

## Carga treponémica em amostras biológicas correspondentes a diferentes fases clínicas de sífilis

*Treponema pallidum* loads in biological samples associated with distinct syphilis outcomes

Miguel Pinto<sup>1</sup>, Minia Antelo<sup>1</sup>, Rita Ferreira<sup>1</sup>, Jacinta Azevedo<sup>2</sup>, Irene Santo<sup>2</sup>, Maria José Borrego<sup>1</sup>, João Paulo Gomes<sup>1</sup>

miguel.pinto@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório de Referência de Infecções Bacterianas Sexualmente Transmissíveis. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Clínica de Doenças Sexualmente Transmissíveis, Centro de Saúde da Lapa.

### \_Resumo

Sífilis, a doença sexualmente transmitida causada por *Treponema pallidum*, apresenta diferentes manifestações clínicas. No entanto, os fatores que levam às diversas progressões da doença permanecem desconhecidos. Este estudo teve como objetivo a quantificação da carga treponémica, em diversas amostras biológicas, para contribuir para uma melhor compreensão da doença. Analisaram-se 309 amostras de DNA de distintos locais anatómicos associados a diferentes manifestações de sífilis. Uma quantificação absoluta por PCR em tempo-real foi utilizada para quantificar precisamente o número de células treponémicas e humanas, e calcular a carga treponémica em cada amostra. Os exsudados de lesões primárias apresentaram as cargas treponémicas mais elevadas contrastando com as amostras sanguíneas. Uma grande dispersão de concentrações bacterianas foi observada nas amostras sanguíneas dos casos de sífilis secundária. *T. pallidum* foi detetado em 37 amostras de indivíduos seronegativos e em 13 casos de sífilis tratada. Este estudo sugere um cenário onde a sífilis poderá ser caracterizada por: i) cargas elevadas e heterogéneas na sífilis primária, refletindo a duração do desenvolvimento e resolução da lesão; ii) uma potencial capacidade replicativa de *T. pallidum* na corrente sanguínea, sugerida pela elevada dispersão de concentrações na sífilis secundária; e iii) uma evasão bacteriana quer ao sistema imunitário do hospedeiro quer ao tratamento antibiótico.

### \_Abstract

Syphilis is the sexually transmitted disease caused by *Treponema pallidum*, which presents distinct clinical manifestations posing different implications for diagnosis. Nevertheless, the inherent factors leading to diverse disease progressions are still unknown. We aimed to assess the association between treponemal loads and dissimilar disease outcomes, to better understand syphilis. We analyzed 309 DNA samples from distinct anatomic sites associated with particular syphilis manifestations. An absolute quantitative real-time PCR procedure was used to precisely quantify the number of treponemal and human cells to calculate *T. pallidum* loads in each sample. Exudates from primary lesions presented the highest *T. pallidum* loads in contrast with blood-derived samples. High dispersion of *T. pallidum* concentrations was observed in blood-derived samples from secondary syphilis. *T. pallidum* was detected in substantial amounts in 37 samples of seronegative individuals and in 13 cases considered as syphilis-treated. This study suggests a scenario where syphilis may be characterized by: i) heterogeneous and high treponemal loads in primary syphilis, reflecting dissimilar duration of chancres development and resolution; ii) potential replication capability of *T. pallidum* while in the bloodstream, suggested by high dispersion of bacterial concentrations in secondary syphilis cases; and iii) bacterial evasiveness, either to the host immune system or antibiotic treatment.

### \_Introdução

*Treponema pallidum* subsp. *pallidum* (*T. pallidum*) é a espiroqueta responsável pela sífilis. Esta bactéria infeta o ser humano e transmite-se durante a gravidez da mãe para o feto, por transfusão sanguínea mas, sobretudo, por contacto sexual, enquadrando-se, por isso, no âmbito das infeções sexualmente transmissíveis (IST) (1, 2). Em 2008, a Organização Mundial da Saúde estimou em 10,6 milhões o número de novos casos de sífilis em adultos em todo o Mundo (3). A sífilis é classificada como congénita ou adquirida. A sífilis adquirida é definida como sífilis recente (i.e. manifestações clínicas até 1 ano após lesão primária) e sífilis tardia (i.e. manifestações clínicas mais de um ano depois da lesão primária). Durante a sífilis recente ocorre lesão primária, i.e. uma úlcera indolor no local anatómico em que ocorreu a infeção, à qual poderão seguir-se, cerca de três semanas depois, sinais clínicos de sífilis secundária, i.e. úlceras e lesões mucocutâneas. Posteriormente e caso a infeção não seja diagnosticada e tratada, a doença pode entrar numa fase de latência, assintomática, ou progredir para sífilis terciária, durante a qual o sistema cardiovascular ou o sistema nervoso central são comprometidos, ocorrendo as consequentes manifestações clínicas (1, 2).

