UPPSALA
UNIVERSITET

Syfilis- ingen lätt infektion att diagnosticera

Treponema pallidum

Noura Alwalai

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2010
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Syfilis- ingen lätt infektion att diagnosticera.

Treponema pallidum

Noura Al-Walai

Självständigt arbete i biologi 2010

Sammandrag

Treponema pallidum är en spiroket som orsakar infektionen syfilis. Bakterien studerades och namngavs av Schaudinn och Hoffman år 1905. *T. pallidums* genom är litet jämfört med andra gramnegativa bakterier och består av drygt 1000 kilobaspar. Syfilis är väldigt smittsamt och kan smitta via sexuella kontakter, men kan även smitta genom blodet. Syfilis har fyra olika sjukdomsstadier: primär, sekundär, latent och tertiär syfilis. Bakterien går inte att odla *in vitro* vilket resulterar i svårigheter att detektera sjukdomen. Många olika diagnostikmetoder har utvecklats men ingen som är 100 procentig för att upptäcka bakterien. I primär och sekundär syfilis förekommer sår på kroppen vilket gör det lättare att påvisa syfilis. Då tas prov direkt från skadorna och bakterien kan påvisas under mikroskop, men det kräver en erfaren expert i mikroskopi för att kunna se bakterien. Ju senare man är i sjukdomsförloppet, desto svårare blir det att hitta ett bra test för att diagnosticera syfilis. I det latenta stadiet kan man gå med sjukdomen i flera år utan att upptäcka den.

Det är viktigt att utveckla en test som har hög specificitet och känslighet för att upptäcka syfilis. Testen ska även vara snabba och billiga. Forskarna är på god väg att utveckla ett sådant test, men än så länge är det inte klart.

En ny studie har visat att kvantprickbaserade lateralflödesteststickor har hög specificitet och känslighet för påvisande av *T. pallidum.* Andra undersökningar visar att realtids PCR är ett snabbt, effektivt och tillförlitligt sätt för diagnostik av syfilis.

Inledning

I februari 1905 rapporterade zoologen Franz Eilhard Schulze till Preussiska vetenskapsakademin att hans assistent John Siegel har upptäckt det etiologiska smittämnet för syfilis. Det var en protozo som han kallade för *Cytorrhyctes lus*. På grund av misstankar och att man var skeptisk till upptäckten ville man gå vidare och utreda protozoen. Senare förstod man att det man trodde var en protozo var en spiralformad bakterie. Zoologen Frits Richard Schaudinn tillsammans med dermatologen Paul Erich Hoffmann studerade bakterien som orsakade infektionssjukdomen syfilis (Macedo de Souza 2005, Ovcinnikov och Delektorskij 1966). Hoffmann hade erhållit färskt prov av en sårskada som har hittats i en vulva (=blygd, den yttre könsorganen hos kvinnan) från en kvinna som hade sekundär syfilis och Schaudinn granskade provet (Macedo de Souza 2005). Granskningen gjordes med mikroskop (Macedo de Souza 2005). Schaudinn observerade en tunn spiralformad mikroorganism som rörde sig fram och tillbaka. Efter att ha visat sin upptäckt till Hoffmann, namngav de bakterien till *Spirochaeta pallida* (Macedo de Souza 2005). Den 14 oktober 1905 skrev Schaudinn ett

brev till Hoffman där han föreslog att tilldela bakterien som orsakade syfilis ett nytt släkte och där uppkom namnet *Treponema pallidum* (se figur 1) (Macedo de Souza 2005).

T. pallidum går inte att odla *in vitro*, bakterien dör så fort den kommer ut ur värden (Fraser *et al* 1998). Det har varit svårt att diagnostera syfilis och man strävar efter nya serologimetoder med högre specificitet och känslighet mot antigener som bildas i respons till syfilis. Syfilis behandlas lätt med penicillin och inga resistenta stammar har identifierats (French 2007, LaFond and Lukehart 2006)

I den här översiktartikeln kommer jag berätta generellt om *T. pallidum*, generellt om syfilis infektionen som orsakas av *T. pallidum* och slutligen om olika metoder för diagnostik för att påvisa syfilis.

Figur 1.Spiroketen *Treponema pallidum*

Egenskaper

Morfologi

Treponoma pallidum är en bakterie som tillhör spiroket familjen. Bakterien är spiralformad och är 5-15 µm lång och 0,1-0,2 µm bred (Fraser *et al* 1998)

Det har blivit lättare att studera *T. pallidum* på grund av möjligheten att kunna använda elektronmikroskop (Listgiamten och Socransky 1964, Ovcinnikov och Delektorskij 1966). Förutsättningen att kunna använda ultra-tunna sektioner för elektronmikroskop har visat ett antal detaljer i *T. pallidums* struktur. Genom denna metod har man kunnat observera ett yttre hölje, en cytoplasmiskt membran, cytoplasmisk substans och fibriller.

