

DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL SIFILISULUI

Sifilisul (luesul) este o treponematoză veneriană umană caracterizată prin evoluție stadială.

28.1. DATE GENERALE

28.1.1. O minidefiniție

Treponemele sunt spirocheți relativ fini. Mobilitatea le este asigurată prin mai multe fibrile axiale periplasmice, înrulate în jurul protoplastului și inserate la extremitățile cilindrului protoplasmic prin corpi bazali conectați cu fibrile citoplasmice (microtubuli sau endoflageli). Strict anaerobi sau microaerofili sunt foarte pretențioși nutritiv. Speciile patogene nici nu pot fi cultivate pe medii artificiale.

28.1.2. Repere taxonomice și habitat

Dificultatea sau chiar imposibilitatea de a cultiva treponemele *in vitro* face dificil studiul lor pentru o clasificare satisfăcătoare. Ele constituie genul *Treponema* al familiei *Spirochaetaceae*. Interes medical prezintă:

- *Treponema pallidum*, cu trei biotipuri diferențiate numai prin caracterele clinico-epidemiologice ale bolilor determinate: biotipul *pallidum*, cauză a sifilisului, biotipul *endemicum*, cauză a sifilisului endemic (bejel), cu transmitere nonveneriană, și biotipul *pertenue*, cauză a pianului, altă treponematoză nonveneriană cu poartă de intrare cutanată.

- *T. carateum*, cauză a unei treponematoze nonveneriene numite pintă sau carate și răspândită în zona tropicală a Americii și în Oceania.

- *T. paraluisuniculi* cauzează sifilisul iepurilor. Are interes medical pentru tulpina Nichols de *T. pallidum*, sursa de antigen specific în serodiagnosticul sifilisului, se întreține în laborator pe iepuri infectați prin injectare intratesticulară. Pentru a evita confuzii, acești iepuri trebuie să fie indemni de infecția cu *T. paraluisuniculi*.

- Treponeme orale: *T. denticola* și alte specii mai puțin bine definite (*T. vincentii*, *T. scoliodontum*, *T. orale*, *T. macrodentium*), revezi partea a doua, tabelul 22.1.

- Treponeme genitale: *T. phagedenis*, *T. refringens*, *T. minutum*.

28.1.3 Factori de patogenitate

La *T. pallidum* pot fi considerați factori de patogenitate următoarele capacități:

- de aderență la receptori celulari (fibronectină) și ai matricei intercelulare (laminină și colagen);
- de eludare temporară a răspunsului imun prin mascare cu molecule plasmatică (imunoglobuline, complement) sau molecule de clasa I ale complexului HLA fixate pe membrana externă;
- depresia temporară, în primele stadii ale infecției, a răspunsului imun celular;
- răspuns autoimun al gazdei la cardiolipină (antigen comun treponemelor și tesuturilor animale — vezi mai jos), la fibronectină, laminină și colagen.

28.1.4. Receptivitatea la treponematoze

Receptivitatea la infecția cu biotipurile de *T. pallidum* este generală. Pinta afectează cu precădere rasele cu pielea de culoare închisă.

28.1.5. Principalele treponematoze

Sifilisul se transmite sexual în peste 90% din cazuri. În rest contagiul se face transplacentar (sifilisul congenital), prin obiecte foarte recent contaminate de bolnavul contagios (cca 0,01% din cazuri), transfuzie de sânge, sărut; prin neglijarea măsurilor de autoprotecție de către medici în cursul intervențiilor chirurgicale, a consultațiilor urogenitale, de către personalul de laborator la prelucrarea prelevatelor patologice.

După o incubajie de 2—6 săptămâni, boala evoluează în 3 stadii:

Sifilisul primar evoluează 4—8 săptămâni. La poarta de intrare (eroziuni tegumentare, mucoasa genitală, bucală) apare *șancrul sifilitic*, o ulcerăție bine circumscrisă, colorată roșu-jambonat, situată pe o bază infiltrativă, indurată (șancru tare), care, după cca o săptămână, se însoțește cu adenită satelită. *Leziunile sifilisului primar sunt superficiale, bogate în treponeme (contagioase) și se vindecă spontan fără cicatrice.* La sfârșitul stadiului primar reacțiile serologice se pozitivează.