A nível laboratorial, a sífilis pode ser diagnosticada com recurso à serologia, que inclui testes treponémicos e não-treponémicos (4), ou por métodos de deteção da bactéria, nos quais se destacam as técnicas de amplificação génica (5). O contributo das diferentes técnicas laboratoriais, utilizadas no diagnóstico da sífilis, varia consoante a fase da doença. A título de exemplo, durante a fase de sífilis primária os métodos moleculares terão mais sucesso do que a serologia, a qual terá maior contributo durante as manifestações de sífilis secundária (5).

## \_Objetivo

É objetivo deste estudo a quantificação da carga treponémica, em diversas amostras biológicas que refletem as diversas fases da sífilis, de modo a poder contribuir para uma melhor compreensão da doença e das respetivas manifestações clínicas.

## \_Materiais e métodos

Foi utilizada uma amostra de conveniência, que incluiu 309 amostras de DNA extraído de produtos biológicos positivos para *T. pallidum* (tabela 1) na sua maioria provenientes de utentes da consulta de doenças sexualmente transmissíveis do Centro de Saúde da Lapa em Lisboa. Do total de amostras biológicas recebidas 42,7% (132/309) eram lesões penianas e 19,1% (59/309) foram sangue total. A maioria das amostras biológicas foram obtidas de infeções primárias (53,7%; 166/309). Os resultados dos testes serológicos de sífilis foram maioritária e gentilmente cedidos pelos clínicos da consulta acima referida.

A quantificação por PCR em tempo real (qPCR) foi efetuada recorrendo à tecnologia LightCycler® 480 SYBR Green (Roche Diagnostics), que permitiu quantificar o número de células de *T. pallidum* e de células humanas em cada amostra, por forma a obter um resultado normalizado, o qual será denominado daqui em diante como “carga de *T. pallidum*” para cada amostra. Em paralelo, também se normalizou o número de células de *T. pallidum* por exsudado (para as lesões) ou por mililitro (para sangue, LCR e humor vítreo), tendo em conta todo o processo de extração de DNA das amostras recebidas (i.e., volume de colheita, e de diluição e de eluição), de forma a minimizar o efeito da amostragem.

## \_Resultados e discussão

Observou-se uma grande dispersão tanto em termos de concentração de células humanas como de *T. pallidum* por amostra (gráfico 1), o que no primeiro caso poderá reflectir diferentes condições de colheita e no segundo as diferentes fases da sífilis em que o doente se encontrava quando foi efetuada a colheita da amostra biológica. Nos exsudados de lesões, as mais baixas concentrações de *T. pallidum* coincidiram com a fase de sífilis secundária, exceto quando esta fase ocorre como *condylomata lata*; nestes casos, verificaram-se as concentrações bacterianas

Tabela 1: Distribuição das amostras biológicas por tipo e fase clínica de sífilis.

Número de amostras (n=309)	
Tipo de amostra biológica	
Lesão peniana	132
Lesão anal	40
Lesão vaginal	12
Lesão de língua	5
Lesão da orofaringe	2
Lesão do escroto	2
Lesão labial	1
Sangue total	59
PBMC isolados	46
LCR	7
Placenta	2
Humor vítreo	1
Tipo de sífilis	
Primária	166
Secundária	52
Secundária com <i>condylomata lata</i>	13
Primária e secundária	34
Terciária (neurosífilis)	7
Tratada <sup>1</sup>	13
Latente recente <sup>2</sup>	9
Latente indeterminada <sup>2</sup>	12
Congénita	3
Teste serológico (não-treponémico / treponémico)	
Ambos positivos	216
Apenas um tipo de teste positivo	37
Ambos negativos	37
n.a.	19