Bunten av fibriller sträcker sig från ena ändan av bakterien till den andra ändan och lindar en spiralformad struktur runt cytoplasman. De ligger mellan det yttre höljet och cytoplasmamembranet. Det är spänningen på fibrillerna som bestämmer spiralformen på

bakterien. Man anser att det är fibrillbunterna som utför förflyttningen av treponemer genom kontraktion och avslappning av fibrillbuntarna. På grund av de treskiktade höljet som Ovcinnikov och Delktorskij (1963) fann, förstod man att treponema har en segmentrad struktur under celldelning.

Flagellerna i *T. pallidum* är inre flageller och ligger i periplasman (Fraser *et al* 1998). Bakterien har ett yttre och en cytoplasmiskt membran där ett tunt peptidoglykanlager ligger mellan dem (Fraser *et al* 1998).

Genom

T. pallidum har en cirkulär kromosom med 1000 kilobaspar och har 1041 kodande sekvenser (Fraser *et al* 1998). *T. pallidum* är relativt liten om man jämför med andra gram-negativa bakterier, som till exempel *E.coli K-12* stammen som har en genomstorlek på 4600 kilobaspar (Fraser *et al* 1998). Genomet innehåller i genomsnitt 52.8 % G+C halt (Fraser *et al* 1998). Totalt finns det 1041 läsramar (ORFs) med en genomsnitt storlek på 1023 baspar, vilket representerar 92,9 % av den totala genomiska DNA:at (Fraser *et al* 1998). Hypotetiska proteiner matchar ca 17 % av ORFs i andra arter och 28% av ORFs utgör förmodligen nya gener (Fraser *et al.*1998). Alla 61 kodoner används i *T. pallidum*. Där är en bias för G eller C i den tredje kodonen (Fraser *et al* 1998) .

Metabolism och patogenes

T. pallidum har begränsad metabolisk kapacitet. Organismen kan utföra glykolysen men saknar en elektrontransportkedja och citronsyrecykel enzymerna (LaFond och Lukehart 2006). Aminosyra- och fettsyrasynteser är begränsade, men *T. pallidum* bär enzymer för interkonventering av aminosyror och fettsyror. För att ta upp makromolekyler från omgivningen, utnyttjas specifika transportörer av *T. pallidum* (LaFond och Lukehart 2006).

Människan är den enda reservoaren för *T. pallidum*, men studier om syfilis på människor är begränsade, därför kommer informationen om patogenes för det mesta från djurmodeller. Man tror att *T. pallidum* kommer in i värden via små sprickor i huden. Studier på djurmodeller har visat att bakterien sprids till nymfkörtlar inom ett par minuter och sedan utbreder sig inom ett par timmar (Singh och Romanowski 1999). Man vet inte hur bakterien tränger sig in i cellen men studier har visat att bakterien fäster till djurceller *in vitro* (Singh och Romanowski 1999). Andra studier har visat att bakterien fäster till många olika celler i både kanin och människor (LaFond och Lukehart 2006). Cellmenbraner och extracellulär matrix i värdscellerna har visat sig binda till *T. pallidum* (Singh och Romanowski 1999).

Syfilis

Nästan direkt efter bakterien penetrerat värden, kommer organismen sprida sig till flera organ och vävnader, möjligt via blodflödet och lymfkörtlarna (Fitzgerald *et al* 1977)

Syfilis har tre olika sjukdomsstadier med olika symptom och inkubationstid och ett asymptomatiskt stadium: Primär, sekundär och tertiär syfilis och det asymptomatiska latenta stadiet . Här nedan följer en beskrivning av de fyra olika stadierna.

Primär syfilis
Infektionen sker genom att *T. pallidum* penetreras i huden eller i intakta slemhinnor (LaFond och Lukehart 2006). När bakterien har trängt in sig i värden bildas en rött ovalt sår som kallas för schanker (Anonym 2005) se figur 2.

Inkubationstiden är mellan 9 dagar och 3 månader (Anonym 2008, French 2007) efter syfilis infektionen, och schankern brukar då uppträda på det område där bakterien kom i kontakt med, som till exempel på penis, inne i slidan, på blygdläpparna, ändtarmen och munhålan (Anonym 2008). Såret är oftast smärtfritt, men om det bildas flera sår kan det göra ont (Flores 1995, French 2007). Såren brukar läka av sig själv efter cirka fyra veckor (Anonym 2008, French 2007). Eftersom såret är oftast smärtfritt och kan uppträda på ställen där den inte syns som till exempel inne i slidan, så kan man vara infekterad länge med syfilis utan att upptäcka infektionen (Anonym 2008, French 2007).

