

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

DANIELA DUARTE DE FRAGA

**Detecção de *Treponema pallidum* em líquido cefalorraquidiano (LCR) pela
reação em cadeia da polimerase (PCR) em pacientes HIV positivos
assintomáticos com diagnóstico de sífilis latente**

**Porto Alegre
2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

DANIELA DUARTE DE FRAGA

**Detecção de *Treponema pallidum* em líquido cefalorraquidiano (LCR) pela
reação em cadeia da polimerase (PCR) em pacientes HIV positivos
assintomáticos com diagnóstico de sífilis latente**

**Orientador: Prof. Dr. Luciano Zubaran Goldani
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas UFRGS,
como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.**

**Porto alegre
2013**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Duarte de Fraga, Daniela

Detecção de treponema pallidum em líquido cefalorraquidiano (LCR) pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em pacientes HIV positivos assintomáticos com diagnóstico de sífilis latente / Daniela Duarte de Fraga. -- 2013.

51 f.

Orientador: Luciano Zubaran Goldani.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Neurosífilis. 2. HIV. 3. Treponema pallidum. 4. LCR. 5. PCR. I. Zubaran Goldani, Luciano, orient. II. Título.

Porto Alegre

2013

Dedico esta dissertação aos meus
pais e a minha irmã.

AGRADECIMENTOS

A Deus. Obrigada Senhor pela fé. Por termos mais a agradecer do que pedir. Pelas oportunidades e pela persistência em seguir rumo aos desejos e objetivos. Pela saúde física e emocional para trabalhar e estudar, e sabedoria para enfrentar as adversidades nos dias mais difíceis.

A minha família, meus pais Mari Jane e Carlos Alberto por me ensinarem o caminho do bem, pelo amor e educação, pelo investimento em meus estudos e pelo apoio em minhas decisões.

A minha irmã Lidiane, minha outra parte, minha melhor amiga e fiel parceira.

A minha vó Dilma, sempre se lembrando de mim em oração, pelas palavras positivas e pelos lanches e bombons.

Ao meu amor e incentivador Nélio Castaman, pela assistência e paciência nos momentos de angústia, medo e cansaço. Sempre participativo, facilitando minhas correrias.

À Direção, as chefias e aos colegas do IPB-LACEN por permitirem me ausentar do trabalho para realizar as atividades da pós graduação. Sem essa permissão, não teria conseguido.

Ao meu orientador Prof Dr Luciano Zubaran Goldani pela oportunidade e orientação, pelas idéias e pelo otimismo.

Aos pesquisadores do Laboratório Especial em Doenças Infeciosas do HCPA, Marcelo Czykiel, pela colaboração na coleta de dados, Luís André Aquino Muller pelo conhecimento paciência e apoio ao me ensinar e ajudar na bancada e ao Prof Dr Gustavo Wissmann pela assistência e pelos contatos profissionais com outros pesquisadores.

RESUMO

O diagnóstico de neurosífilis é freqüentemente dependente dos resultados dos testes serológicos e alterações no líquido cefalorraquidiano, mas a confiabilidade desses resultados em pacientes com infecção pelo HIV-1 tem sido questionada especialmente em pacientes assintomáticos com sífilis latente. O estudo se propõe avaliar a presença de DNA do *T. pallidum* no LCR de pacientes assintomáticos infectados pelo HIV, com o diagnóstico de sífilis. Amostras de LCR foram coletadas de 12 pacientes infectados pelo HIV atendidos em um terciário localizado no sul do Brasil, durante o período de 2012 a 2013. A presença de DNA do *T. pallidum* foram analisadas nas amostras de LCR pelo método de PCR "seminested". Dados demográficos dos pacientes, parâmetros bioquímicos, celularidade e VDRL do LCR e linfócitos T-CD4 também foram analisados. Nas amostras de LCR de cinco dos 12 pacientes (40%) foram detectados o DNA do *T. pallidum*. Inesperadamente, nestes doentes, os níveis de contagem de células, proteína e glicose no LCR foram normais. Além disso, nenhuma destas cinco amostras de CSF apresentou uma reacção positiva VDRL. Os títulos de VDRL no soro foram semelhantes entre pacientes positivos e negativos para a presença *T. pallidum* DNA no LCR. A maioria dos pacientes com DNA de *T. pallidum* detectável apresentaram baixos títulos de VDRL no soro. O VDRL sérico elevado com título de 1:64 foi observada em apenas um paciente. Nossos resultados demonstraram que os pacientes assintomáticos infectados pelo HIV com evidência de sífilis latente e LCR normais podem apresentar DNA de *T. pallidum* detectável no LCR. A detecção do DNA do *T. pallidum* pelo nosso seminested PCR pode fornecer informações adicionais além da análise convencional do LCR para o diagnóstico de neurosífilis. A presença do DNA de *T. pallidum* no LCR em pacientes infectados pelo HIV com sífilis latente e resultados de LCR normais pode determinar uma mudança terapêutica do uso de penicilina benzatina intramuscular para o de penicilina cristalina intravenosa aquosa para o tratamento da sífilis.

PALAVRAS-CHAVE: Neurosífilis, HIV, *Treponema pallidum*, LCR, PCR.

ABSTRACT

Neurosyphilis diagnosis is frequently dependent upon the results of serological tests and cerebrospinal fluid abnormalities, but the reliability of findings in patients with HIV-1 infection has been questioned, especially asymptomatic patients with latent syphilis. We present the data on the presence of *T. pallidum* DNA in CSF from asymptomatic HIV-infected patients with the diagnosis of syphilis. CSF and serum samples were collected from 12 HIV-infected patients attending a tertiary care located in southern Brazil, during the period 2012 to 2013. In CSF samples from five of 12 patients (40%), we detected *T. pallidum* DNA. Unexpectedly, in these patients, CSF cell count, protein and glucose levels were normal. In addition, none of these 5 CSF samples presented a positive VDRL reaction. Serum VDRL titers were similar between patients with positive and negative CSF *T. pallidum* DNA. Most patients with detectable *T. pallidum* DNA presented low serum VDRL titers. Serum VDRL titer of 1:64 was observed in one patient. Our results have shown that asymptomatic HIV-infected patients with evidence of latent syphilis and normal CSF might present detectable *T. pallidum* DNA in the CSF. The detection of *T. pallidum* DNA by our seminested PCR provide additional information beyond conventional CSF analysis for diagnosis of neurosyphilis. The detection of *T. pallidum* DNA in the CSF despite normal CSF findings in HIV-infected patients could also provide a different therapeutic approach including the use of intravenous aqueous crystalline penicillin.

KEYWORDS: Neurosyphilis, HIV, *Treponema pallidum*, LCR, PCR.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Microfotografia do <i>Treponema pallidum</i> | 15 |
| Figura 2 – Linha do tempo do desenvolvimento do diagnóstico laboratorial da sífilis..... | 19 |
| Figura 3 – Localização e seleção de artigos | 26 |
| Figura 4 – Marco conceitual | 27 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Classificação das formas de Neurosífilis..... | 16 |
| Tabela 2 – Técnicas não treponêmicas | 20 |
| Tabela 3 – Técnicas treponêmicas | 21 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| SIGLA | Significado |
|--------------|---|
| CDC | Center for Disease Control and Prevention |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| FIPE | Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos |
| HCPA | Hospital de Clínicas de Porto Alegre |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| LCR | Líquido Cefalorraquidiano |
| NS | Neurossífilis |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| PPG | Programa de Pós Graduação |
| PPGCM | Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas |
| UFRGS | Universidade Federal do Rio Grande do Sul |

Sumário

| | |
|--|----|
| 1. Introdução..... | 12 |
| 2. Revisão Bibliográfica | 13 |
| 2.1. Neurosífilis..... | 13 |
| 2.2. Treponema pallidum..... | 14 |
| 2.3. Classificação das formas clínicas de Neurosífilis | 15 |
| 2.3.1. Precoce | 16 |
| 2.3.2. Tardia..... | 17 |
| 2.4. Diagnóstico..... | 18 |
| 2.5. Testes laboratoriais..... | 19 |
| 2.5.1. Testes não treponêmicos | 19 |
| 2.5.2. Testes treponêmicos..... | 20 |
| 2.6. Reação em cadeia da polimerase (PCR)..... | 22 |
| 2.7. Tratamento..... | 24 |
| 3. Localização e Seleção dos Artigos..... | 26 |
| 4. Marco Conceitual..... | 27 |
| 5. Justificativa | 28 |
| 6. Objetivos | 29 |
| 6.1. Objetivo Geral..... | 29 |
| 6.2. Objetivos Específicos | 29 |
| 7. Referências Bibliográficas..... | 30 |
| 8. Artigo em Inglês..... | 35 |
| 9. Considerações Finais | 47 |
| 10. Anexos | 48 |
| Anexo I..... | 48 |
| Anexo II..... | 49 |
| Anexo III | 50 |

1. Introdução

A sífilis é uma doença infecciosa crônica exclusiva do ser humano causada pela bactéria *Treponema pallidum*²⁰. Estima-se a incidência da sífilis em 12 milhões de casos por ano no mundo, sendo uma infecção relativamente comum e de importância na saúde pública³⁸. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a maior parte dos novos casos ocorre no sul da Ásia e na África subsaariana^{18 34}. Segundo o Ministério da Saúde, no Brasil a epidemiologia da sífilis em gestantes é de 7.200 casos por ano e na forma congênita é de 5.400 casos por ano³⁷. A taxa de óbito é alta, estimando-se em 25% a 40% dos casos³⁴.

