



Técnicas para el diagnóstico de sífilis



P. Int. Br. Liliana Cedrés

Prof. Adj. Zaida Arteta

Junio 2015



CONTENIDO

- Introducción
- Técnicas directas
- Pruebas no treponémicas
- Pruebas treponémicas
- Nuevos algoritmos diagnósticos
- Conclusiones



SÍFILIS

- Enfermedad sistémica causada por *Treponema pallidum* (*T. pallidum*)
- Primaria (chancro), secundaria (mucocutánea, adenopatías) y terciaria (goma, paresia general, tabes dorsal, afectación AA). Neurosífilis: en cualquier estadio
- Latente: sólo serología (+). Temprana: < de 1 año de evolución. Tardía: > 1 año.

DIAGNÓSTICO:

Presencia demostrada por método DIRECTO (no PCR) o por serología: Prueba no treponémica + treponémica

AUSENCIA DE GOLD STANDARD

-Center of Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2015. MMWR Recomm Rep 2015;64. No 3. p.34-51.

-Tratmont E. *Treponema pallidum*. En: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7ma ed. Barcelona, España: Elsevier; 2012. p.3036-3056.

Arlene C. Sen~a, Becky L. White, and P. Frederick Sparling. Novel *Treponema pallidum* Serologic Tests: A Paradigm Shift in Syphilis Screening for the 21st Century. Clinical Infectious Diseases 2010; 51(6):700-708



DIAGNÓSTICO DIRECTO

Visualización en microscopio de campo oscuro de contraste de fase

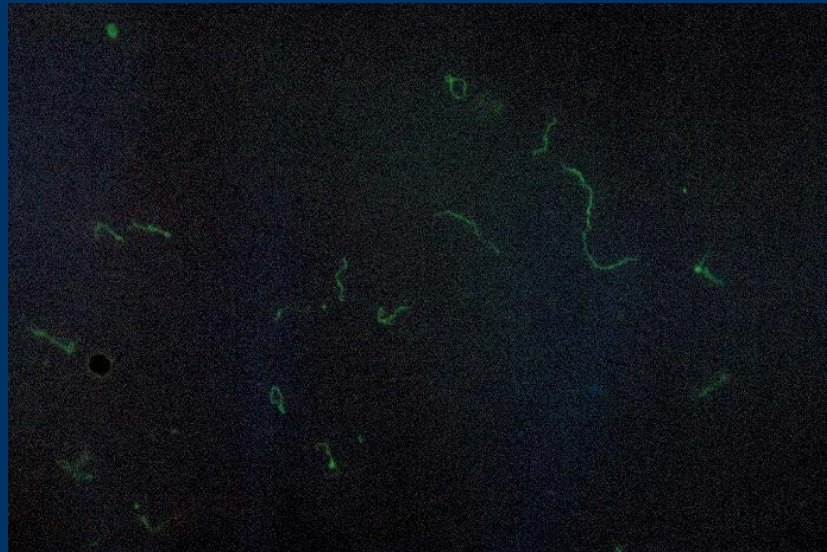


- Directo y rápido.
- Heridas húmedas o ganglios
- Suero salino. Abrasión con gasa. Exprimir exudado seroso.
- Espiroquetas “en sacacorchos”, en espiral, ondulación en su punto medio.
- Negativo: 3 sin aislamiento
- Desventajas: personal entrenado y disponible de inmediato.
- (-) si baja concentración. Dificultad para muestra adecuada.



DIAGNÓSTICO DIRECTO

Inmunofluorescencia directa (DFA-TP)



Tinción con anticuerpos mono o policlonales fluorescentes de alta especificidad

Muestras de lesiones orales, rectales e intestinales. Biopsias.

En diferido. Afecta la sensibilidad el «espesor de muestra» ⁽¹⁾

Guías Europeas 2014: lo plantean como obsoleto ⁽²⁾

(1)QUATTORDIO, Laura Elena; MILANI, Pedro Luis; MILANI, Héctor Luis. Serological diagnosis of syphilis: correlation of results according to available techniques in the laboratory. Acta bioquím. clín. latinoam., La Plata, v. 38, n. 3, sept. 2004 .

(2) M Janier, V Hegyi, N Dupin, M Unemo, GS Tiplica, M Potočnik, P French, R Patel. 2014 European Guideline on the Management of Syphilis.