Figur 2 Bilden visar schhankern på en penis som uppstår vid primärsyfilis(French 2007)

Sekundär syfilis
När sekundär syfilis uppstår, efter den primära fasen, så har nu *T. pallidum* spridit sig till huden, lymfkörtlarna och andra organ (Anonym 2005). Symptom kan likna andra sjukdomssymtom (Anonym 2010)vilket kan leda till att man missar att det handlar om syfilis. Symtomen kan vara feber, hudutslag, svullna lymfkörtlar, trötthet, och huvudvärk (Anonym 2010, Anonym 2005, Singh och Romanowski 1999). Andra symptom är halsont, muskelverk och viktnedgång (LaFond och Lukehart 2006, Singh och Romanowski 1999). Inkubationstiden är vanligtvis mellan 2 till 12 veckor (Anonym 2005, Singh och Romanowski 1999) men kan vara upp till 6 månader (Singh och Romanowski 1999). Hudutslagen har en belägenhet att visa sig på handflator, se figur 3a, (French 2007, Singh och Romanowski 1999), fotsulor (Singh och Romanowski 1999) och hårbotten (French 2007) men kan även visa sig över hela kroppen, se figur 3b (Singh och Romanowski 1999). Dessa utslag kan bilda vårtliknande sår som kallas för kondylom Lata (French 2007, Singh och Romanowski 1999). Hudutslagen kan likna andra dermatologiska sjukdomar, vilket kan missleda vid diagnostik (Singh och Romanowski 1999). Man brukar beskriva utslagen som kopparfärgade.

a)

b)

Figur 3a och b visar hudutslag som orsakas av sekundär syfilis (Baughn och Musher 2005)

Latent syfilis

Latent syfilis är asymptomatisk och har två faser: tidig latent syfilis som uppstår inom ett år efter infektionen eller sen latent syfilis som uppstår efter ett år efter infektionen (Anonym 2005, Kimberly 2005, Singh och Romanowski 1999). I det sena latenta stadiet av syfilis så är bakterierna inaktiva och finns i mjälten och lymfkörtlarna (Anonym 2005), därför smittar inte det sena latenta stadiet. Latent syfilis uppträder efter sekundär syfilis och kan stanna i 3-30 år. Patienter med det latenta stadiet behöver inte utveckla tertiär syfilis och cirka 70 % kan stanna kvar i det latenta stadiet och inte utveckla tertiär syfilis (Anonym 2005).

Tertiär syfilis

Omkring 30 % av de som inte får behandling för infektionen kan utveckla tertiär syfilis (Anonym 2005, Anonym 2006, French 2007) och i tertiär syfilis kan man inte längre smitta andra(Anonym 2006), men däremot så kan bakterien förökas och sprida sig i kroppen vilket resulterar i skador i hjärtat, ögonen, hjärnan, nervsystemet och skelettet (Anonym 2005). En av de allvarligaste åkommor som orsakas av tertiär syfilis är neurosyfilis (Anonym 2006, Goh 2005, French 2007). Patienter med tertiär syfilis behöver inte utveckla neurosyfilis (Singh och Romanowski 1999), men om så var fallet skulle infektionen sitta i det centrala nervsystemet och yttra sig i början av infektionen om en mild form eller asymptomatisk form av hjärnhinneinflammation (Anonym 2010, Singh och Romanowski 1999). Infektionen kan

också få en katastrofal följd om infektionen fortskrider utan behandling. Infektionen kan orsaka ryggradssyfilis, förlammning, meningovaskulär syfilis, tabas dorsalis (ryggmärgssyndrom) och parenkymatösa som sätter sig antingen på ryggmärgen eller hjärnan och ibland på båda två (Anonym 2010, French 2007, Singh och Romanowski 1999).

Tabell 1. De olika sjukdomsstadierna med inkubationstid och symptom.

Stadium	Inkubationstid	Symptom
Sekundär syfilis	2 dagar till 6 månader	Feber, hudutslag, allmän sjukdomskänsla, illamående, trötthet
Latent syfilis		
-Tidigt latent	Inom ett år	Symptomfria
-Sen latent	Efter ett år	Symptomfria
Tertiär syfilis	Upp till flera år	Beroende på var bakterien sätter sig, t.ex nervsystemet

Epidemiologi och smittvägar

Syfilis är en global sjukdom och omkring 12 miljoner smittas varje år. Spridningen är störst i urvecklingsländer (Hook och Peeling 2004, WHO 2007). Syfilis är en sexuell överförd infektion, men infektionen kan smitta via blodet också. En gravid kvinna kan smitta sitt foster via moderkakan. Många av de dödfödda och dödsfall hos nyfödda orsakas av medfödd syfilis (Hook och Peeling 2004). Syfilisfallen har sjunkit efter andra världskriget i samband med uppkomst av antibiotika, men började öka sen igen i slutet av 1990-talet mest hos homosexuella män.