A sífilis caracteriza-se por ser uma doença multissistêmica, os sinais e sintomas são inespecíficos e complexos, se não tratada avança para formas mais graves, podendo atingir o sistema nervoso central (SNC)^{44 38}. Quando o SNC é atingido, na fase terciária, é denominada Neurosífilis (NS)²¹. Indivíduos com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) em associação com a sífilis estão mais propensos a progredir para esta forma¹⁷. Portanto a análise do líquido cefalorraquidiano (LCR) está indicada para estes casos¹³.

Por consequência das complicações, a fase terciária apresenta importante atenção devido à taxa de mortalidade acima de 60% dos casos¹⁸. Por isso o diagnóstico e tratamento precoce³¹. O diagnóstico está baseado na clínica e nos testes sorológicos para sífilis, os quais estão divididos em reações treponêmicas e reações não-treponêmicas⁴⁴. Devido à impossibilidade do cultivo do *Treponema pallidum*, através de ensaios *in vitro*, surgem dificuldades na interpretação dos resultados^{24 34}. Frente às dificuldades sugere-se a utilização de metodologias alternativas como a reação em cadeia da polimerase (PCR), o método mais atual no campo da biologia molecular para o diagnóstico de NS 1.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Neurosífilis

A NS é uma forma de apresentação da sífilis na fase terciária, em que há o acometimento do sistema nervoso central (cérebro, meninges ou medula espinhal) pelo *Treponema pallidum*. A história da NS começou em 1905, quando o *Treponema pallidum* foi descrito pela primeira vez, anos mais tarde, desenvolveu-se um teste que permitiu a confirmação sorológica da sífilis em pacientes com distúrbios neurológicos. Em 1913, Noguchi e Moore encontraram treponemas no cérebro, e propuseram que a sífilis poderia infectar o SNC, logo esta evidência passou a ser estudada no campo da infectologia²¹. Na NS, os sinais e sintomas não são específicos e a forma assintomática é a apresentação mais comum^{16 42 7}. Desenvolve-se de 25% a 40% dos indivíduos não tratados para sífilis³¹. A NS tornou-se uma doença rara devido à terminologia mal definida e manifestações clínicas variadas⁴². Apesar de estudos e publicações, a falta de uma população em grande escala dificulta a apuração de dados epidemiológicos¹³. A escassez de registros sobre a epidemiologia da doença é agravada pelas manifestações clínicas inespecíficas juntamente com a impossibilidade do cultivo de *Treponema pallidum* por meios artificiais em laboratório³³.

Embora a incidência da sífilis tenha diminuído no final do século XX com o surgimento da penicilina, atualmente o aumento no número de novos casos é observado particularmente entre indivíduos coinfectados com o HIV^{7 31}. Todas as formas de NS envolvem o *Treponema pallidum* no SNC, isto ocorre geralmente nos primeiros meses ou anos de infecção ou torna-se assintomática por anos, considerando que a forma assintomática é significativamente alta em indivíduos infectados pelo HIV^{7 21}. Nos casos de indivíduos coinfectados, estudos sugerem que a sífilis, assim como outras infecções agudas, esteja associada a um aumento significativo da carga viral do HIV e a diminuição na contagem de células CD4^{49 47}. Há evidências clínicas de que o HIV altera a resposta imune ao *Treponema pallidum*. Além disso, indivíduos HIV

positivo que adquirem sífilis têm maior propensão a progredir mais precocemente para NS¹⁷. Estes, possuem maior frequência de sífilis pela hipótese de que ambas as afecções são adquiridas pela mesma via e ambos os agentes patogênicos invadem e se replicam no SNC^{47 13 24}. Apesar de décadas de experiência clínica com indivíduos coinfectados, esta interação ainda é pouco compreendida³⁴, pois independente da coinfecção com o vírus HIV, aproximadamente um terço dos indivíduos com sífilis têm invasão de treponemas no LCR⁴⁹. Observa-se nos ensaios *in vivo* que, quando treponemas são inoculados em modelo animal, a invasão das bactérias no SNC é detectada em minutos nos linfonodos e em algumas horas no LCR, a partir de então, são capazes de invadir outros tecidos e órgãos^{47 13 24}, condição que requer diagnóstico

e tratamento precoce^{33 7 31}.

2.2. *Treponema pallidum*

O *Treponema pallidum*, subespécie *pallidum* é uma bactéria anaeróbica, gram-negativa do grupo das espiroquetas pertence a ordem Spirochaetales, família Spirochaetaceae e gênero *Treponema*, possui formato helicoidal que mede de 6µm a 15µm de comprimento e diâmetro de 0,2µm. A forma de reprodução é assexuada por fissão binária transversal. O corpo é envolto por uma membrana citoplasmática frouxamente associada à outra membrana mais externa, que envolve o flagelo periplasmático, a estabilidade estrutural é composta por um complexo de membranas peptidoglicano-citoplasmática, e um cilindro protoplasmático. A motilidade se deve aos filamentos axiais chamados endoflagella localizados no espaço periplasmático que auxiliam a rápida rotação sobre seu eixo longitudinal, movimento característico de saca-rolhas^{35 24}.



Figura 1 - Microfotografia do *Treponema pallidum*⁵¹.

Em 1905, Schaudinn e Hoffman descobriram que o agente etiológico causador da sífilis era o *Treponema pallidum*. Surgiu então um grande interesse na tentativa de cultivá-lo *in vitro*, apesar de diversas tentativas realizadas, não obtiveram sucesso¹⁰. Após oito décadas, em 1986, Norris e Edmondson, tentaram realizar uma subcultura *in vitro*, porém foram incapazes de manter os organismos viáveis⁵⁰.

A dificuldade na reprodução *in vitro* do *Treponema pallidum* é um impedimento na prática devido às características biológicas próprias do organismo como; sensibilidade à temperatura, humidade, intolerância ao oxigênio, além do tempo de geração extremamente lento. Apesar de diversas tentativas até o momento, pesquisadores não foram capazes de reproduzir *Treponema pallidum* em cultura de tecidos maiores que sete gerações^{24 10}. A incapacidade de sobreviver e se multiplicar fora do hospedeiro são um empecilho para o aperfeiçoamento de métodos na investigação da doença. É uma das poucas bactérias patogênicas ao homem que ainda não podem ser cultivadas fora de um organismo vivo⁵.

2.3. Classificação das formas clínicas de Neurosífilis

O acometimento multissistêmico da NS faz com que a classificação se torne complexa, pois além de acometer diferentes partes do organismo, apresenta manifestações clínicas semelhantes a outras doenças⁴⁷. As manifestações clínicas em

NS variam de acordo com o tempo de evolução da doença, na sífilis precoce, com menos de um ano de infecção apresenta-se como neurosífilis assintomática, meningite sífilítica e sífilis meningovascular, e nas manifestações tardias, com mais um ano de infecção, apresenta-se como paralisia geral progressiva e tabes dorsalis ⁴⁵. Assim podemos classificá-las da seguinte maneira. Tabela 1.

| Precoce | Tardia |
|-----------------|-----------------|
| Assintomática | Paralisia geral |
| Meníngea | Tabes dorsalis |
| Meningovascular | |

Tabela 1 – Classificação das formas de NS ⁹.

2.3.1. Precoce

Assintomática

Na forma assintomática há alteração do LCR com aumento de proteínas, porém sem anormalidades clínicas, nesta fase há um alto risco de desenvolvimento de alterações neurológicas ⁹.

Meníngea

A forma meníngea é uma das primeiras manifestações clínicas, apresenta lesões na pele e ocorre durante o primeiro ano de infecção ⁹. Está associada com paralisia de nervos cranianos, edema de papila, características neuropsiquiátricas, perda auditiva, tetraparesia espástica, síndromes medulares, acidente vascular cerebral (AVC), distúrbio de marcha e atrofia óptica ⁸. No início da infecção pode ocorrer inflamação difusa das meninges com sinais e sintomas de meningite, cefaleia, fotofobia, náuseas, vômitos e em alguns casos convulsões ¹³. Esta forma apresenta três variantes; hidrocefalia sífilítica aguda, com dores de cabeça, náuseas e vômitos, sem sinais focais; meningite aguda de Vertex, com convulsões, hemiplegia, afasia, confusões e delírios, e

meningite aguda afetando principalmente os nervos cranianos VII e VIII, seguidos do II e o oculomotor⁹.

Meningovascular

A forma meningovascular é a mais comum e manifesta-se em 12 anos após a infecção, em 50% dos casos inicia num período de semanas ou meses e tem como apresentações clínicas; insônia, tonturas, dores de cabeça e alterações de personalidade, ao longo do tempo a clínica é sobreposta por alterações cerebrovasculares⁹, AVC agudo principalmente isquêmico, vasculite atingindo artérias de médio e grande calibre, estenose e ectasia dos vasos²⁵. De 10% dos indivíduos com NS não tratada, 3% evoluem para a forma meningovascular⁴³.

