da considerare comunque che in questi ultimi anni c'è stato un aumento del numero di infezioni notificate all'ISS, da mettere in relazione a vari fattori, tra cui l'immigrazione di persone provenienti da paesi con focolai epidemici di sifilide. Basti pensare, ad esempio, al focolaio epidemico che si è registrato nel 1996 nei paesi dell'ex-URSS, con un tasso d'incidenza di lue di 263 casi ogni 100.000 abitanti, ben più elevato di quello dell'epoca pre-penicillina, con valori variabili attorno ai 70 casi ogni 100.000 abitanti¹. Come conseguenza di ciò, è utile ricordare che in Russia l'incidenza della sifilide congenita è aumentata di 26 volte dal 1991 al 1999⁵.

ESAMI MICROBIOLOGICI

A partire dalla scoperta da parte di Schaudinn e Hoffmann nel 1905 di *T. pallidum* come agente eziologico della lue, le metodiche diagnostiche per questa infezione si sono costantemente evolute, se pur con alcuni limiti, dovuti alla sua difficile propagazione (non è coltivabile *in vitro*, ma è possibile mantenerlo in vita solo tramite passaggi nei testicoli del coniglio).

Determinazione anticorpali nella diagnosi di patologie infettive

Gli esami microbiologici possibili sono l'individuazione diretta del patogeno e le indagini sierologiche⁶.

Il metodo diretto più utilizzato per mettere in evidenza i treponemi nei materiali biologici è l'indagine al microscopio a campo oscuro, data la velocità dell'esecuzione e il costo ridotto. Una positività al test microscopico è indice certo di infezione; la sensibilità di questo metodo però, anche nei centri di riferimento, non va oltre il 70-80%. Questo a causa della difficoltà di evidenziare i batteri nel preparato microscopico per la rapida perdita di motilità dei treponemi dovuta alla loro scarsa resistenza all'aria e/o all'esposizione a sostanze applicate sulla lesione (disinfettanti o pomate) e del possibile mascheramento dei treponemi da parte di detriti cellulari o emazie⁶. Inoltre, la carica minima che si riesce ad identificare con questa metodica è di circa 10^5 batteri/mL. Il test che riesce ad identificare il minor numero di batteri possibile è il RIT (*Rabbit Infectivity Test*), che prevede l'inoculo nel coniglio del materiale proveniente dalle lesioni sospette. Tale metodica raggiunge un livello massimo di sensibilità (100% di sensibilità con solo 25 batteri inoculati), ma richiede tempi molto lunghi per la risposta e costi elevati⁶. Infatti, il coniglio viene inoculato con il materiale in cui si sospetta la presenza dei batteri e viene monitorato, tramite esami sierologici, settimanalmente per un tempo massimo di 90 giorni. Appena si evidenzia una sieroconversione, l'animale viene sacrificato e viene prelevato tessuto linfonodale da inoculare in un nuovo animale per avere la conferma di positività e anche a questo nuovo animale verrà fatto un prelievo di sangue settimanalmente al fine di verificare un movimento anticorpale specifico. Viceversa, se il coniglio di partenza non mostra sieroconversione, alla scadenza dei 90 giorni, verrà catalogato come non-reattivo ed sarà quindi esclusa la presenza di treponemi nel materiale inoculato nell'animale. Nonostante l'elevata sensibilità e specificità il RIT per questa sua estrema complessità di esecuzione viene dunque utilizzato solo in laboratori di ricerca come esame di riferimento per confrontare i risultati ottenuti con altre metodiche oggetto di studio, come, ad esempio, la PCR. Il test di PCR richiede una presenza minima variabile dai 10 ai 50 batteri, a seconda del materiale in cui vengono ricercati e a seconda del target genico che si vuole amplificare⁷. E' una metodica quindi sensibile, con costi però elevati e deve venire affidata esclusivamente a laboratori abituati ad eseguire esami diagnostici su DNA, al fine di evitare false positività.

La diagnosi microbiologica di sifilide, alla luce delle considerazioni sopra riportate, si basa principalmente sull'utilizzo di test sierologici. Questi si dividono in due categorie: test non treponemici e test treponemici. Per una diagnosi corretta, si consiglia di associare entrambe i tipi di indagini, al fine di arrivare alla definizione di un quadro completo del paziente.

I test non treponemici più utilizzati sono: VDRL (*Venereal Disease Reference Laboratory*) ed RPR (*Rapid Plasma Reagin*). Questi test dimostrano la presenza di anticorpi anti-cardiolipina; sono test poco costosi e di rapida esecuzione, utilizzabili sia come screening che nel follow-up della terapia, in quanto dopo il trattamento (gene-

ralmente entro 6 mesi, ma questo tempo è variabile anche a seconda dello stadio della lue e alla contemporanea presenza di infezione da virus HIV) si ha una negativizzazione del siero del paziente o comunque una diminuzione del titolo. I limiti dei test non treponemici sono una sensibilità non elevata (70% circa) nella sifilide primaria precoce, nella sifilide latente e nella sifilide congenita tardiva, ed una mancanza di specificità in presenza di particolari condizioni quali: infezioni virali (epatiti, mononucleosi), patologie neoplastiche, malattie autoimmuni (lupus eritematoso), gravidanza, età avanzata⁶. I risultati dei test non treponemici devono essere dunque sempre confermati da un test treponemico⁶. Pertanto nei laboratori si sta abbandonando l'utilizzo di VDRL ed RPR come test di screening, preferendo mantenere queste indagini per il monitoraggio dei pazienti.