Sifilisul secundar apare după 6—8 săptămâni de evoluție a șancrului tare și reprezintă faza de *generalizare bacteriemică* a infecției cu numeroase și variate leziuni metastatice: cutanate (exantem cu sifilide maculare, papulare, papuloerozive, papulocrustoase), ale mucoaselor (enantem cu sifilide eritematoase sau erozive), poliadenite, periosite, artrite, corioretinită, meningită sifilitică, nefrită. *Leziunile sifilisului secundar, generalizate, bogate în treponeme (cel mai contagios stadiu al bolii), se vindecă spontan fără cicatrice.* În lipsa tratamentului etiologic, pot fi recidivante cu manifestări predominant pe tegument și mucoase.

Răspunsul imun umoral este maximum, dar cel celular apare abia la sfârșitul stadiului secundar. După apariția răspunsului imun celular cca 25% din bolnavi se vindecă microbiologic, la alți cca 25% infecția evoluează latent până la sfârșitul vieții.

Sifilisul terțiar. Numai la cca 50% din pacienții netratați infecția se reactivează mai precoce (2—3 ani) sau mai tardiv (10—20 ani). *Treponemele* persistente în focare tisulare profunde, deși au o multiplicare limitată, produc leziuni granulomatoase distructive și localizate: gome osoase și cutanate, scleroze viscerale caracteristice sifilisului cardiovascular (anevrism și insuficiență aortică), nervos (tabesul, paralizia generală progresivă) etc.

Existența răspunsului imun celular specific în stadiul terțiar al bolii este dovedită prin pozitivarea i. d. r. cu luetină (un antigen specific al *T. pallidum*) la 100% din pacienți.

Reacțiile serologice prezintă oscilații (remisiuni și ascensiuni ale titrului de anticorpi) legate de eliberarea antigenilor din leziuni.

Sifilisul congenital determină moartea fătului, cu avort, sau un nou-născut cu leziuni sifilitice (cheratită interstițială, leziuni dentare, ale oaselor nazale, ale sistemului nervos central).

Bejelul, determinat de *T.pallidum* biotipul *endemicum*, adaptat la transmitere extragenitală, afectează cu precădere copii din zonele tropicale. Evoluează stadial cu leziuni cutanate diseminate, foarte contagioase. Leziunile viscerale sunt rare.

Pianul, determinat de *T.pallidum* biotipul *pertenue*, evoluează endemic în zone tropicale umede, subdezvoltate. Șancrul este extragenital (buză, antebraț, gambă), erupția stadiului secundar este papulo-ulcerativă, exclusiv cutanată, iar în stadiul terțiar apar numai gome.

28.2. INVESTIGAȚIA ETIOLOGICĂ A SIFILISULUI

28.2.1. Diagnosticul microbiologic

Posibilitățile diagnosticului direct al sifilisului se limitează numai la microscopie.

28.2.1.1. Prelevate patologice

■ Serozitatea exprimată prin comprimarea bazei șancrului, după decontaminarea îngrijită a leziunii prin spălare cu soluție salină izotonă, aspirată prin capilaritate în pipetă Pasteur.

■ Aspiratul prin puncția ganglionilor limfatici regionali afectați.

■ Exsudatul din elementele eruptive cutanate sau mucoase ale sifilisului secundar.

28.2.1.2. Microscopia directă

În sifilisul primar microscopia directă este unica posibilitate de diagnostic.

■ *Preparatul nativ între lamă și lamelă* examinat la microscopul cu fond întunecat. Pe câmpul negru se urmăresc treponemele strălucitoare, subțiri de 0,1—0,18 μm, cu capetele efilate, cu 6—14 spire adânci regulate și cu mișcări caracteristice (rotație, flexie, translație). Treponemele genitale comensale sunt mai groase, dar diferențierca lor este dificilă și cere experiență.

■ *Preparate colorate Giemsa*. Frotiul se fixează 10—15 minute cu alcool metilic, apoi se colorează 30 minute cu soluție Giemsa. La microscopul cu imersie se observă treponemele colorate ușor în roz-roșu.