2.3.2. Tardia

Paralisia geral

A paralisia geral foi uma das causas mais frequentes de internação psiquiátrica no passado, atualmente é uma apresentação rara. É uma meningoencefalite progressiva que ocorre entre 15 a 20 anos após a infecção inicial. A clínica é inicialmente insidiosa e se não tratada progride num período de 3 a 4 anos. As manifestações são variadas com; comprometimento cognitivo, dificuldade de concentração, alterações de memória, irritabilidade e alterações ópticas com pupilas de Argyll Robertson. O quadro pode progredir de modo semelhante às síndromes neuropsiquiátricas como, demência associada a delírios e alucinações, psicose, mania, hipotonia muscular, tremor de extremidades, perda no controle de esfíncteres e disartria^{9 44}.

Tabes dorsalis

A NS do tipo tabes dorsalis é uma forma parenquimatosa em que há o acometimento da coluna vertebral³⁸. O início é tardio e manifesta-se entre 18 a 25 anos após a infecção da sífilis⁹, apresenta-se como uma aracnoidite crônica, que envolve principalmente as raízes posteriores da medula espinhal²³. O quadro consiste em dores

nos membros inferiores, dores abdominais, parestesias, perda de reflexos e sensibilidade, incontinência urinária, ataxia e diminuição no número de neurônios⁹.

Outras formas de NS são descritas, porém fazem parte de outras entidades patológicas em conseqüências de suas características clínicas. Devido ao polimorfismo da doença, a NS deve fazer parte do diagnóstico diferencial em todas as áreas da neurologia⁹.

2.4. Diagnóstico

Em 1907, foi desenvolvido o teste de reação de fixação do complemento de Wasserman que permitiu a confirmação sorológica da sífilis em indivíduos com alterações neurológicas²¹. Neste mesmo ano, foi descrito por Michaelis a reação de floculação baseada nos mesmos antígenos utilizados na fixação do complemento. A partir dessa descoberta surgiram as reações de Kahn, Kline e Meinicke. Em 1912, foi descoberta por Lange, a reação do ouro coloidal para o diagnóstico de NS. Após quase três décadas, em 1941, Pangborn isolou a cardiolipina que constitui o principal antígeno da reação de Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) que detecta anticorpos anti-Tp não específicos. Em 1957, Deacon descreveu a reação baseada no princípio da imunofluorescência, o Fluorescent Treponemal Antibody (FTA), sete anos depois Hunter aperfeiçoou o método tornando-o mais específico, e transformou-se em Fluorescent Treponemal Antibody-absorption (FTA-abs). Oito anos mais tarde, em 1965 Rathlew desenvolveu a técnica de hemaglutinação indireta divulgada numa publicação da Organização Mundial da Saúde. Na década de 1970 foi desenvolvido o teste imunoenzimático Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) e em 1990 foi disponibilizado no mercado brasileiro o Enzyme-linked Immunosorbent Assay - *Treponema pallidum* (ELISA-Tp). No início da década de 2000 surgiram os testes de quimioluminescência com antígenos recombinantes. E recentemente foram desenvolvidos os testes rápidos imunocromatográficos treponêmicos para triagem, bem utilizados em ambientes laboratoriais pouco estruturados. Atualmente, estudos na área de biologia molecular têm sido explorados com o objetivo na padronização de métodos

diagnósticos mais promissores, no entanto, até o momento estas metodologias têm sido utilizadas somente para fins de pesquisa. A figura abaixo resume a evolução do diagnóstico laboratorial da sífilis durante um século de estudo ⁴¹.

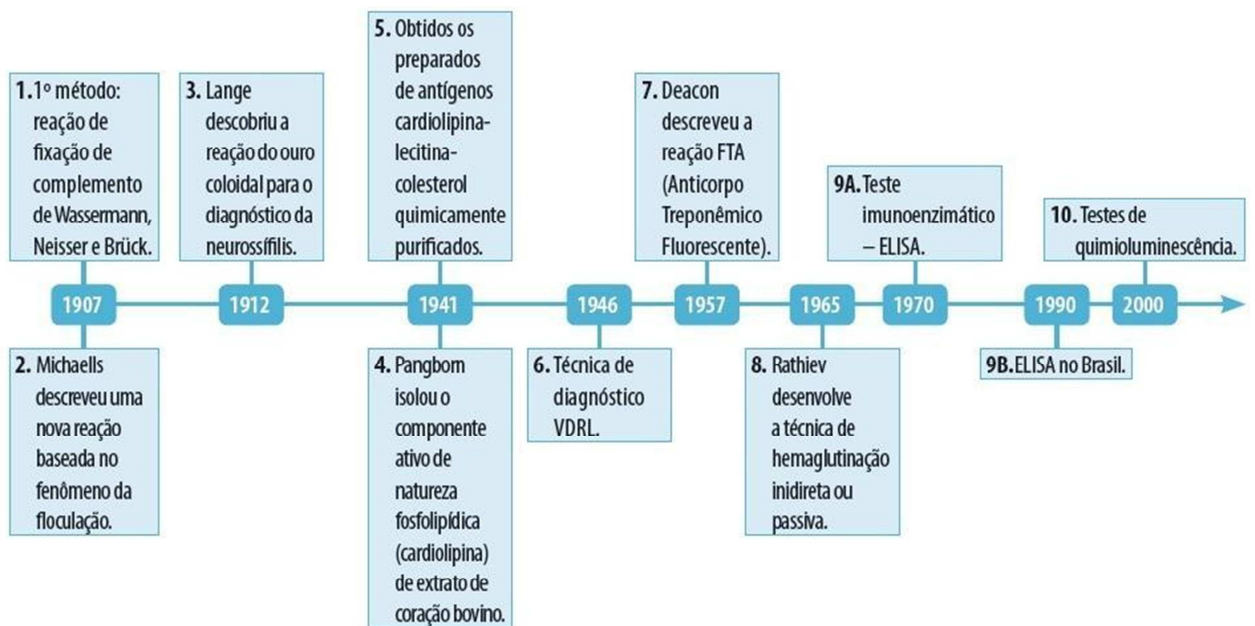


Figura 2 - Linha do tempo do desenvolvimento do diagnóstico laboratorial da sífilis ⁴¹.

2.5. Testes laboratoriais

Os testes laboratoriais para sífilis estão baseados nas reações sorológicas e são divididos em reações não treponêmicas e reações treponêmicas ⁴⁵.

2.5.1. Testes não treponêmicos

As reações não treponêmicas estão baseadas em antígenos compostos que detectam anticorpos não específicos para *Treponema Pallidum*. Está indicado para diagnóstico e resposta ao seguimento do tratamento ^{45 26}. Um dos testes utilizados é o VDRL para triagem com o objetivo de avaliar o título da reação. O título no teste não

treponêmico é a diluição seriada da amostra, de modo a verificar reatividade na última diluição da reação. A especificidade do VDRL é alta, em torno de 98% e a sensibilidade nas fases primária é de 78%, secundária 100% e na fase latente aproximadamente 96%. Na análise de um resultado reagente, este pode persistir reagente mesmo após o tratamento. Na fase de tratamento a tendência é a queda progressiva nos títulos até a cura da infecção. Conforme a tabela 2, outras metodologias não treponêmicas são utilizadas para o diagnóstico da sífilis ⁴¹.

| Técnica | Testes |
|--------------------------|---|
| Floculação | VDRL (<i>Venereal Disease Laboratory</i>) RPR (<i>Rapid Test Reagin</i>) USR (<i>Unheated Serum Reagin</i>) TRUST (<i>Toluidine Red Unheated Serum Test</i>) |
| Aglutinação | Testes Rápidos – TR |
| Imunoenzimáticos (ELISA) | ELISA (<i>Enzyme – linked immunossorbent assay</i>) |
| Imunocromatográficos | Testes Rápidos – TR |

Tabela 2 - Técnicas não treponêmicas ⁴¹.

2.5.2. Testes treponêmicos

As reações treponêmicas detectam anticorpos específicos contra *Treponema pallidum*, pois utilizam como antígeno o próprio *Treponema pallidum*, são realizadas

somente para confirmar os resultados reagentes na triagem ^{39 34} ou para exclusão de resultados falso-positivos no VDRL ⁴⁰. Um dos testes treponêmicos mais utilizados é o FTA-abs, uma vez que o resultado no FTA-abs é reagente, se tornará reagente por toda a vida do indivíduo, logo para fim de determinação da fase da doença (precoce ou tardia) esta metodologia não se torna favorável ⁴⁵. A sensibilidade das reações treponêmicas na fases primária 84%, nas fases secundária e latente 100% e aproximadamente na fase terciária 96% ⁴⁰. Conforme a tabela 3, outras metodologias treponêmicas são utilizadas para o diagnóstico da sífilis ⁴¹.

| Técnica | Testes |
|------------------------------------|--|
| Imunofluorescência indireta | FTA-abs (<i>Fluorescent treponemal antibody absorption</i>) |
| Hemaglutinação | MHA-TP (microhemaglutinação para <i>Treponema pallidum</i>) |
| Aglutinação de partículas | TPPA (<i>Treponema pallidum particle agglutination assay</i>) |
| Imunoenzimáticos e suas variações | ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>), CMIA (Ensaio imunológico quimioluminescente magnético) |
| Imunocromatografia e fluxo lateral | Testes rápidos |
| Testes moleculares | PCR |

Tabela 3 - Técnicas treponêmicas ⁴¹.