I test treponemici più utilizzati sono: TPHA (*Treponema Pallidum Hemagglutination Assay*); EIA; WB (*Western Blot*); FTA-ABS (*Fluorescence Treponemal Antibody Absorption Test*).

Sono test sensibili, specifici, utilizzabili come screening, per l'elevata possibilità di automazione (EIA)⁸, o conferma (TPHA, WB ed FTA-ABS). La positività a questi test si mantiene per molti anni (anche per tutta la vita): non sono in grado dunque di indicare l'efficacia del trattamento terapeutico, né una possibile re-infezione. Si assiste negli ultimi anni ad un continuo miglioramento delle metodiche sopra citate, grazie anche all'uso di antigeni ricombinanti e alla standardizzazione dei principi interpretativi del WB⁹⁻¹¹.

Recentemente è stata sviluppata una metodica innovativa in chemiluminescenza (CLIA): si tratta di un metodo completamente automatizzato in cui un antigene ricombinante di *T. pallidum* coniugato con isoluminolo viene fatto aderire a particelle magnetiche: durante l'incubazione gli anticorpi anti *T. pallidum* si legano alle particelle e, dopo l'aggiunta di un reattivo per indurre la reazione chemiluminescente e cicli di lavaggio, il segnale luminoso ottenuto viene analizzato da un fotoluminometro. La metodica CLIA, in uno studio retrospettivo ha dimostrato una specificità del 99% e in uno studio prospettico una sensibilità del 98%.

Un discorso a parte merita la trattazione del significato diagnostico della risposta anticorpale di classe M (IgM) in corso di infezione luetica. Normalmente, nelle infezioni batteriche e virali, durante la fase acuta, si mette in evidenza nel siero dei pazienti una risposta primaria IgM e, solo in un secondo tempo, si trovano anticorpi di classe G (IgG). In corso di sifilide, invece, già nella fase primaria, sono evidenziabili IgG e queste superano di gran lunga la quantità di IgM circolanti¹². Pertanto, una diagnostica mirata alla ricerca di IgM è di rilevante importanza principalmente nel caso di sifilide congenita. Come è noto, infatti, gli anticorpi di classe M non sono in grado di attraversare la placenta, e un neonato infetto in utero è in grado di produrre IgM a partire dal terzo mese di gestazione: un risultato positivo per la ricerca specifica di IgM è dunque indice di infezione congenita. I risultati migliori per un'indagine sierologica degli anticorpi di classe M si possono ottenere con la metodica di WB, che è da preferirsi pertanto all'immunofluorescenza FTA-ABS^{13, 14}.

Determinazioni anticorpali nella diagnosi di patologie infettive

BIBLIOGRAFIA

1. **Singh AE, Romanowski B.** Syphilis: review with emphasis on clinical, epidemiologic, and some biologic features. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 187-209.
2. **Wicher V, Wicher K.** Pathogenesis of maternal-fetal syphilis revisited. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 354-63.
3. **Peeling RW, Mabey DCW.** Syphilis. *Nat Med* 2004; 2: 448-9.
4. **Ashton M, Sopwith W, Clark P, et al.** An outbreak no longer: factors contributing to the return of syphilis in Greater Manchester. *Sex Transm Infect* 2003; 79: 291-3.
5. **Tikhonova L, Salakhov E, Southwick K, et al.** Congenital syphilis in the Russian Federation: magnitude, determinants, and consequences. *Sex Transm Infect* 2003; 79: 106-10.
6. **Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH.** Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 1-21.
7. **Liu H, Rodes B, Chen CY, Steiner B.** New test for syphilis: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1941-6.
8. **Ebel A, Bachelart LC, Alonso JM.** Evaluation of a new competitive immunoassay (BioElisa Syphilis) for screening for *Treponema pallidum* antibodies at various stages of syphilis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 358-61.
9. **Sambri V, Marangoni A, Eyer C, et al.** Western Immunoblotting with five recombinant antigens for serologic diagnosis of syphilis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 534-9.
10. **Gerber A, Krell S, Morenz J.** Recombinant *Treponema pallidum* antigens in syphilis serology. *Immunobiology* 1997; 196: 535-49.
11. **Byrne RE, Laska S, Bell M, et al.** Evaluation of a *Treponema pallidum* Western immunoblot assay as a confirmatory test for syphilis. *J Clin Microbiol* 1992; 33: 115-22.
12. **Salazar JC, Hazlett KRO, Radolf JD.** The immune response to infection with *Treponema pallidum*, the stealth pathogen. *Microb Infect* 2002; 4: 1133-40.
13. **Lewis LL, Taber LH, Baughn RE.** Evaluation of immunoglobulin M Western Blot analysis in the diagnosis of congenital syphilis. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 296-302.
14. **CDC.** Sexually transmitted diseases treatment, Guidelines 2002. *MMWR* 2002; 51: 18-28.

Per corrispondenza:

Dott. Vittorio Sambri
Sezione di Microbiologia, DMCSS, Alma Mater Studiorum
Università degli Studi di Bologna
Policlinico S.Orsola-Malpighi
Via Massarenti 9 - 40138 Bologna
Tel: 051/4290913 - Fax: 051/307397
e-mail: vittorio.sambri@unibo.it