Fotografía extraída de: CDC. Public Health Image Library ©



DIAGNÓSTICO DIRECTO

Detección de ADN por reacción en cadena de polimerasa (PCR)

- No hay consenso acerca de su utilidad⁽¹⁾ No aporta diagnóstico definitivo
- El RT-PCR (real time) tiene > S : + ante 1 treponema en la muestra⁽³⁾
- S:95% E:97% ⁽³⁾
- Junto a DFA-TP discriminan de treponemas no venéreos (subsp *pertenue* y *endemicum* y *T. carateum*)⁽¹⁾
- No distingue vivos de muertos (desaparecen a los 15-30 días) ⁽³⁾
- Algunos usos: - en distintos tipos de muestras
 - VIH ⁽²⁾
 - Neurosífilis ⁽³⁾

(1)M Janier, V Hegyi, N Dupin, M Unemo, GS Tiplica, M Potočnik, P French, R Patel. 2014 European Guideline on the Management of Syphilis.

(2)Center of Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2015. MMWR Recomm Rep 2015;64. No 3. p.34-51

(3)Sanguinetti-Diaz A., Rodriguez-Tafour-Davila J.Syphilis diagnosis update. Dermatol Perú 2004;14: 192-199



DIAGNÓSTICO DIRECTO: OTROS

TINCIONES: Tinción argéntica de Warthin-Starry
(difícil, artefactos)

CULTIVOS: No se multiplica in vitro,
Multiplicación en cultivos hísticos (investigación)



DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO:
PRUEBAS NO TREPONÉMICAS (PNT)
PRUEBAS TREPONÉMICAS (PT)



DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO: PNT

Venereal Disease Research Laboratory (VDRL)/Rapid Plasma Reagin (RPR)

- Anticuerpos reagínicos inespecíficos IgM+ IgG
- Complejo cardioplipina-lecitina-colesterol: si + =>floculación
- Diferencia clínica significativa: cambio 4 veces los títulos (2 diluciones)
- Fenómeno de prozona: 2%
- Títulos máximos en formas secundaria y latente temprana
- Persistencia (+): reacción biológica, infección activa o reinfección. VIH: disfunción de linfocitos B con activación policlonal
- Seroestables: $\leq 1/4$ títulos mantenidos
- Negativizan con tratamiento adecuado: 1 año luego de 1ra, 2 luego de 2ra, 5 luego de tardía



TABLA
238-8

**Causas de reacciones de pruebas serológicas falsamente
positivas biológicas (FPB) para la sífilis**

Enfermedades infecciosas

Enfermedad de Lyme*
Leptospirosis
Fiebre recurrente
Fiebre por mordedura de rata (*Spirillum minus*)
Lepra
Tuberculosis
Neumonía neumocócica
Endocarditis bacteriana subaguda
Chancroide
Escarlatina
Enfermedad por rickettsias
Paludismo
Tripanosomiasis
Neumonía por *Mycoplasma*
Varicela
Linfogranuloma venéreo
Hepatitis (especialmente hepatitis C)
Mononucleosis infecciosa

Enfermedades no infecciosas

Adicción a drogas
Cualquier enfermedad del tejido conjuntivo
Cardiopatía reumática
Transfusiones sanguíneas (múltiples)
Gestación
«Edad avanzada»
Cualquier vacunación
Hepatopatía crónica (no infecciosa)

*Sólo pruebas treponémicas específicas, VDRL (RPR) negativa.

Extraído de : Tratmont E. Treponema pallidum. En: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7ma ed. Barcelona, España: Elsevier; 2012. p.3036-3056.



DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO : PNT

VDRL y RPR

Característica	RPR	VDRL
Sensibilidad	86-100%	78-100%
Especificidad	93-95%	98-100%
Facilidad de uso	Fácil	Fácil
Equipos	Rotador y centrifuga	Microscopio de luz y centrifuga

- Económicas (costo: \$U entre 5 y 10). Sencillas. Manuales. Validez equitativa.
- No comparables cuantitativamente directamente: RPR ligeramente >
- VDRL se puede usar en LCR. Microscópico
- RPR es macroscópico (partículas de carbón)
- Otro: Prueba de la sífilis con suero no calentado y rojo de toluidina (TRUST): manual y macroscópico .