Diagnostik

Syfilis är en oerhört smittsam sexuellt överförd infektion och är en global sjukdom där det smittas ungefär 12 miljoner människor per år (Castro *et al* 2010, WHO 2007). Eftersom schankerna som orsakas av infektionen är smärtfria och kan gömma sig, så kan man gå länge med infektionen utan att märka den. Det finns många olika diagnostikmetoder, men ingen har en hundraprocentig specificitet och känslighet. Syfilis brukar även kallas för ”den utmärkta imitatören” på grund av att den har symtom som påminner om många andra vanliga sjukdomar, och på detta vis kan man feldiagnosticera syfilis (Heymans *et al* 2010). *T. pallidum* har en lång generationstid (Heymans *et al* 2010) och bakterien dör när den kommer utanför värdens kropp, vilket resulterar i att bakterien är omöjlig att odla *in vitro* (French

2005, Heymans *et al* 2010). Det är därför oerhört viktigt att forskare utvecklar nya metoder för att detektera syfilis och på så sätt börja penicillinbehandlingen så fort som möjligt så att man inte hinner sprida infektionen vidare .

Det finns två olika metoder för att diagnosticera syfilis. Man kan ta direkt prov från schankern som orsakas av syfilis infektionen och utföra PCR-analys eller titta under direktmikroskop, man använder mörkfält- eller faskontrast- mikroskopi. De andra metoderna är serologiska metoder (Blomqvist 2010, French 2007, Wikström *et al* 2010). Nedan följer en beskrivning av de olika serologiska metoderna.

Direkt diagnostik

Att använda mörkfältsmikroskopi är det mest pålitliga sättet för att upptäcka *T. pallidum*. För att kunna dra slutsatsen att det är *T. pallidum* man ser under mikroskop, krävs det en erfaren expert i mikroskopi. Man tar prov direkt från schankern. Behandling med antibiotika kan däremot ge falskt-negativa resultat, därför är det viktigt att gå vidare och göra andra tester för att fastställa syfilis (Ratnam 2005 **)**. Det mest specifika testet för syfilis är direkta fluorescerade antigen testet när sår är närvarande. Den upptäcker antigener och förekomsten av rörliga *Treponema* behövs inte (Ratnam 2005 **).** Problemet med testet är att den inte kan särskilja mellan andra *Treponema* som orsakar tillexempel yaws och pinta (Ratnam 2005 **).** Yaws och pinta är infektionssjukdomar som orsakas av andra *Treponema* bakterier. Man har utvecklad en antal PCR metoder som upptäcker *T. pallidum*. Dessa tester är inte standardiserade, men har visat sig vara väldigt känsliga och pålitliga. De kan upptäcka 10 organismer i ett prov med hög specificitet (Ratnam 2005 **)**. Denna metod används och är pålitlig när det gäller att diagnosticera kongenital syfilis, neurosyfilis och tidigt primär syfilis. Man använder även denna metod för att särskilja mellan gamla och nya infektioner (Ratnam 2005 **).**

Realtids PCR

De befintliga PCR metoderna för att detektera *T. pallidum* är gel baserade system (Koek *at el* 2006). År 2006 utvecklade Koek *at el* en realtid PCR med TagMan probe med målinriktning mot *polA* genen. Man såg att en känslighet och specificitet på 94-100 % med två olika PCR plattformer , Roter-Gene (Corbett Research, Sydney, Australien) och iCycler (Bio-Rad, Veenendaal, Nederländerna). Analysen kunde slutföras på mindre än 2 timmar vilket gjorde att rapporteringen tog mindre än 8 timmar. Man såg direkt att denna diagnostik metod var adekvat att genomföra i rutin laboratorier för diagnostik av primär syfilis.

En annan studie som gjordes av Leslie *et al* (2007) där man ville utveckla en snabb, känslig och specifik realtid PCR för att direkt upptäcka *T. pallidum* och detta genom att ta en provsticka och biopsi från till exempel lesioner, moderkaka etc. på patienter som man misstänker kan ha syfilis. Ett TaqMan realtid PCR med målinriktning mot polA genen i *Treponema pallidum* (TpPCR) utvecklades. Man jämförde TpPCR resultaten med serologiska testsresultat och det visade 95 % säkerhet, med ca 80 % känslighet och ca 98 % specificitet. Studien fann att TpPCR är ett bra komplement till de serologiska metoderna för att diagnostera syfilis.