Para o diagnóstico de NS a análise do LCR é o método de escolha ¹. Os critérios incluem: positividade em um ou mais testes sorológicos para sífilis e análise citológica e bioquímica do LCR com aumento de células e proteínas ^{7 41}. Considera-se a reação de VDRL no LCR o padrão ouro para o diagnóstico em NS, embora seja altamente específico, não possui alta sensibilidade, podendo apresentar resultados negativos em até 50% dos casos ³⁴.

A presença de um VDRL reagente no LCR associado ao aumento na contagem de células totais, e aumento nos níveis de proteínas é uma forte evidência de que a infecção está ativa ⁵⁰. Porém, um resultado de VDRL não reagente no LCR não exclui a infecção ³⁴. Logo, testes adicionais são indicados e a utilização de métodos alternativos. ^{26 7}. Os testes sorológicos para diagnóstico da sífilis são adequados para confirmação da infecção e acompanhamento do tratamento, porém tornam-se insuficientes em determinadas fases ⁴⁸. Além dos testes laboratoriais, o diagnóstico consiste em relacionar a história do indivíduo, os dados clínicos, conhecer as fases da infecção e sua evolução ⁴¹.

No período pré-antibiótico estabeleceu-se uma abordagem, de que a análise do LCR deveria ser realizada em todos os casos de sífilis com ou sem sinais de envolvimento do SNC, independentemente do estágio da infecção ¹³. Atualmente o diagnóstico baseia-se principalmente nas reações sorológicas, na análise do LCR e nas possíveis manifestações clínicas ⁴⁹. As alterações neurológicas ocorrem com maior frequência entre indivíduos HIV positivo comparado aos que não possuem esta

infecção, principalmente nos que apresentam maior imunodeficiência⁸. Segundo as normas do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) é recomendada a punção lombar para todo indivíduo HIV positivo com alterações neurológicas, diagnóstico de sífilis com fase desconhecida, fase latente tardia ou indeterminada, e falha no tratamento.^{46 1}

O diagnóstico e a definição de NS têm sido um desafio e objeto de estudos e questionamentos, a interpretação dos resultados é complexa e a dificuldade é aumentada devido à coinfeção com o HIV^{29 8}. A associação com o HIV é um fator complicador na prática clínica pois, o HIV por si só está associado às anormalidades no LCR^{29 19}. Por isso a utilização de novas metodologias^{26 7}.

2.6. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A biologia molecular tem se mostrado promissora nas manifestações da sífilis mais complexas de diagnosticar. O desenvolvimento de técnicas moleculares e novos métodos potencialmente mais sensíveis e específicos visam auxiliar o diagnóstico nestes casos. Porém, a utilização desta metodologia atualmente está limitada aos laboratórios de pesquisa^{26 12}.

Considera-se que a PCR é o método mais atual no campo da biologia molecular para o diagnóstico de NS²⁸. Devido à sensibilidade e especificidade notáveis, a PCR é uma técnica relativamente nova, revelando-se um método aplicável para o diagnóstico de infecções causadas por organismos que não podem ser cultivados⁴⁸. É uma metodologia que tem detectado com êxito a presença de *Treponema pallidum* em diferentes produtos biológicos² como ulcerações de pele, biópsias, líquido amniótico, lesões gástricas, sangue periférico e outros fluidos corporais¹⁵.

Além da NS outras fases da sífilis enfrentam dificuldades no diagnóstico laboratorial, como a sífilis materna e a sífilis congênita. Em um estudo retrospectivo com mulheres com sorologia reagente no VDRL, que tiveram óbito na gravidez (aborto,

natimorto e neomorto) foi realizada PCR em sangue periférico e o estudo demonstrou 72,7%, 24/33 das amostras amplificaram para *Treponema pallidum* ou seja, a infecção por *Treponema pallidum* na gestação estava ativa. Esta situação constata a carência no monitoramento diagnóstico da infecção e a falta de tratamento adequado no pré-natal. Nestas mesmas amostras, nos resultados que obtiveram discordância entre metodologias, como FTA-abs não-reagente e ELISA reagente, 68,7% das amostras obtiveram amplificação da PCR detectando a presença de *Treponema pallidum*. Neste contexto a PCR provê auxílio ao diagnóstico laboratorial e na vigilância da doença ⁶.

Em outro estudo, a utilização da PCR em amostras de lesões de pele e mucosas demonstrou excelente desempenho com alta especificidade (100%) e alta sensibilidade (92%), colaborando na resolução do diagnóstico em que houve discordância entre metodologias ¹¹. Neste mesmo estudo, em amostras de LCR sem diagnóstico para NS, a técnica de PCR demonstrou uma especificidade de 100%, pois em 23 amostras analisadas nenhuma obteve amplificação de DNA de *Treponema pallidum* pela PCR. Já em amostras de LCR com diagnóstico de NS, quatro de oito amostras, 50%, obtiveram amplificação pela PCR, apesar da pouca sensibilidade pode-se dizer que, se a PCR for positiva, a probabilidade de ter a doença é de 100%, o que confirma o diagnóstico de NS. Porém nas amostras em que a PCR foi negativa não é possível descartar a infecção. No entanto acredita-se que a pouca sensibilidade da PCR possa ser explicada pela baixa concentração de treponemas no LCR ²⁸. Das análises positivas na PCR apenas um indivíduo obteve aumento de proteínas e outro com aumento de células, demonstrando pouca concordância entre análise citológica do LCR com a NS. Por isso a proposta da utilização de novas metodologias para esclarecimento de casos de maior complexidade ¹¹.

Outro estudo avaliou a capacidade diagnóstica da PCR em amostras histológicas fixadas em parafina. Foram analisadas 36 amostras de biópsia de pele com diagnóstico sorológico a apresentações clínicas para sífilis. Das 36 amostras, 14 foram amplificadas pela PCR detectando a presença de *Treponema pallidum*. Observou-se que a qualidade das amostras estava diretamente relacionada à qualidade dos tecidos, pois na exclusão das amostras com comprometimento na qualidade do DNA, a PCR foi

positiva em quase todas as amostras com exceção de uma. Segundo o estudo, a partir da extração de DNA de amostras fixadas em parafina, a técnica demonstrou sensibilidade significativa contribuindo para o diagnóstico da sífilis ².

Apesar das dificuldades, como o cultivo impraticável de *Treponema pallidum*, tem se observado o aperfeiçoamento na utilização dessas técnicas revelando uma importante ferramenta diagnóstica para auxiliar nas fases mais críticas e para determinar se o tratamento está sendo suficiente ^{16 26}.

2.7. Tratamento

Desde a década de 1940, a penicilina se manteve como a droga treponêmica mais eficaz e de escolha para o tratamento de todas as formas de sífilis ^{21 24 4}. O resultado foi uma diminuição expressiva, porém não erradicada, na frequência de novos casos de NS clássica. A história natural da doença e as manifestações clínicas foram modificadas se tornando mais sutis e assintomáticas. Acredita-se que a uso desatencioso de antibióticos para diferentes infecções possa ter mudado o curso das manifestações ²¹.

Estudos indicam que o *Treponema Pallidum* pode persistir por longos períodos no SNC mesmo com tratamento adequado ²⁶. O CDC recomenda a administração de penicilina G cristalina em altas doses para o tratamento de NS diagnosticada. Nos casos de coinfeção com HIV estabelece os mesmos regimes de tratamento utilizados aos não infectados, com pós-tratamento mais intenso e acompanhamento sorológico ⁴.

Uma vez estabelecido o diagnóstico de NS a abordagem terapêutica consiste na administração de Penicilina G Cristalina intravenosa em quantidades que variam de 18 a 24 milhões de unidades por dia, por infusão contínua ou doses fracionadas, num período de 10 a 14 dias ^{7 11}. Estas recomendações consistem na capacidade deste regime atingir concentrações de penicilina no LCR suficientes para destruir as bactérias. (Marra 2004) O sucesso do tratamento em NS é julgado pela estabilização de

alterações clínicas e a normalização do LCR ^{7 30}. Segundo as diretrizes do CDC a contagem de leucócitos no LCR deve diminuir em 6 meses de tratamento até que os resultados se estabilizem, e normalizar em 2 anos após a conclusão do tratamento ^{30 34}.

Quando a terapia com penicilina não é viável, a utilização da doxiciclina é uma alternativa para o tratamento ¹³. Segundo a OMS, os regimes alternativos para indivíduos alérgicos à penicilina (exceto gestantes) consiste na administração de 200 mg doxiciclina por via oral, 2 vezes ao dia por 30 dias ou 500 mg de tetraciclina por via oral, 4 vezes ao dia por 30 dias. Até o momento, esquemas alternativos à penicilina para o tratamento da NS não foram sistematicamente determinados. Embora não esteja bem documentada, a eficácia das cefalosporinas de terceira geração podem ser úteis no tratamento da NS ³⁷.

3. Localização e Seleção dos Artigos

Para localizar o tema do estudo foi selecionado artigos científicos através do sistema de busca *PubMed-NCBI*. Os descritores utilizados foram: *Syphilis*, *PCR*, *Neurosyphilis*, *Fluid Cerebrospinal* e *Treponema pallidum*.