Maciej Pastuszczyk, Anna Wojas-Pelc. Current standards for diagnosis and treatment of syphilis: selection of some practical issues, based on the European (IUSTI) and U.S. (CDC) guidelines. *Postep Derm Alergol* 2013; XXX, 4: 203–210

Larsen, S. and Johnson, R. A Manual of Tests for Syphilis. Chapter 1. Diagnostics tests. Publicación del CDC, 1998

Tabla extraída de: Estrada, S. Rapid tests in the promotion, prevention and diagnosis of syphilis. *Rev Asociación Infectología de Colombia*. 2008; 12(4): 287–297.



DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO: PT

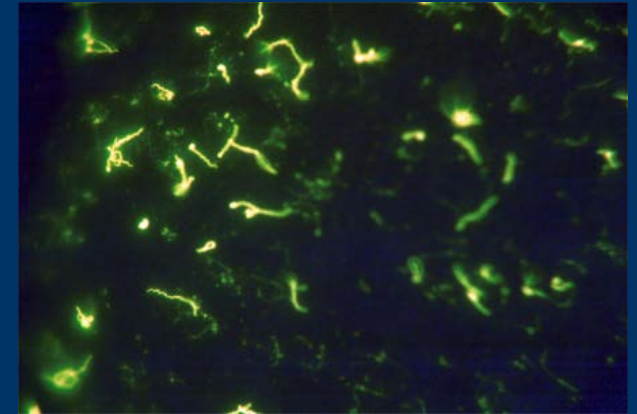
- Anticuerpos treponémicos específicos
- Tipos:
 - *enzimoinmunoanálisis -EIA-
 - *aglutinación (*T.pallidum* particle agglutination -TPPA-, *T.pallidum* hemagglutination assay -TPHA-, microaglutinación -MHA-TP-)
 - *inmunofluorescencia indirecta (FTA-ABS)
 - *Específicos IgM: EIA/IgM, 19S-IgM-FTA-abs test, IgM Immunoblot.
- Detectan antes la temprana comparados con PNT₂)
- 90% de los tratados: (+) toda la vida (más en tardía) ⁽¹⁾
- Disminuyen antiC contra treponemas comensales con adsorción

(1) Tratmont E. *Treponema pallidum*. En: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7ma ed. Barcelona, España: Elsevier; 2012. p.3036-3056. (2) M Janier, V Hegyi, N Dupin, M Unemo, GS Tiplica, M Potočnik, P French, R Patel. 2014 European Guideline on the Management of Syphilis.



DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO: PT

Fluorescent Treponemal Antibody absorption test (FTA-ABS)



- Inmunofluorescencia indirecta cualitativa
- Se conjuga con fluorescina antiglobulina humana ⁽¹⁾
- Desventaja: requiere equipamiento (microscopio de inmunofluorescencia)
tiempo que consume
técnicos con experiencia
Falsos Positivos en colagenopatías. ⁽²⁾

(1) M Janier, V Hegyi, N Dupin, M Unemo, GS Tiplica, M Potočnik, P French, R Patel. 2014 European Guideline on the Management of Syphilis.

(2) Arlene C. Senñ a, Becky L. White, and P. Frederick Sparling. Novel Treponema pallidum Serologic Tests: A Paradigm Shift in Syphilis Screening for the 21st Century. Clinical Infectious Diseases 2010; 51(6):700–708

Imagen extraída de : http://www.biocientifica.com.ar/es_int/imagenes/imagenes/atlasimg/contenidos_espanol/02_inmunofluor_infecciosas_bact-paras/004.htm



DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO: PT

Treponema Pallidum Hemagglutination Assay (TPHA)

- Microhemoaglutinación. Detecta antiC IgG + IgM.
- Manual. Barata y fácil (1)
- S: 86-100% E: 96%. (especificidad algo menor que otras PT)



(1)M Janier, V Hegyi, N Dupin, M Unemo, GS Tiplica, M Potočnik, P French, R Patel. 2014 European Guideline on the Management of Syphilis.

(2) Arlene C. Sen˜ a, Becky L. White, and P. Frederick Sparling. Novel Treponema pallidum Serologic Tests: A Paradigm Shift in Syphilis Screening for the 21st Century. Clinical Infectious Diseases 2010; 51(6):700–708

Imagen extraída de : <http://www.bio-rad.com/es-es/category/agglutination-tests>





DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO: PT

Test rápidos

- Estrategia poblacional
- Tipos: detección Ac, inmunocromatografía y aglutinación en latex
- S y E depende del test que se disponga
- E suele ser $<$ a otros treponémicos
- OMS: comparó 8 test rápidos con combinación de TPHA/TPPA reportando S entre 84.5%–97.7% y E: 92.8%–98%⁽²⁾

(1) M Janier, V Hegyi, N Dupin, M Unemo, GS Tiplica, M Potočnik, P French, R Patel. 2014 European Guideline on the Management of Syphilis.