Heymans *et al* (2010) undersökte realtid PCR värdet för diagnostera syfilis i primär och sekundär stadierna. Resultatet av deras undersökning visade att realtid PCR är en snabb, effektiv och tillförlitlig sett att diagnostera bakterien i primär syfilis. Men man såg ingen ökad värde när det gäller diagnostik i sekundär syfilis.

I december 2010 har Scott med medarbetare publicerat forskning där de utvecklar en multiplex realtids PCR för att detektera herpes och syfilis. Scott med medarbetare forskning visade resultatet att realtids PCR var känsligare än båda mörkfältmikroskopi och serologiska tester.

För att dra en slutsats av alla de ovanstående undersökningarna ser man att realtid PCR har en bra förutsättning att användas för diagnostik. Undersökningar visar en effektiv metod som har en relativt hög känslighet och specificitet vilket skulle underlätta syfilisdiagnostik.

Serologiska metoder

Man använder två olika typer av serologiska tester för diagnostik av syfilis: ospecifika serologiska metoder (nontreponemal) och specifika serologiska metoder (treponemal) (Blomqvist 2010, Wikström *et al* 2010). När *T. pallidum* infekterar värden så bildas det olika antikroppar i respons mot bakterien. Ett serologiskt prov påvisar om det finns antikroppar i respons mot mikroorganismen.

Ospecifika serologiska tester

Ospecifika serologiska tester kallas även som reagintester. I ospecifika serologiska testerna använder man sig av antikroppar som bildas i värden i respons mot bakterier och inte av antigen som bildas av mikroorganismen. Tester som man använder idag heter VDRL (Veneral Disease Research Laboratory) (Blomqvist 2010, Wikström *et al* 2010), RPR (Rapid plasma reagin) och TRUST (Toluidine Red Unheated Serum Test) (Sena *et al* 2010, Wikström *et al* 2010).
Alla dessa ospecifika tester mäter immunoglobulin M (IgM) och immunoglobulin G (IgG) antikroppar mot lipoidal material som släpps fri från skadade värdceller, men även lipoprotein-liknande ämnen och detta möjligen genom kardiolipin som släpps fri från bakterien. Lipoid är en lipid, eller något som är av olika ämnen och liknar fett. Lipoproteiner är en komplex mellan en protein och en hydrofob, en fosfolipid är ett exempel på en hydrofob som proteiner kan gå i komplex med. Kardiolipin är en fosfolipid och dessa finns hos alla biologiska membran. Även om ospecifika serologiska tester visar positivt resultat så måste man ändå bekräfta resultatet med specifika serologiska tester. Detta för att ospecifika serologiska testerna detekterar antigener som är komponenter i människocellen, och dessa kan även bildas av andra infektionssjukdomar (Sena *et al* 2010).

År 1906 Wassermann *et al*, utvecklade ”complement fixation testen”, som tidigare har introduceras år 1901 av Bordet och Gengou, till ett serologisk test för syfilis. Det var det första serologiska testet för syfilis och den fick namnet Wassermanns test. Antigenet som används i Wassermanns test för syfilis heter Kardiolipin, en fosfolipid, (Birula 2008) och den kom från ett prov från levern av ett dödfött barn med medfött (kongenital) syfilis (Larsen *et al* 1995). Antikroppar som bildas i samband med en syfilisinfektion är reaktiva med kardiolipin som kombineras med lecitin och kolesterol. Denna antigen- antikroppsreaktionen bildar en immunkomplex som är en form av en serologisk aktiv antigen. Med denna komplex

kunde man påvisa syfilisantikroppar (Birula 2008, Larsen *et al* 1995). Wassermanns test använd inte längre i dagens syfilisdiagnostik (Birula 2008)

VDRL tester är en mikroflockulationstester (Castro *et al* 2000, Larsen *et al* 1995). VDRL antigenen innehåller kardiolipin, lecitin och kolesterol (Birula 2008). När man tillsätter kolinklorid och EDTA till VDRL antigenen, så förbättrades testens reaktivitet och antigen känsligheten stabiliseras (Larsen *et al* 1995).
Det mest förekommande ospecifika serologiska testerna är VDRL och RPR (Van Voorhis *et al* 2003)**,** båda är test som testar närvaron av antilipid antikroppar. Antilipidsantikroppar är antikroppar som binder till andra antikroppar och på så sätt ockuperar antikroppars bindningsställen och förhindra interaktion med målantigen.Dessa tester är opålitliga eftersom ingen av dem testar för syfilisspecifika antikroppar vilket kan ge felaktiga test resultat (Larsen *et al* 1995, Van Voorhis *et al* 2003) . I tidig primär syfilis kan det vara så att de syfilis specifika antikropparna inte har hunnit utvecklas och i latent och tertiär syfilis är det 30 % av dem syfilis infekterade kan sakna antilipidsantikroppar (Van Voorhis *et al* 2003).
TRUST (Toluidine Red Unheated Serum Test) är en annan ospecifik serologisk test där man använder en liknande antigen som i VDRL tester. Skillnaden är att förutom EDTA och kolinklorid så tillsätter man toluidine röda toner (Pettit *et al* 1983)
RPR tester detekterar också antilipidsantikroppar.