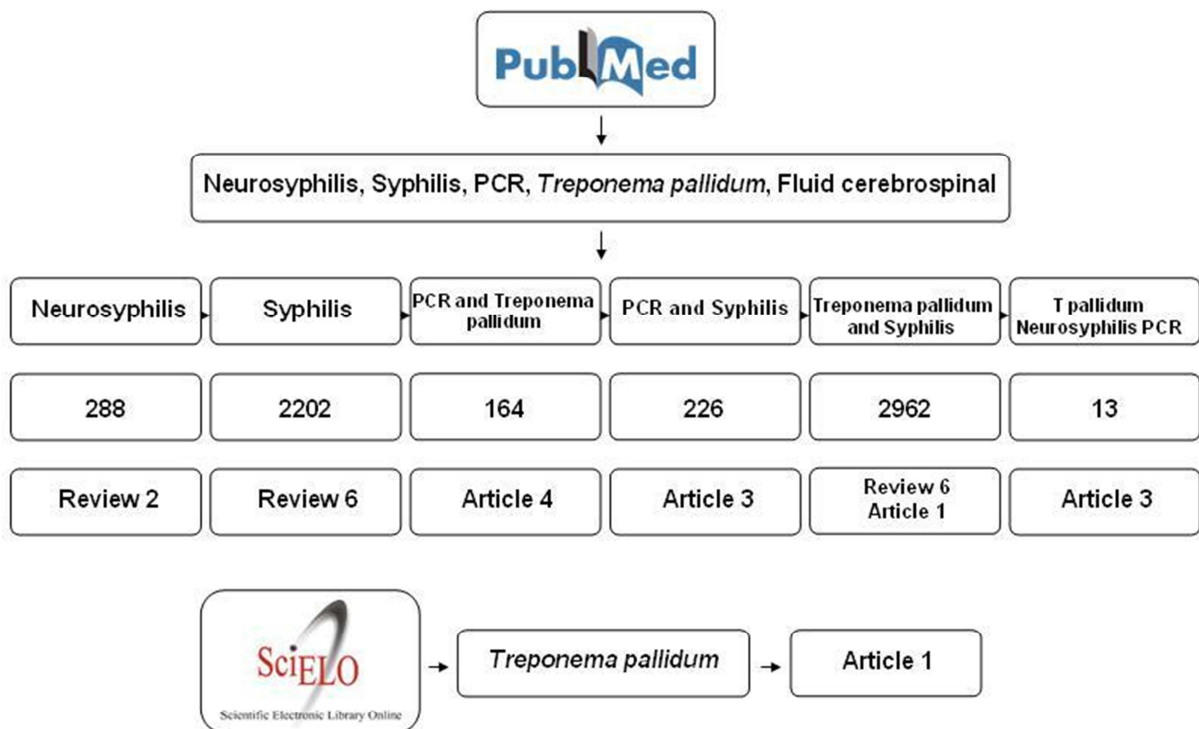


Figura 3 – Esquema de localização de artigos científicos

4. Marco Conceitual

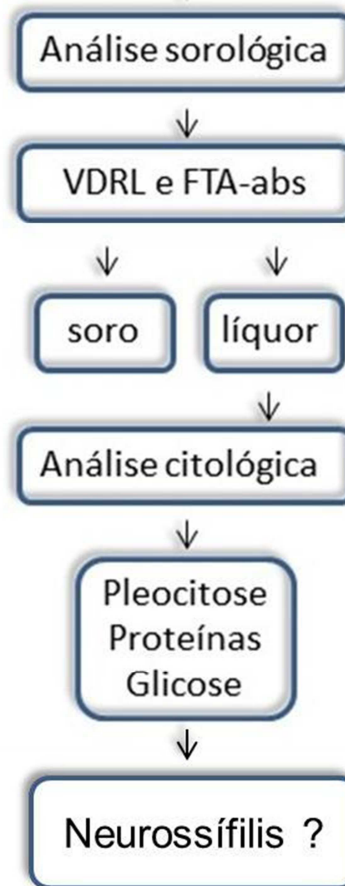


Figura 4 – O diagnóstico laboratorial da sífilis está baseado nas reações sorológicas treponêmicas e não treponêmicas, como o VDRL e o FTA-abs, no soro e no LCR. O método baseado somente nas reações sorológicas não atestam a presença do *Treponema pallidum* no LCR.

5. Justificativa

O diagnóstico de neurosífilis é freqüentemente dependente dos resultados dos testes sorológicos e alterações no LCR, porém a confiabilidade desses resultados em pacientes com infecção pelo HIV-1 tem sido questionada, especialmente em pacientes assintomáticos com sífilis latente.

6. Objetivos

6.1. Objetivo Geral

Avaliar a presença do DNA do *Treponema pallidum* através da técnica de PCR “seminested” em amostras de LCR de pacientes HIV positivos assintomáticos com diagnóstico de sífilis.

6.2. Objetivos Específicos

Padronizar uma técnica de PCR “seminested” para detectar *Treponema pallidum* em LCR.

7. Referências Bibliográficas

1. Almeida SM, Bhatt A, Riggs PK, Durelle J, Lazzaretto D, Marquie-Beck J, McCutchan A, et al. Cerebrospinal fluid human immunodeficiency virus viral load in patients with neurosyphilis. *J Neurovirol.* 2010; 16(1): 6-12.
2. Behrhof W, Springer E, Brauninger W, Kirkpatrick CJ, Weber A. PCR testing for *Treponema pallidum* in paraffin embedded skin biopsy specimens: test design and impact on the diagnosis of syphilis. *J Clin Pathol.* 2008; 61:390-395.
3. Behrouz R, Malek AR, Chichkova RI. Meningo-vascular syphilis: revisiting an old adversary. *Practical Neurology.* 2011; 32-37.
4. Blank LJ, Rompalo AM, Erbeding EJ, Zenilman JM, Ghanem KG. Treatment of syphilis in hiv-infected subjects: A systematic review of the literature. *Sex Transm Infect.* 2011; 87:9-16.
5. Burstain JM, Grimpel E, Lukehart SA, Norgard MV, Radolf JD. Sensitive detection of *Treponema pallidum* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1991; 62-69.
6. Casal CAD, Silva MO, Costa IB, Araújo EC, Corvelo TCO. Molecular detection of *Treponema pallidum* sp. *pallidum* in blood samples of vdrl-seroreactive women with lethal pregnancy outcomes: a retrospective observational study in northern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44(4):451-456.
7. Chahine LM, Khoriaty RN, Tomford WJ, Hussain MS. The changing face of neurosyphilis. *International Journal of Stroke.* 2011; 136–143.
8. Chang CC, Leslie DE, Spelman D, Chua K, Fairley CK, Street A et al. Symptomatic and asymptomatic early neurosyphilis in hiv-infected men who have sex with men: a retrospective case series from 2000 to 20. *Sex Health.* 2011; 8 207–213.
9. Conde-Sendín MA, Hernández-Fleta JL, Cárdenes-Santana MA, Amela-Peris R. Neurosífilis: formas de presentación y manejo clínico. *Rev Neurol* 2002; 35 (4): 380-386.
10. Fitzgerald T. In vitro cultivation of *Treponema pallidum*: a review. *Bulletin WHO.* 1981; 59 (S): 787-812.
11. García PC, Grassi BC, Fich FS, Salvo AL, Araya LC, Abarzúa FC, et al. Diagnóstico de la infección por *Treponema Pallidum* en pacientes con sífilis

- temprana y neurosífilis mediante reacción de la polimerasa en cadena. Rev Chil Infect. 2011; 28 (4): 310-315.
12. Genç M, Ledger WJ. Syphilis in pregnancy. Sex Transm Infect. 2000;76:73-79.
 13. Ghanem KG. Neurosyphilis: A Historical Perspective and Review. CNS Neuroscience Therapeutics. 2010; 16 157–168.
 14. Gomes BC, Nunes J, Pinto J, Gouveia P, Pais RP. Neuroimaging in human immunodeficiency virus infection. Acta Med Port. 2012; 25(S1):7-12.
 15. Grange PA, Gressier L, Dion PL, Farhi D, Benhaddou N, Gerhardt P, et al. Evaluation of a PCR test for detection of *Treponema pallidum* in swabs and blood. J Clin Microb. 2011; 546–552.
 16. Grimprel E, Sanchez PJ, George D, Wendel GD, Burstain JM, McCracken Jr GH, et al. Use of Polymerase Chain Reaction and rabbit infectivity testing to detect treponema pallidum in amniotic fluid, fetal and neonatal sera, and cerebrospinal fluid. J Clin Microb. 1991; 1711-1718.
 17. Hay PE, Clarke JR, Taylor-Robinson D, Goldmeier D. Detection of treponemal DNA in the CSF of patients with syphilis and HIV infection using the Polymerase
 18. Herbert LJ, Middleton SI. An estimate of syphilis incidence in eastern Europe. J Global Health. 2012; 2 N°1; 1-7.
 19. Ho EL, Lukehart SA. Syphilis: using modern approaches to understand an old disease. J Clin Invest. 2011; 121(12):4584-4592.
 20. Holman KM, Wolff M, Seña AC, Martin DH, Behets F, Damme KV, et al. RPR titer variation in the two weeks following syphilis therapy. Sex Transm Dis. 2012; 39(8): 645–647.
 21. Hotson JR. Modern Neurosyphilis: a partially treated chronic meningitis. West J Med. 1981;135:191-200.
 22. Jethwa HS, Schmitz JL, Dallabetta G, Behets F, Hoffman I, Hamilton H, et al. Comparison of molecular and microscopic techniques for detection of *Treponema pallidum* in genital ulcers. J Clin Microbiol. 1995; 180-183.
 23. Johnson RT. Microbiology of the Nervous System. Medical Microbiology 4th. In: Baron S. Galveston: University of Texas Medical Branch: 1996.