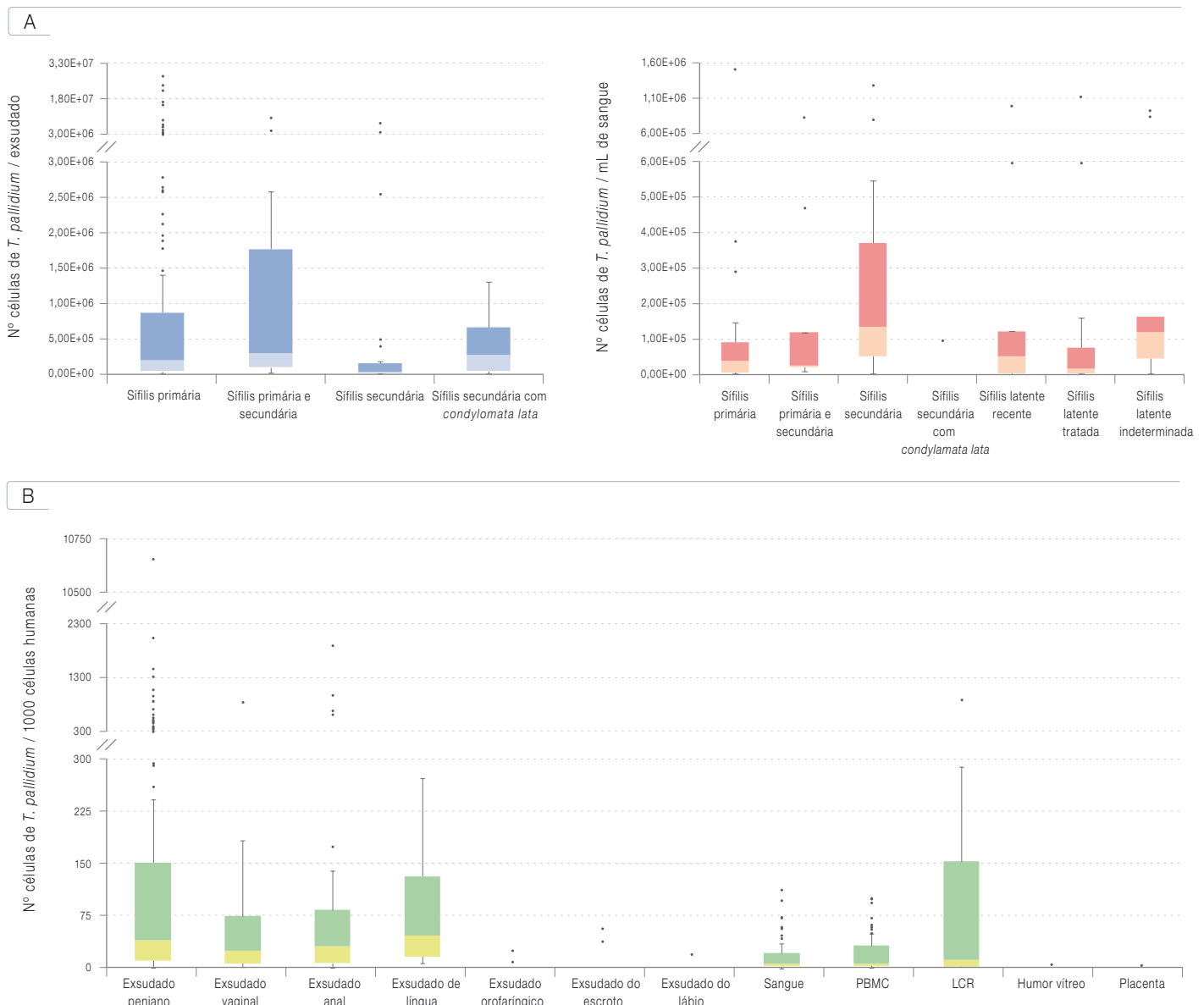
1 - considerada tratada quando após administração de antibiótico ocorreu desaparecimento dos sinais clínicos e um decréscimo de 4 vezes do título serológico. 2 - fase assintomática classificada pelos clínicos como sífilis latente recente ou latente indeterminada, de acordo com os resultados dos testes serológicos e com a história clínica. n.a. - não aplicável. PBMC - células mononucleares do sangue periférico. LCR - Líquido cefalorraquidiano.

artigos breves\_ n. 5

mais elevadas, talvez por se tratar de manifestações numa zona mucosa, eventualmente mais propícia à replicação da espiroqueta. As concentrações mais elevadas foram observadas em amostras de lesões de indivíduos que apresentavam simultaneamente sinais clínicos de sífilis primária e secundária. Contrariamente, e para o caso dos produtos biológicos sangue total e PBMC, as amostras colhidas durante a fase de sífilis secundária apresentaram uma enorme distribuição de valores de carga de *T. pallidum*, sugerindo uma vasta disseminação bacteriana, que seria hipoteticamente explicável pela capacidade de replicação de *T. pallidum* na corrente sanguínea.

Foi também possível observar uma quantidade substancial de *T. pallidum* nos 13 casos de sífilis considerada tratada (gráfico 1), permitindo especular que *T. pallidum* poderá manter-se em nichos anatómicos, nos quais o antibiótico chegará em concentrações subterapêuticas. A possibilidade das concentrações de *T. pallidum* em indivíduos tratados ser devida a bactérias mortas em circulação não parece razoável, já que foi demonstrado que o DNA de *T. pallidum* é removido da corrente sanguínea nas 56 horas que se seguem à toma da terapêutica antibiótica (6).

Gráfico 1: ▾ Distribuição do número de células de *T. pallidum* nas amostras biológicas (diferentes exsudados e sangue total) por fase clínica de sífilis (A). Distribuição da carga de *T. pallidum* por amostra biológica (B).



As cargas de *T. pallidum* foram determinadas como a razão de células bacterianas por 1000 células humanas.