(2) Arlene C. Sen˜a, Becky L. White, and P. Frederick Sparling. Novel Treponema pallidum Serologic Tests: A Paradigm Shift in Syphilis Screening for the 21st Century. Clinical Infectious Diseases 2010; 51(6):700–708



DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO: PT

Enzimoimmunoanálisis automático(EIA)

- Automatizado. Más caros (10-20 veces más que VDRL/RPR) ⁽²⁾
- Distinta S si Ag recombinantes o salvajes (mas S los recombinantes). ⁽⁴⁾
- > S que NT: si historia sugestiva de primaria sin tratamiento previo podría ser innecesario confirmatorio ⁽⁴⁾
- Comparado con TPHA y FTA-ABS tiene S: 98.4% y E:99.3% ⁽⁴⁾
- Placas recubiertas con Ag de *T. Pallidum* + anti IgG humano marcado+ sustrato enzimático. Leído por espectrofotómetro⁽³⁾
- Variante: inmunocaptura EIA (ICE): mayor S en VIH

(1)Center of Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2015. MMWR Recomm Rep 2015;64. No 3. p.34-51

(2) M Janier, V Hegyi, N Dupin, M Unemo, GS Tiplica, M Potočnik, P French, R Patel. 2014 European Guideline on the Management of Syphilis.

(3)Larsen, S. and Johnson, R. A Manual of Tests for Syphilis. Chapter 1. Diagnostics tests. Publicación del CDC, 1998.

(4)Arlene C. Senã, Becky L. White, and P. Frederick Sparling. Novel Treponema pallidum Serologic Tests: A Paradigm Shift in Syphilis Screening for the 21st Century. Clinical Infectious Diseases 2010; 51(6):700–708



DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO: PT

Inmunoanálisis por quimioluminiscencia (CIA)

- Automatizado. Similar a EIA
- Marcado es con partículas quimioluminiscentes
- Micropartículas paramagnéticas recubiertas por Ag recombinante de *T. Pallidum* + anti IgM y anti IgG



(1) Center of Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2015. MMWR Recomm Rep 2015;64. No 3. p.34-51

(2) M Janier, V Hegyi, N Dupin, M Unemo, GS Tiplica, M Potočnik, P French, R Patel. 2014 European Guideline on the Management of Syphilis.

(3) Larsen, S. and Johnson, R. A Manual of Tests for Syphilis. Chapter 1. Diagnostics tests. Publicación del CDC, 1998.



Table 1. Sensitivity and Specificity of Serologic Tests for Syphilis

Test	Sensitivity during stage of infection, % (range)				Specificity, % (range)
	Primary	Secondary	Latent	Late	
Nontreponemal tests					
VDRL [14]	78 (74–87)	100	96 (88–100)	71 (37–94)	98 (96–99)
TRUST [14]	85 (77–86)	100	98 (95–100)	NA	99 (98–99)
RPR [14]	86 (77–99)	100	98 (95–100)	73	98 (93–99)
Early treponemal tests					
MHA-TP [15]	76 (69–90)	100	97 (97–100)	94	99 (98–100)
TPPA [16]	88 (86–100)	100	100	NA	96 (95–100)
TPHA [17]	86	100	100	99	96
FTA-ABS [14]	84 (70–100)	100	100	96	97 (94–100)
Enzyme immunoassays					
IgG-ELISA [18]	100	100	100	NA	100
IgM-EIA [19]	93	85	64	NA	NA
ICE [20]	77	100	100	100	99
Immunochemiluminescence assays					
CLIA [21]	98	100	100	100	99

NOTE. CLIA, chemiluminescence assay; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; EIA, enzyme immunoassay; FTA-ABS, fluorescent treponemal antibody absorption assay; ICE, immune-capture EIA; MHA-TP, microhemagglutination assay for *Treponema pallidum*; NA, not available; TPHA, *T. pallidum* hemagglutination assay; TPPA, *T. pallidum* particle agglutination; TRUST, toluidine red unheated serum test.