24. LaFond RE, Lukehart SA. Biological basis for syphilis. Clin Microb Reviews. 2006; 29-49.
25. Lambrecht F, Sá DS, Koerbel A, Tamanini A, Machareth SL, Scola RH, et al. Oclusão bilateral das artérias carótidas internas, sífilis meningovascular e Sida. Arq Neuropsiquiatr. 1999; 57(2-A):311-316.
26. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. Clin Microb Reviews. 1995; 1-21.
27. Liu H, Rodes B, Chen CY, Steiner B. New tests 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 Microb. 2001: 1941-1946.
28. Machado LR, Livramento JA, Vianna LC. Cerebrospinal fluid analysis in infectious diseases of the nervous system: when to ask, what to ask, what to expect. Arq Neuropsiquiatr. 2013;71(9-B):693-698.
29. Marra CM, Gary DW, Kuypers J, Jacobson MA. Diagnosis of neurosyphilis in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. J Infect Dis. 1996; 174:219-21.
30. Marra CM, Maxwell CL, Tantalo L, Eaton M, Rompalo AM, Raines C, et al. Normalization of cerebrospinal fluid abnormalities after neurosyphilis therapy: does hiv status matter? Clin Infect Dis. 2004; 38:1001-6.
31. Mehrabian S, Raycheva M, Traykova M, Stankova T, Penev L, Grigorova O, et al. Neurosyphilis with dementia and bilateral hippocampal atrophy on brain magnetic resonance imaging. BMC Neurology. 2012; 12:96.
32. Michelow IC, Wendel GD, Norgard MV, Zeray F, Leos Nk, Alsaad R, et al. New Engl J Med. 2002; vol 346 N°23.
33. Molepo J, Pillay A, Weber B, Morse SA, Hoosen AA. Molecular typing of *Treponema pallidum* strains from patients with neurosyphilis in Pretoria, south África. Sex Transm Infect. 2007; 83:189-192.
34. Nayak S, Acharjya B. VDRL test and its interpretation. Indian J Dermatol 2012; 57:3-8.
35. Noordhoek GT, Wolters EC, Jonge MEJ, Embden JDAV. Detection by Polymerase Chain Reaction of *Treponema pallidum* DNA in cerebrospinal fluid

- from neurosyphilis patients before and after antibiotic treatment. J Clin Microb. 1991, p. 1976-1984
36. Norris SJ, Edmondson DG. Factors affecting the multiplication and subculture of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in a tissue culture system infection and immunity. Infect Immunity. 1986; 534-539.
 37. Orientações para o tratamento de infecções sexualmente transmissíveis. Organização Mundial da Saúde. 2005: 1-101.
 38. Radolf JD. Treponema. Medical Microbiology 4th edition. In: Baron S. Galveston: University of Texas Medical Branch: 1996.
 39. Ratnam S. The laboratory diagnosis of syphilis. Can J Infect Dis Med Microb. 2005;16(1):45-51.
 40. Sífilis no Brasil. Departamento de DST, Aids e hepatites virais. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2012: 1-9. www.aids.gov.br
 41. Sífilis: Estratégias para diagnóstico no Brasil. Ministério da saúde secretaria de vigilância em saúde departamento de DST, Aids e hepatites virais. Ed 1 2010: 1-100.
 42. Timmermans M, Carr J. Neurosyphilis in the modern era. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2004;75:1727-1730.
 43. Vaitkus A, Krasauskaitė E, Urbonavičiūtė I. Meningovascular neurosyphilis: a report of stroke in a young adult. Medicina (Kaunas) 2010; 46(4):282-5.
 44. Vargas AP, Carod-Arta FJ, Negro MC, Rodrigues MPC. Demência por neurosífilis evolução clínica e neuropsicológica de um paciente. Arq Neuropsiquiatr. 2000; 58 (2-B): 578-582.
 45. Vigilancia epidemiológica de sífilis y gonorrea. Rev Chil Infect. 2013; 30 (3): 303-310.
 46. Villanueva AV, Podzorski RP, Reyes MP. Effects of various handling and storage conditions on stability of *Treponema pallidum* DNA in cerebrospinal fluid. J Clin Microb. 1998; 2117-2119.
 47. Wang YJ, Chi CY, Chou CH, Ho CM, Lin PC, Liao CH et al. Syphilis and neurosyphilis in human immunodeficiency virus-infected patients: a retrospective study at a teaching hospital in Taiwan. J Microb Immunol and Infect. 2012: 1-6.
 48. Wicher K, Noordhoek GT, Abbruscato F, Wicher V. Detection of *Treponema Pallidum* in early syphilis by DNA amplification. J Clin Microb. 1992: 497-500.

49. Zetola NM, Klausner JD. Syphilis and HIV Infection: an update. *Clin Infect Dis*. 2007; 44:1222-8.
50. Singh AE, Romanowski B. Syphilis: review with emphasis on clinical, epidemiologic and some biologic features. *Clin Microb Reviews*. 1999: 187–209.
51. Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>

8. Artigo em Inglês

Detection of *Treponema pallidum* by seminested PCR in the cerebrospinal fluid of asymptomatic HIV-infected patients with latent syphilis

Daniela D. Fraga, André L. Muller, Marcelo S. Czykiel, Yasser de Armas, Gustavo

Wissmann, Luciano Z. Goldani

Infectious Diseases Section, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Address correspondence to:

Luciano Z. Goldani PhD. MD
Section of Infectious Diseases
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Ramiro Barcelos 2350
Porto Alegre, RS 90630000
Brazil
Email: lgoldani@ufrgs.br

Abstract

Neurosyphilis diagnosis is frequently dependent upon the results of serological tests and cerebrospinal fluid abnormalities, but the reliability of findings in patients with HIV-1 infection has been questioned, especially in asymptomatic patients with latent syphilis. In this study, we present the data on the presence of *T. pallidum* DNA in CSF from asymptomatic HIV-infected patients with the diagnosis of syphilis. CSF and serum samples were collected from 12 HIV-infected patients attending a tertiary care located in southern Brazil, during the period 2012 to 2013. In CSF samples from five of 12 patients (40%), we detected *T. pallidum* DNA. Unexpectedly, in these patients, CSF cell count, protein and glucose levels were normal. In addition, none of these 5 CSF samples presented a positive VDRL reaction. Serum VDRL titers were similar between patients with positive and negative CSF *T. pallidum* DNA. Most patients with detectable *T. pallidum* DNA presented low serum VDRL titers. A higher serum VDRL titer of 1:64 was observed in only one patient. Our results have shown that asymptomatic HIV-infected patients with evidence of latent syphilis and normal CSF might present detectable *T. pallidum* DNA in the CSF. The detection of *T. pallidum* DNA by our seminested PCR provides additional information beyond conventional CSF analysis for diagnosis of neurosyphilis. The detection of *T. pallidum* DNA in the CSF despite normal CSF findings in HIV-infected patients could also provide a different therapeutic approach including the use of intravenous aqueous crystalline penicillin.

Introduction

Patients are often coinfecting with human immunodeficiency virus (HIV) and *Treponema pallidum* because both of these infections are sexually transmissible. *T. pallidum* invade and replicate in the central nervous system in HIV-infected patients shortly after exposure; and may repeatedly invade the CNS during the course of prolonged latent infections [1-3]. Syphilis has been a persistent public health challenge for centuries, and is now gaining renewed attention against the backdrop of the HIV pandemic. Recent data indicate a high global prevalence of both infections and a growing epidemic among men who have sex with men in Latin America, Europe, and North America [4].

T. pallidum, the causative agent of syphilis, cannot be cultured in vitro. Therefore, the detection of this microorganism in infected individuals depends either on insensitive microscopic methods or on inoculation of laboratory animals [5]. Therefore, diagnosis of neurosyphilis is frequently dependent upon the results of serological tests and cerebrospinal fluid abnormalities, but the reliability of findings in patients with HIV-1 infection has been questioned [6]. In this study, we present data on the presence of *T. pallidum* DNA in CSF from asymptomatic HIV-infected patients with the diagnosis of syphilis.

Methods

Patients and clinical specimens. CSF and serum samples were collected from 12 HIV-infected patients attending the Infectious Diseases Section of Hospital das Clínicas

de Porto Alegre, a tertiary care located in southern Brazil, during the period 2012 to 2013. The patients attended the clinics because they had HIV infection in combination with positive syphilis serology (VDRL and fluorescent treponemal antibody absorbent (FTA-abs)). All screened patients were asymptomatic with normal neurologic examination. Serum samples from these patients were positive in syphilis tests. In addition, all CSF were subjected to PCR detection *Treponema pallidum* DNA, cell count, biochemical, and serological analysis.