Specifika serologiska tester
Ospecifika tester kan även ge falska positiva resultat. Det är därför man strävar efter att hitta specifika serologiska tester som har bättre känslighet och specificitet (Larsen *et al* 1995 **).** Meyer och Nelson (1949) var de första som utvecklade en specifik serologiskt metod för syfilisinfektionen **(** Larsen *et al* 1995**,** Nielsen och Reyn 1956**,** Schmidt 1961, Sequeira och Eldridge 1973 **).** Testen kallades för *Treponema Pallidum* Immobilization (TPI). Tidigare hade Turner demonstrerat skyddade antikroppar i serum från kaniners testiklar infekterade med syfilis, och senare kunde man hitta liknande antikroppar på humant syfilis sera (Schmidt 1961 **).** Utifrån vad Turner demonstrerat utvecklade Meyer och Nelson TPI testet (Schmidt 1961 **)**.

FTA, fluorescent treponemal antikroppstesten, var ett stort genombrott år 1957. Testens tillvägagångssätt var genom att använda 1:5 utspädning av en patients serum i fysiologisk saltlösning där den reagerar med suspension av död *treponema*. Man använde anti-humant immunoglobulin som man märkte med fluorescein som ett konjugat och sedan tittade man på provet under mikroskop med UV-ljus (Larsen *et al* 1995 **).** Deacon och Hunter utvecklade FTA metoden och gjorde den mer specifik och känslig (FTA-ABS) (Hunter *et al* 1964). Testen har visat att den har dubbelt så hög känslighet än den tidigare utvecklade FTA-testen FTA-200 (Hunter *et al* 1964 **).** FTA-ABS och FTA-ABS dubbel färgning är det de tester som är standard tester vilka används för diagnostik av syfilis, (Van Voorhis *et al* 2003), TP-PA (*T. pallidum* particle agglutination) test är en analys för att upptäcka antikroppar mot *T. pallidum* i serum eller plasma. Testen är baserad på agglutination av sensibiliserade färgade partiklar som transporteras med *T. pallidum* antigenen **(** Sequeira och Eldridge 1973 **).** Agglutination är när celler klumpar ihop sig. TP-PA använder gelatinpartiklar som är sensibiliserade och är täckta med bakterien och dessa klumpar ihop sig med antitreponemal IgM och IgG antikroppar. TP-PA har en fördel eftersom de inte är lika dyra och lika komplicerade som FTA-ABS tester och att resultatet kan ses med blotta ögat. (Larsen *et al*

1995, Sena *et al* 2010, Sequeira och Eldridge 1973). Nu använd TP-PA/ TP-HA tester i större utsträckning än andra specifika serologiska tester **(** Ratnam 2005).

Enzymimmunoanalyser (EIA)
Enzymimmunoanalyser för syfilis har de senaste åren blivit mer känsliga och specifika. Exempel på EIA tester är IgG-ELISA IgM.EIA och ICE (Immun Capture EIA). I ELISA-testet finns det brunnar på en mikrotitrerplatta, där de är täckta med klonade delar av *T. pallidum*. Antigenerna som används är 15,17 och 47 kDa antigener (*T. pallidum* antigener). Dessa antigener reagerar med antikropparna som finns i patienternas serum (Ponyai *et al 2010*). Biotinylerats antihumant immunoglobulin är märkt med ett ämne som orsakar en färgreaktion (streptavidin peroxidas) och denna färgförändring kan ses med en densitometer (Ponyai *et al* 2010). I ICE så är mikrotitrerbrunnarna täckta med anti-IgG eller IgM antihumant antikroppar. Sedan tillsätter man det serum som ska undersökas i brunnarna och en del av IgG och IgM som finns i serum kommer att fångas av antihumant antikropparna (Ponyai *et al* 2010). Resterande av antikropparna som inte har bundit tvättas bort och sedan tilläggs den klonade delerna av *T. pallidum* (15-17 och 47-kDa antigener). Dessa antigener kommer att fångas upp endast av specifika antikroppar som har bundits i plattan. Dessa sedan upptäcks av biotinylerat antitreponemal antikroppar som är märkta med samma färgämne som i ELISA (Ponyai *et al* 2010).