Table 2. Treponemal Antigens, Antibody Targets, and Performance of Several Treponemal-Based Tests and Their Estimated Positive Predictive Values Based on Syphilis Prevalence Ranging from 0.7% to 4.0% in the US Population

Test	Manufacturer	Treponemal antigens	Treponemal antibody targets	Reference tests	Sensitivity, %	Specificity, %	Positive predictive value, %
Rapid tests							
Syphilis Fast [34]	Diesse	Recombinant (TpN15, TpN17, TpN47)	IgM, IgG	VDRL, TPHA, FTA-ABS	95.6	99.9	87.1–97.5
Determine Syphilis TP [31]	Abbott Laboratories	Recombinant (TpN47)	IgM, IgG, IgA	TPHA, TPPA	97.2	94.1	10.4–40.7
Espline TP [31]	Fujirebio	Recombinant (TpN15, TpN17, TpN47)	IgM, IgG, IgA	TPHA, TPPA	97.7	93.4	9.4–38.1
SD Bioline Syphilis 3.0 [31]	Standard Diagnostics	Recombinant (TpN15, TpN17, TpN47)	IgM, IgG, IgA	TPHA, TPPA	95.0	94.9	11.6–43.7
Enzyme immunoassays							
BioElisa Syphilis 3.0 [43]	Biokit	Wild type	IgG	TPHA, FTA-ABS	99.5	99.4	53.9–87.4
CAPTIA Syphilis-G [44]	Trinity Biotech	Wild type	IgG	FTA-ABS	96.7	98.3	28.6–70.3
Eti-syphilis G [18]	Diasorin	Wild type	IgG	RPR, MHA-TP, FTA-ABS	99.4	100	58.4–89.2 ^a
Trep-Check IgG EIA [45]	Phoenix Biotech	Recombinant (not specified)	IgG	RPR, VDRL, TPPA, FTA-ABS	85.3	95.6	12.0–44.7
Syphilis EIA II [46]	Newmarket Laboratories	Recombinant (TpN15, TpN17, TpN47)	IgM, IgG	TPHA, TPPA	99.1	100	58.3–89.2 ^a
Syphilis Total [46]	Bio-Rad	Recombinant (TpN15, TpN17, TpN47)	IgM, IgG	TPHA, TPPA	97.4	100	57.9–89.0 ^a
Enzywell Syphilis Screen Recombinant [46]	Diesse	Recombinant (TpN15, TpN17, TpN47)	IgM, IgG	TPHA, TPPA	98.2	100	58.1–89.1 ^a
Immunochemiluminescence							
LIASON Chemiluminescence Assay [47]	Diasorin	Recombinant (TpN17)	IgM, IgG	RPR, TPPA	95.8	99.1	42.9–81.6
Architect Chemiluminescence Assay [21]	Abbott	Recombinant (TpN15, TpN17, TpN47)	IgM, IgG	VDRL, TPPA	98.4	99.1	43.5–82.0

NOTE. EIA, enzyme immunoassay; FTA-ABS, fluorescent treponemal antibody absorption assay; MHA-TP, microhemagglutination assay; TPHA, *Treponema pallidum* hemagglutination assay; TPPA, *T. pallidum* particle agglutination.

^a For tests with specificities of 100%, a lower estimate of 99.5% was used to calculate a range of positive predictive values considering the 95% confidence intervals around the reported specificities.

Extraído de: Arlene C. Senñ a, Becky L. White, and P. Frederick Sparling. Novel *Treponema pallidum* Serologic Tests: A Paradigm Shift in Syphilis Screening for the 21st Century. *Clinical Infectious Diseases* 2010; 51(6):700–708





Syphilis. False shame and fear may destroy your future : Have your blood tested. Poster for treatment of syphilis, showing a man and a woman bowing their heads in shame. Created/Published: Rochester, N.Y.: WPA Federal Art Project, between 1936 and 1938. Creator: Hans Erik Krause, born 1899, artist. Repository: Library of Congress Prints and Photographs Division Washington, D.C.