■ *Preparate colorate prin impregnarea argentică Fontana-Tribondeau:*

— se tratează de 3 ori, câte 20—30 secunde, frotiul nefixat, cu soluție Rugge (formol 2 ml, acid acetic 1 ml, apă distilată 100 ml);

— se spală;

— se acoperă frotiul cu acid tanic soluție 5% și se încălzește 1—3 minute (fără emiterie de vapori);

— se spală cu apă distilată;

— se acoperă frotiul cu azotat de argint amoniacal soluție 5% și se încălzește un minut ca mai sus;

— se spală frotiul cu apă distilată, se usucă și se examinează la microscopul cu imersie.

Pe fondul galben al frotiului, treponemele apar colorate în negru-brun.

■ *Colorația imunofluorescentă directă* este puțin accesibilă, dar evită riscul confundării *T.pallidum* cu treponemele genitale comensale. Se tratează frotiurile cu conjugat fluorescent al anticorpilor specifici anti-*T.pallidum*. La microscopul luminescent numai treponemele sifilisului apar fluorescente, cu morfologie tipică.

28.2.2. Diagnosticul serologic

Diagnosticul serologic este posibil la sfârșitul stadiului primar al sifilisului, pe tot parcursul bolii, precum și la persoanele cu infecție latentă.

Se examinează probe de ser și, în raport cu simptomatologia, probe de lichid cefalorahidian.

Cum *T.pallidum* nu poate fi cultivată *in vitro*, pentru reacțiile serologice sunt folosite următoarele categorii de antigeni:

■ *Cardiolipina*, o haptенă lipidică prezentă în *T.pallidum* și în țesuturile animale. Se obține ca extras din cordul de bou îmbogățit cu colesterol și lecitină.

■ *Antigen proteic de grup*, comun treponemelor patogene și unor treponeme comensale cultivabile. Se obține din cultura tulpinii Reiter de *T.phagedenis*.

■ *Antigenii proteic și polizaharidic specifici biotipurilor de T.pallidum*. Se utilizează fie suspensii, fie extracte ale tulpinii Nichols de *T.pallidum* multiplicată prin injectare intratesticulară la iepuri.

Primii care pot fi depistați în evoluția bolii sunt anticorpul antitreponemici specifici (anticorpul imobilizant la 10—15 zile după apariția șancrului), urmează apoi anticorpul antiproteic de grup și în final anticorpul antilipoidici (14—25 zile de la apariția șancrului). Primii care dispar după vindecarea microbiologică a sifilisului sunt anticorpul antilipoidici: după 6—24 luni, în raport cu precocitatea tratamentului. Anticorpul antiproteic de grup și, mai ales, cei specifici sunt mult mai persistenti.

Reacții serologice cu cardiolipină, RFC și testul de floculare VDRL, depistează în serul bolnavilor anticorpul antilipoidici. Sunt cele mai accesibile și curent folosite în diagnosticul, depistarea activă a sifilisului și controlul eficienței terapiei antisifilitice, pentru că antigenul cardiolipină este relativ ieftin. Rezultatele sunt orientative. Reacții fals pozitive pasagere apar în cursul sarcinii, bolii serului, unor infecții acute bacteriene (scarlatină, pneumonii pneumococice sau cu micoplasmă, tifos exantematic, chlamidioze), virale (hepatite, gripă, varicelă, rujeolă, mononucleoză infecțioasă) sau cu protozoare (malarie etc.). Reacții fals pozitive persistente întâlnim în infecții cronice (tuberculoză, lepră), boli autoimune (colagenoze, anemie hemolitică, tiroidită Hashimoto etc.), uncori la vârstnici. Reacții fals negative pot să apară în sifilisul latent sau în cel terțiar.

Reținem:

■ La pacienți cu semne clinice sugestive, prezența anticorpilor antilipoidici confirmă diagnosticul de sifilis, dar absența lor nu îl poate infirma.

■ În absența semnelor clinice sugestive, reacțiile pozitive cu antigenul cardiolipină trebuie confirmate prin testări cu antigeni treponemici specifici.

■ Scăderea constantă a titrului anticorpilor serici antilipoidici sau dispariția lor în lichidul cefalorahidian denotă vindecarea sifilisului.