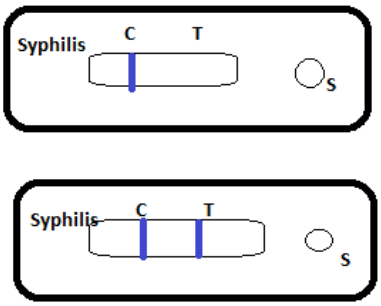
I en studie av Castro *et al* år 2003 granskades enzymkopplad immunadorberande analystekniken (ELISA) för detektion av antikroppar (immunoglobulin G, IgG, och immunoglobulin M, IgM) mot *T. pallidum* hos patienter med misstänkt syfilis. Detta gjordes för att utvärdera om denna teknik kan användas rutinmässigt i laborationer för diagnostik av syfilis. Studien visade att testkänsligheten är likvärdig med andra tester och därmed kan användas.

Castro *et al* (2003) studie visade också att ELISA tekniken hade högre specificitet om man jämför med FTA-Abs och MHA-TP tester. Slutsatsen av Castro *at el* (2003) studien visar att ELISA skulle kunna vara en alternativ test för specifika serologiska tester för detektion av *T. pallidum* antikroppar. Detta på grund av att testens känslighet och specificitet liknar de mest använda testerna för att diagnosticera syfilis.

Wesley *et al* (2003) testade en mängd rekombinanta proteiner för att bestämma om de är potentiellt lämpliga som antigener för serologisk diagnostik i syfilis. Studien visade att proteinerna, Tp0453, Tp92, och Gpd (Tp0257), vara potentiellt lämpliga som antigener i ELISA tester. De hade hög specificitet och känslighet för att påvisa syfilis. Ett av proteinerna (Tp0453) hade så hög specificitet och känslighet som 100 % i primär syfilis. Studien har även visat att detta protein inte ger falska positiva resultat i serum från oinfekterade personer och personer som är infekterade med andra spiroket bakterier.

Snabba syfilis tester

Snabba syfilis tester, till exempel point of care tester (se figur4), utvecklades för att det behövdes en snabb test som kunde påvisa syfilis, och detta särskild i utvecklingsländerna där man har stor utspridning av syfilis (Sena *et al* 2010). De mest kända point of care testerna är de testerna som använd för hemmabruk och i vårdcentraler för att påvisa en graviditet. Dessa tester för syfilis har hög specificitet och känslighet enligt en studie av WHO (World health organization). Studien visar upp till 98 % känslighet och specificitet för att påvisa syfilis (Sena *et al* 2010). De flesta snabba syfilistester detekterar IgG, IgM, och IgA antikroppar och testerna innehåller immunokromotrografiska remsor. I remsorna finns det en eller flera *T. pallidum* antigen för att fånga reagenser (Sena *et al* 2010). Förutom att snabba syfilistester har hög känslighet och specificitet, så är de relativt billiga och kräver inte specialiserad personal inom vården (Sena *et al* 2010). Nackdelen med snabba syfilistester att de kan inte särskilja mellan behandlad syfilis eller en ny aktiv infektion. De kan även visa falska positiva resultat (Sena *et al* 2010).



Figur 4. Snabba syfilistester. Första testet visar ingen syfilis, andra testen visar syfilisinfektion. C är en kontroll linje som betyder att testet är giltigt. T visar om man är syfilis positiv eller syfilis negativ. Detta genom att ett streck visar sig eller inte vid T:et. Bilden är ritat av Noura Alwalai.

Point-of-Care (POC) diagnostik test av syfilis

POC tester detekterar antikroppar som bildas i respons till *T. pallidum.*Yang *et al* (2010) hävdar att POC tester underlättar diagnostik i sexuellt överförda infektioner, eftersom man behöver ett billigt test som kan ge resultat snabbt för att påbörja behandling. Detta behövs speciellt i utvecklingsländer där tillgången på laboratorier är begränsad.

Snabba Point-of Care syfilisdiagnostiktester har visat god tillförlitlighet och kan ge resultat redan vid patientens första besök (Sabidó *et al* 2009). Sabidó *et al* (2009) studie visade att snabb POC test var acceptabel metod för screening verktyg för diagnostik av syfilis, och testen även gjordes inom en lagom väntetid för patienterna.

Forskare har försökt att använda olika taggar för att öka testens känslighet, eftersom kolloidalt guld-lateral flödestester är begränsade (Yang *et al* 2010). Kolloidalt guld är en färgningsmetod. Med kolloidal menas att guldet har finfördelats i guldpartiklar som är mellan en nanometer till en mikrometer i storlek. När guldet är i lösning så får den lösningen rödfärg.