Sample preparation for PCR: *Treponema pallidum* DNA extraction from CSF was performed by using the PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, USA). In summary, CSF samples of 1 mL of CSF were centrifuged for 10 min at 10,000 x g in a microcentrifuge. The pellet was suspended in 200 ul of lysis buffer consisting of 50 mM Tris hydrochloride (pH 8.5), 50 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 2 mM dithiothreitol, 20 ul proteinase K (100 ,ug/ ml), and . 20 ul RNAse (100 µg/ml). After 20 min of incubation at 60°C, the samples were heated for 10 min at 100°C t o inactivate the proteinase K and to denature the DNA. DNA was added to 200µl of 100% ethanol and homogenized by vortexing. 640µl of the material was transferred to a filter tube (column), centrifuged for 1 minute at 13,000 RPM and disposed in collector tube. The filter was placed in another collection tube, added 500µl of wash buffer and centrifuged 1 minute at 10,000 RPM. This procedure was repeated with wash buffer 2. Finally, the filter with concentrated DNA was washed with an elution and stored in 50 µl.

PCR detection of *Treponema pallidum*. Semi-nested PCR was performed initially with two primers encoding the membrane protein of 47 kDa *Treponema pallidum* (KO3A `5 GAAGTTTGTCCCAGTTGCGGTT 3´; KO4 5´´CAGAGCCATCAGCCCTTTTCA 3´). The

first round PCR consisted of 5µl of DNA sample in a total volume of 25µl, with 20mM Tris-HCl, (pH 8.4; 50mM KCl), 1.5mM of MgCl₂, 1U of *Taq* polymerase (Invitrogen, Brazil), and 0.25mM of dNTP (Amresco). The primers used in the first round of the reaction were described by Palmer et al and amplify a fragment of 260 pb [7,8]. In the second round, the reaction mixture of the second round PCR was identical, except that 1µl of the first reaction product and were used the primer pair KO4 and YDA (´5 GAAGACTCCCGCGTTACGG´3), a primer designed in this study using the calculator program Oligonucleotide ([www.basic.northwestern.edu / BIOTOOLS / oligocalc.html](http://www.basic.northwestern.edu/BIOTOOLS/oligocalc.html)). The reaction amplify a fragment of 100 bp. Positive controls included *Treponema pallidum* DNA extracted from sperm previously described in a model of experimental syphilitic orchitis in rabbits (kindly provided by Dr. Marise Ansensi) [9]. Negative control CSF specimens were derived from persons attending the hospital for reasons other than a spirochetal infection. This study was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

Results

CSF samples from 12 HIV-infected patients with syphilis were tested for the presence of *Treponema pallidum* DNA. Table 1 shows the characteristics of 12 HIV-infected patients with the diagnosis of syphilis. Most of the patients were males (66%) and mean age were 40 years. In CSF samples from 5 of 12 patients (40%), we detected *Treponema pallidum* DNA (figure 1). Unexpectedly, in these patients, CSF cell count, protein and glucose levels were normal. In addition, none of these 5 CSF samples presented a positive VDRL reaction. This group of patients included three patients who were

previously treated with intramuscular benzathine penicillin. Serum VDRL titers were similar between patients with positive and negative CSF *T. pallidum* DNA. Most patients with detectable *T. pallidum* DNA presented low serum VDRL titers. Serum VDRL titer of 1:64 was observed in one patient. The majority of the patients were taking HAART including those with detectable and non-detectable *T. pallidum* DNA. Except from one patient, all patients with detectable *T. pallidum* DNA had a T-CD4 lymphocyte count lower than 300/mm³.

Discussion

Asymptomatic CNS involvement at the time of syphilis infection is common, but not more common in HIV-infected persons than in uninfected persons.[10,11] *T pallidum* was found in the CSF of 12 of 40 (30%) patients with primary or secondary syphilis and no neurologic symptoms, including 3 of 10 (30%) HIV-infected patients. [12] Another report identified *T pallidum* in the CSF in 32 of 131 (24%) patients with early syphilis, including 11 of 43 (26%) HIV-infected patients [13]. Whether neurologic complications of syphilis occur more frequently and earlier in HIV-infected patients has not been evaluated definitively. Most cases of early neurosyphilis in HIV-infected individuals, however, are currently identified at the initial syphilis diagnosis in patients with CD4 counts less than 200 cells/ μ L [14]. Therefore, most experts believe that HIV-infected patients with early syphilis have an increased risk of neurologic complications, but the magnitude of any such risk is uncertain.

The CDC's current STD treatment guidelines recommend CSF examination in individuals diagnosed with late latent syphilis, syphilis of unknown duration, neurologic

signs or symptoms, or suspected treatment failure [15]. The poor sensitivity associated with *Treponema* detection by microscopic techniques leaves the clinician to depend mainly on anti-*T. pallidum* antibody tests to make the diagnosis. However, in cases of early primary syphilis, latent syphilis, and congenital syphilis, serologic tests are not always positive. [16] In some cases, these serologic tests have been reported to be negative, even when *T. pallidum* could be cultivated from CSF. Until improved diagnostic tests are available, clinicians may wish to initiate treatment for neurosyphilis when serologic tests for syphilis are positive, CSF leukocyte count and protein concentration are elevated but the CSF VDRL test result is negative, and all other possible etiologies have been excluded [17].

Specific and sensitive detection of microorganisms can be performed quickly after amplification of DNA by the polymerase chain reaction (PCR) . This method theoretically allows the detection of a single microorganism, and it has been proven to be of special value for the diagnosis of infectious agents that are difficult to cultivate, such as *Mycobacterium leprae*, human papillomavirus, and *T. pallidum*. PCR is a useful diagnostic tool in ulcers, especially when serology is still negative and in medical settings with a high prevalence of syphilis [18]. *T. pallidum* DNA PCR on CSF has not provided more information than conventional CSF analysis for the diagnosis of neurosyphilis in the current clinical setting [19].

Our results have shown that asymptomatic HIV-infected patients with evidence of latent syphilis and normal CSF might present detectable *T. pallidum* DNA in the CSF. The detection of *T. pallidum* DNA by our seminested PCR provides additional information beyond conventional CSF analysis for diagnosis of neurosyphilis. The

detection of *T. pallidum* DNA in the CSF despite normal CSF findings in HIV-infected patients could also provide a different therapeutic approach including the use of aqueous crystalline penicillin administered as 18-24 million units intravenously per day; for 10-14 days. Further prospective study is needed to determine the role of detection of *T. pallidum* DNA in CSF in asymptomatic HIV-infected patients.

Acknowledgements:

We would like to thank Dr. Marise D. Ansensi for her assistance in the this study. This study was supported in part by CNPq (Brazilian National Council of research).

Conflict of interest:

The authors declare no conflict of interest.

Table 1. Characteristic of the HIV infected patients with positive VDRL e FTA-abs serum tests evaluated for the presence of CSF *T. pallidum* DNA

| | Age /Sex | Previous syphilis | Treated For syphilis | Serum VDRL | CD4 count | HAART | CSF VDRL | CSF cells | CSF Protein mg/dl | CSF Glucose mg/dl | CSF PCR TP |
|----|----------|-------------------|----------------------|------------|-----------|-------|----------|-----------|-------------------|-------------------|------------|
| 1 | 40/M | none | no | 1/8 | 765 | yes | Neg. | 3 | 43 | 63 | Neg. |
| 2 | 28/M | none | no | 1/1 | 43 | no | Neg. | 1 | 31 | 57 | Neg. |
| 3 | 47/M | yes | yes | 1/16 | 75 | no | Neg. | 1 | 49 | 57 | Neg. |
| 4 | 15/F | none | no | 1/64 | 423 | yes | Pos. | 3 | 26 | 53 | Neg. |
| 5 | 29/F | yes | yes | 1/8 | 251 | yes | Neg. | 1 | 21 | 56 | Pos. |
| 6 | 48/M | yes | yes | 1/64 | 128 | no | Neg. | 2 | 36 | 61 | Pos. |
| 7 | 43/M | yes | yes | 1/8 | 581 | yes | Neg. | 3 | 24 | 59 | Pos. |
| 8 | 58/M | none | no | 1/8 | 1025 | yes | Neg. | 1 | 25 | 65 | Pos. |
| 9 | 39/F | none | no | 1/2 | 410 | yes | Neg. | 3 | 30 | 61 | Neg. |
| 10 | 51/M | none | no | 1/64 | 418 | yes | Pos. | 25 | 137 | 60 | Neg. |
| 11 | 37/F | none | no | 1/4 | 184 | yes | Neg. | 1 | 37 | 47 | Neg. |
| 12 | 47/M | none | no | 1/16 | 180 | yes | Neg. | 2 | 22 | 61 | Pos. |