Reacțiile cu antigeni treponemici (reacția de fixare a complementului — RFC, reacția de hemaglutinare indirectă — RHAI, reacția de imunofluorescență indirectă — RIFI, reacția de imobilizare a treponemelor — RIT, ELISA, reacția de imunoaderență etc.) permit obținerea rezultatelor serologice confirmative, decisive pentru diagnosticul sifilisului.

Astfel:

- în campaniile de depistare activă a bolii se utilizează pentru fiecare ser două teste de rutină: RFC cu cardiolipină sau antigen proteic de grup și reacția de floculare VDRL;
- pentru confirmarea diagnosticului, se completează testele de rutină printr-un test cu antigen treponemic specific.

1. *Testul de floculare VDRL (Venereal Disease Research Laboratory)* poate fi efectuat în tuburi sau pe plăci din polistiren cu godeuri.

Se amestecă antigenul cardiolipinic VDRL, diluat în soluție izotonă tamponată, cu serul de cercetat încălzit 30 minute la 56°C și centrifugat pentru clarificare. Se omogenizează timp de 4 minute prin mișcare uniformă, circulară, cu 160—180 rpm. Se citește sub lupă (80X—100X). *Reacție pozitivă*: flocoane mari în lichidul limpede. *Reacție negativă*: lichidul rămâne cu turbiditatea omogenă.

2. *Reacția de fixare a complementului* (revedi partea întâi, 10.2.2.3.). Se utilizează fixarea rapidă (45 minute) la 37°C, tehnica Wassermann, sau fixarea prelungită (18—20 ore) la 4°C, tehnica Kolmer. Fixarea prelungită la rece este mai sensibilă, dar mai puțin specifică. Se efectuează reacția cu serul inactivat al bolnavului, cardiolipină și antigeni treponemici de grup sau, pentru confirmarea diagnosticului, specifici.

3. *Reacția de hemaglutinare indirectă*. Se folosesc hematii de berbec tanate sau formolate și sensibilizate cu antigen treponemic proteic specific. Înainte de reacție se absorb serurile de testat cu sorbent preparat din tulpina Reiter de *T. phagedenis* pentru îndepărtarea anticorpilor antilipoidici și antiproteici de grup. RHA1 este sensibilă, specifică și accesibilă oricărui laborator ca metodă calitativă sau cantitativă în plăci cu godeuri.

4. *Reacția de imunofluorescență indirectă*. Frotiuri din suspensia tulpinii Nichols de *T. pallidum* se tratează cu serul suspect absorbit (vezi mai sus). După spălare, se tratează frotiurile cu conjugat fluorescent antiimunoglobulină umană. Fixarea anticorpilor pe *T. pallidum* duce la atașarea și a antiimunoglobulinei umane marcate, care vizualizează treponemele în galben-verzui când se examinează frotiurile la microscopul cu fluorescență.

5. *Reacția de imobilizare a treponemelor*. Se amestecă suspensia tulpinii Nichols de *T. pallidum* în mediul Nelson-Mayer cu serul suspect inactivat și complement. Se incubează amestecul 18 ore la 37°C în anaerostat. Ulterior din fiecare amestec se efectuează preparate între lamă și lamelă, care sunt examinate la microscopul cu fond întunecat, și este stabilită proporția treponemelor imobile din totalul treponemelor observate. Treponemele imobilizate în proporția de 51—100% indică un rezultat pozitiv, 25—50% unul slab pozitiv și < 20% unul negativ.

Diagnosticul infecțiilor determinate de celelalte biotipuri de *T. pallidum* se bazează pe examenul clinic, depistarea microscopică a treponemelor în leziuni și aceleași teste ca și pentru serodiagnosticul sifilisului.

28.2.3. Biopreparate utilizate în diagnosticul de laborator al sifilisului

- Imunoconjugat fluorescent anti-*T. pallidum* pentru RIF directă.
- Antigen cardiolipină pentru reacția de floculare VDRL, RFC-W sau RFC-K.
- Antigen treponemic proteic de grup pentru RFC-W sau RFC-K.
- Antigen treponemic specific pentru RFC-W sau RFC-K.
- Antigen treponemic specific adsorbit pe hematii pentru RHA1.
- Imunoconjugate anti-imunoglobulină umană pentru RIFI.