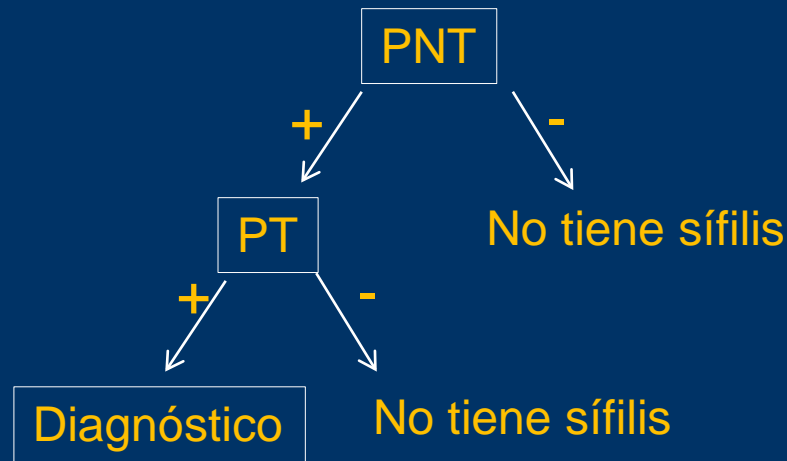


ALGORITMOS

DIAGNÓSTICOS



ALGORITMO TRADICIONAL



- Usa como screening PNT (la mayoría RPR) y como confirmatorio PT
- Menor VPP para detectar sífilis temprana o incompletamente tratada ⁽¹⁾
- PNT (+) y PT (-) puede deberse a FP de la técnica (raro) o por reacción biológica (mas frecuente) : por ello requiere confirmar con PT

(1) Man-Li Tong, Li-Rong Lin, Li-Li Liu, et al. Analysis of 3 Algorithms for Syphilis Serodiagnosis and Implications for Clinical Management. Clinical Infectious Diseases 2014;58(8):1116–24



Algoritmo inverso (CDC)

- Utiliza como screening PT y como confirmatoria una PNT.
- Dado que las PT son de mayor S si PNT es (-): realiza una PT diferente de la primera (generalmente primero EIA/CIA y luego TPHA/TPPA).
- Ante 2 PT (+) y PNT (-) puede tratarse de:
 - - Sífilis curada (si ya se trató y no fue nuevamente expuesto no se trata)
 - - Sífilis temprana (PNT tienen período ventana de 2-4 semanas):
 - *paciente sin diagnóstico de sífilis previo: se ofrece tratamiento
 - *paciente ya tratado para sífilis con historia que oriente a nueva exposición: se repite PNT a las 2-4 semanas para confirmar

(1)Center of Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2015. MMWR Recomm Rep 2015;64. No 3. p.34-51



ALGORITMO INVERSO (CDC)



Center of Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2015. MMWR Recomm Rep 2015;64. No 3. p.34-51



Algoritmo European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)

- Usa como screening PT y como confirmatoria otra PT distinta de la inicial (EIA/CIA si se hizo TPHA/TPPA y viceversa)
- Si la segunda PT es (+): PNT cuantitativa (para monitoreo clínico)
- Ante 2 PT (+) y PNT (-): considerar posibilidad de sífilis temprana dado el período ventana de las PNT:
 - *Si presenta síntomas o se sospecha sífilis temprana: se ofrece tratamiento. Puede confirmarse con EIA-IgM test
 - *Asintomático: nueva PNT a las 2-4 semanas. Si la PNT persiste negativa no se inicia tratamiento (se considera curado)

M Janier, V Hegyi, N Dupin, M Unemo, GS Tiplica, M Potočnik, P French, R Patel. 2014 European Guideline on the Management of Syphilis.



Algoritmo European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)



M Janier, V Hegyi, N Dupin, M Unemo, GS Tiplica, M Potočnik, P French, R Patel. 2014 European Guideline on the Management of Syphilis.



CONCLUSIONES

- La mayor complejidad es no contar con un gold standard contra el que se puedan comparar los test diagnósticos
- La variabilidad de tests y algoritmos le presentan al clínico una mayor dificultad en la interpretación de resultados
- Cada vez más uso de técnicas automatizadas (obtienen resultados de gran cantidad de muestras en forma simultánea)
- Algoritmos que utilizan como screening PNT: $< VPP$ para sífilis temprana
- Algoritmos que utilizan como screening PT: quedan dentro de los (+) pacientes con sífilis curada \Rightarrow tratar a los que cuenten con PNT positivas o ante sospecha de sífilis temprana





Cátedra de Enfermedades Infecciosas



www.infectologia.edu.uy