Foi observada uma vasta gama de valores de carga de *T. pallidum*, em todos os tipos de amostra biológica estudados, o que poderá refletir os diferentes quadros clínicos de sífilis, assim como o momento de evolução da doença à data em que o diagnóstico foi efetuado. Por exemplo, de acordo com a literatura, as úlceras primárias têm um período de incubação relativamente longo (entre 10 e 90 dias), resolvem-se espontaneamente em 4 a 6 semanas, mas podendo ser ainda perceptíveis no início do desenvolvimento da sífilis secundária (1). Neste estudo, em apenas 6 das 309 amostras foram observadas cargas treponémicas com uma razão superior a 1000, o que poderá ter coincidido com colheitas feitas no pico do desenvolvimento da úlcera. Curiosamente, as amostras de LCR apresentaram cargas elevadas de *T. pallidum*, uma observação que pode ser devida à ausência de células humanas neste tipo de amostra biológica, situação que tecnicamente poderá favorecer a deteção da bactéria. As amostras de sangue total e fração PBMC tiveram globalmente os valores mais baixos de carga treponémica. Não obstante, foram detetados treponemas em amostras de sangue colhidas em todas as fases da doença e mesmo nos casos de sífilis tratada.

Acresce que, não se observou uma relação entre as cargas de *T. pallidum* e os resultados dos testes serológicos não-treponémicos. De facto, *T. pallidum* foi quantificável em todos os casos para os quais os resultados serológicos foram conhecidos (290/309), incluindo 37 casos com serologia negativa, os quais apresentavam sintomas compatíveis com sífilis. Esta constatação poderá refletir a baixa sensibilidade dos testes serológicos no diagnóstico da sífilis, que se poderá justificar por uma resposta imunitária pouco expressiva em consequência da composição da membrana exterior de *T. pallidum*, fundamentalmente constituída por proteínas transmembranares pouco imunogénicas (1, 2). Tal constatação poderá justificar a existência de fases de latência, variáveis entre meses e anos, durante as quais a bactéria se dividirá muito lentamente, sendo que os fatores que desencadeiam a reativação da infeção permanecem ainda desconhecidos.

## \_Conclusões

Em suma, a vasta gama de cargas treponémicas observadas nas lesões clínicas refletem a heterogeneidade da sífilis primária, enquanto as elevadas concentrações de *T. pallidum* no sangue, durante a sífilis secundária, poderão dever-se à disseminação da bactéria nesta fase e sugere a uma potencial capacidade replicativa da mesma na corrente sanguínea. O número considerável de espiroquetas na corrente sanguínea, após o tratamento e em indivíduos seronegativos para a sífilis, indicia que a bactéria possa, nalguns casos, permanecer inacessível em nichos anatómicos. Isto é, *T. pallidum* poderá por um lado não ser erradicado pelo tratamento antibiótico e, por outro, poderá de alguma forma iludir o sistema imunitário do hospedeiro, provavelmente devido à composição pouco imunogénica da sua membrana externa.

Um estudo mais alargado, compreendendo a determinação das cargas de *T. pallidum* em diferentes amostras biológicas colhidas durante fases distintas de evolução da sífilis, poderá suportar e facilitar a compreensão de alguns resultados do presente estudo relativos à biologia do *T. pallidum* e ao processo multifásico da sífilis.

## Financiamento e agradecimento:

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (EXPL/BIA-MIC/0309/2013). Agradece-se à Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

## Referências bibliográficas:

- (1) Lafond RE, Lukehart SA. Biological basis for syphilis. Clin Microbiol Rev. 2006;19(1):29-49. Review. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/16418521/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/16418521/)
- (2) Ho EL, Lukehart SA. Syphilis: using modern approaches to understand an old disease. J Clin Invest. 2011;121(12):4584-92. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3225993/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3225993/)
- (3) World Health Organization. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections – 2008. Geneva: WHO, 2012. [www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/2008\\_STI\\_estimates.pdf](http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/2008_STI_estimates.pdf).
- (4) Pastuszczyk M, Wojas-Pelc A. Current standards for diagnosis and treatment of syphilis: selection of some practical issues, based on the European (IUSTI) and U.S. (CDC) guidelines. Postepy Dermatol Alergol. 2013;30(4):203-10. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3834708/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3834708/)
- (5) Heymans R, van der Helm JJ, de Vries HJ, et al. Clinical value of Treponema pallidum real-time PCR for diagnosis of syphilis. J Clin Microbiol. 2010;48(2):497-502. Epub 2009 Dec 9. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2815629/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2815629/)
- (6) Tipple C, Jones R, McClure M, et al. Rapid Treponema pallidum clearance from blood and ulcer samples following single dose benzathine penicillin treatment of early syphilis. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(2):e0003492. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4336135/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4336135/)