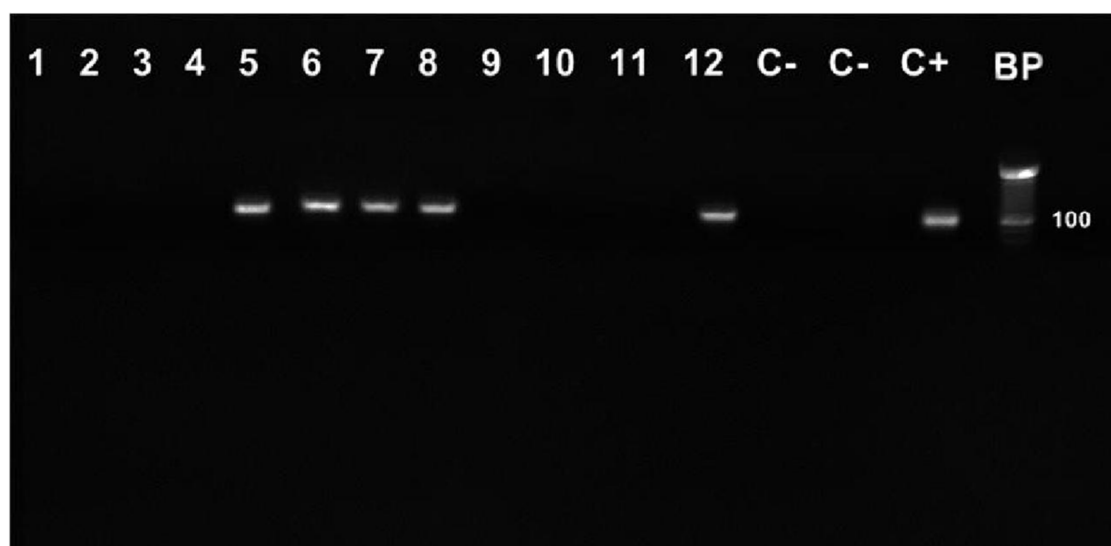


Figure 1. PCR analysis of CSF samples for detection of *T. pallidum* DNA; positive reactions present a 100 bp band; C- negative controls; C+ positive control.

References

1. Johns DR, Tierney M, Felsenstein D. Alteration in the natural history of neurosyphilis by concurrent infection with the human immunodeficiency virus N Engl J Med 1987; 316:1569-72
2. Wasserheit JN. Epidemiological synergy. Interrelationships between human immunodeficiency virus infection and other sexually transmitted diseases. Sex Transm Dis 1992; 19:61-77.
3. Singh A. E., Romanowski B. Syphilis: Review with Emphasis on Clinical, Epidemiologic, and Some Biologic Features. Clin Microbiol Rev, Apr. 1999, p. 187–209.
4. Cohen SE, Klausner JD, Engelman J, Philip S. Syphilis in the modern era: an update for physicians. Infect Dis Clin North Am. 2013;27:705-22
5. Lafond R. E., Lukehart S. A. Biological Basis for Syphilis. Clin Microbiol Rev. 2006, 1:29–49.
6. Larsen S. A., Steiner B. M., Rudolph A. H. Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis. Clin Microbiol Rev, 1995, 8:1–21.
7. Weigel LM, Radolf JD, Norgard MV. The 47-kDa major lipoprotein immunogen of *Treponema pallidum* is a penicillin-binding protein with carboxypeptidase activity. Proc. Natd. Acad. Sci. USA; 1994; 91:11611-11615.
8. Palmer H. M., Higgins S. P., Herring A. J., Kingston M. A. Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. Sex Transm Infect 2003; 79:479–483.
9. Sell S, Baker-Zander S, Powell HC. Experimental syphilitic orchitis in rabbits: ultrastructural appearance of *Treponema pallidum* during phagocytosis and dissolution by macrophages in vivo. Lab Invest. 1982;46:355-64.

10. Berger JR. Neurosyphilis in human immunodeficiency virus type 1-seropositive individuals. A prospective study. *Arch Neurol* 1991; 48:700-2
11. Katz DA, Berger JR. Neurosyphilis in acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Neurol* 1989; 46:895-8.
12. Lukehart SA, Hook EW, 3rd, Baker-Zander SA, Collier AC, Critchlow CW, Handsfield HH. Invasion of the central nervous system by *Treponema pallidum*: implications for diagnosis and treatment. *Ann Intern Med* 1988; 109:855-62.
13. Rolfs RT, Joesoef MR, Hendershot EF, Rompalo AM, Augenbraun MH, Chiu M, Bolan G, Johnson SC, French P, Steen E, Radolf JD, Larsen S. A randomized trial of enhanced therapy for early syphilis in patients with and without human immunodeficiency virus infection. The Syphilis and HIV Study Group. *N Engl J Med* 1997; 337:307-14.
14. Inungu J, Morse A, Gordon C. Neurosyphilis during the AIDS epidemic, New Orleans, 1990-1997. *J Infect Dis* 1998; 178:1229.
15. Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2002. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep* 2002; 51:1-78.
16. Tomberlin MG, Holtom PD, Owens JL, Larsen RA. Evaluation of neurosyphilis in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Clin Infect Dis* 1994; 18:288-94.
17. Feraru ER, Aronow HA, Lipton RB. Neurosyphilis in AIDS patients: initial CSF VDRL may be negative. *Neurology* 1990; 40:541-3.
18. Gayet-Ageron A, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger TV, Combescure C. Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis: a systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect.* 2013;89:251-6.
19. Marra CM, Gary DW, Kuypers J, Jacobson MA. Diagnosis of neurosyphilis in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis.* 1996;174:219-21.

9. Considerações Finais

Nossos resultados demonstraram que os pacientes assintomáticos infectados pelo HIV com evidência de sífilis latente e LCR normais podem apresentar DNA de *T. pallidum* detectável no LCR. A detecção do DNA do *T. pallidum* pelo nosso seminested PCR pode fornecer informações adicionais além da análise convencional do LCR para o diagnóstico de neurosífilis. A presença do DNA de *T. pallidum* no LCR em pacientes infectados pelo HIV com sífilis latente e resultados de LCR normais pode determinar uma mudança terapêutica do uso de penicilina benzatina intramuscular para o de penicilina cristalina intravenosa aquosa para o tratamento da sífilis.

10. Anexos

Anexo I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do estudo:

Número do protocolo: _____

Instituições:

Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Pesquisadores responsáveis:

Professor Dr. Luciano Zubaran Goldani Fone: (51) 9714-2565
Daniela Duarte de Fraga Fone: (51) 8118-5996

Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA. Fone: (51)3359-8304

Nome do participante: _____

Prezado senhor (a):

Você está sendo convidado(a) a responder algumas perguntas de forma totalmente voluntária. Antes de concordar em participar da pesquisa e responder algumas perguntas é muito importante que você compreenda as informações e instruções neste documento.

Os pesquisadores poderão esclarecer qualquer dúvida da pesquisa antes que você decida participar e o direito de desistir do estudo a qualquer momento sem nenhuma penalidade.

Objetivo da Pesquisa

Procedimentos

Para participar da pesquisa você terá que apenas responder algumas perguntas.

Possíveis Benefícios

Este estudo contribuirá para utilização de uma técnica laboratorial adicional (PCR) que auxiliará nos estudos sobre Neurosífilis visando melhoria no tratamento. Para os participantes voluntários, este exame adicional (PCR) será utilizado sem qualquer custo.

O senhor (a) **NÃO** será submetido à coletas de sangue, líquido ou qualquer outro procedimento além dos que já fazem parte da rotina do Laboratório de Infectologia do HCPA.

Riscos

O preenchimento deste questionário não representará qualquer risco físico ou psicológico para o senhor(a).

Privacidade

Todas as informações contidas neste estudo serão armazenadas com privacidade e poderão ser publicadas somente para finalidade científica.

Sigilo

As informações fornecidas serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Os participantes da pesquisa não serão identificados em nenhum momento mesmo quando os resultados da pesquisa forem divulgados.

Consentimento

Declaro ter lido ou ouvido as informações contidas neste formulário.

Me foi dada a oportunidade de perguntar e esclarecer todas as minhas dúvidas, sendo assim, torno-me participante voluntário(a) deste estudo.

Assinatura Entrevistado

Assinatura Responsável (Menores de 18 anos)

Assinatura Pesquisador Responsável

Assinatura da testemunha

Porto Alegre, _____ de _____ de 20 _____.

Anexo II

CRITERIOS DE INCLUSÃO PARA O ESTUDO

Exames realizados:

| | | |
|--|------------------------------|-------|
| 1. Já teve Sífilis? | | |
| <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não | Data: |
| 2. Já fez tratamento anteriormente para Sífilis? | | |
| <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não | Data? |
| Contra-indicação para o uso de Penidlina? | | |
| <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não | |

| | | | |
|---|------------------------------|---|-------|
| 1. Teste HIV positivo? | | | |
| <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não | Data: | |
| 2. Teste VDRL positivo no soro? | | | |
| <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não | Título: | Data: |
| 3. Teste FTA-abs positivo no soro? | | | |
| <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não | <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo | Data: |
| 4. Células no <u>líquor</u> (Pleocitose): | | | |
| Valor: | | Data: | |
| 5. Proteínas no <u>líquor</u> (Hiperproteinorraquia): | | | |
| Valor: | | Data: | |
| 6. Teste VDRL positivo no <u>líquor</u> ? | | | |
| <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não | Título: | Data: |
| 7. Teste FTA-abs positivo no <u>líquor</u> ? | | | |
| <input type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não | Título: | Data: |

Anexo III

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

Preencher os dados de identificação a seguir:

Nome completo: _____

Prontuário nº: _____

Data de nascimento : ____/____/____ Sexo: Masculino () Feminino () Idade:

Estado civil: _____

Endereço Residencial: _____

Número: _____ Bairro: _____

Cidade: _____

Natural de: _____

Telefone Residencial: _____

Telefone Celular: _____

Profissão/Atividade: _____