I Yang *et al* (2010) studie, studerade de en lateral flödestest som baseras på kvantprickar (QD) (engelska Quantum dots). Kvantprickar är ljust fluoroscerande nano-kristaller och har använts av biologiska bildbehandlingsprogram.

Yang *et al* (2010) jämförde mellan kolloidalt guld baserad flödesteststickor och QD baserade lateral flödesteststickor. QD baserade lateral flödesteststickor hade en känslighet som var tio gånger högre än kolloidalt guld baserade lateral flödesteststickor för att detektera bakterien som orsakar syfilis.

Yang *et al* 2010 slutsats var att QD- baserade teststickor var ett billigt lätt test som har hög specificitet och känslighet och bör ersätta kolloidalt guld baserade teststickor vid syfilisdiagnostik .

Diskussion

Det finns många olika diagnostikmetoder för att påvisa syfilis, men igen har en 100 procentlig specificitet och känslighet. Eftersom bakterien inte går att odla in vitro försvårar det diagnostiken. Direktdiagnostik kan vara ett sätt att diagnosticera syfilis, men problemet är att det blir kostsamt att anställa en mikroskoperfaren expert för att påvisa syfilis. Det skulle underlätta mycket ifall man hade en snabb billig och pålitlig syfilistest. Att kunna utveckla nya snabba och pålitliga diagnostikmetoder skulle kunna förbättra den globala folkhälsan (Heyman *et al* 2010). Huvudsaken är att utveckla ett specifikt serologiskt test, för att ospecifika serologiska tester detekterar antikroppar som bildas av värden, vilket gör testet mindre pålitlig. Detta eftersom att antikropparna som bildas i respons av infektionen kan bildas vid andra infektioner som orsakas av andra bakterier. Än så länge behövs det mycket forskning i diagnostik för att påvisa syfilis, men forskare är på god väg att utveckla ett billigt, snabbt syfilistest. Man har redan visat bra resultat i till exempel point of care tester. Point of care tester kan vara en bra förutsättning för diagnostik av syfilis. De är snabba, ganska pålitliga och billiga tester. Det största behovet av snabba syfilistester är mest i utvecklingsländerna där syfilis infektionen sprids relativt snabbt. Det är en föresättning att patienten kan påbörja behandlingen med penicillin så fort som möjligt.

Realtid PCR är ett sätt som används i kliniska mikrobiologiska laboratorier för att diagnostera humana patogener. Tekniken i allmänhet brukar ta ungefär en timme eller mindre vilket skulle vara en bra förutsättning för att diagnostera syfilis och andra patogena infektioner (Espy *et al* 2006). Det är viktigt att ha en snabb och pålitlig PCR metod särskild för de stadier i syfilis som inte går att detektera med mörkfältmikroskop. Problemmet med PCR är att metoden kan inte särskilja mellan levande eller död *T. pallidum*, på så sätt kan man missdiagnosticera ifall man har haft syfilis innan och blivit behandlad med antibiotika. Detta kan vara orsaken till att PCR metoden, även om den används på mikrobiologiska laboratorier och är till en viss grad pålitlig vid en första infektion, inte är standardmetoder.

Det är kanske viktigast att ha bra tester vid diagnostik av tidigt syfilis eftersom man kan bära den latenta versionen av sjukdomen under en lång tid.

Det finns så mycket forskning om diagnostikmetoder för syfilis, och många nya diagnostikmetoder har utveckats. Men ingen test har inte tagit över ute på diagnostiklaboratorier. De tester som används mest idag för diagnostik av syfilis är VDRL, RPR, TPHA/TPPA och ELISA.

Tack

Jag vill tacka min opinering grupp och Lage Cerenius för kommentarer och råd under arbetets gång. Jag vill även tacka min man Kadhim Al-obaidi för att har visat ett hundra procentlig stöd genom att ta hand om vår son under tiden jag skrev arbetet.

Referenslista

Anonym. 2005. Syfilis. WWW- dokument 2005-11-19. http://www.urologkanalen.com/konssjukdomar/syfilis.shtml. Hämtat 2010-11-17.

Anonym. 2006. Syfilis. WWW-dokument 2006-01-01. http://www.karolinskasjukhuset.se/upload/Infektion/HIV,%20STI/1_Syfilis.pdf . Hämtat 2010-11-16.

Anonym . 2008. Syfilis. WWW- dokument 2008-11-13. http://www.karolinska.se/Verksamheternas/Sjukdomar-tillstand--besvar/Gynekologi/Sexuellt-overforda-infektioner/Syfilis/ Hämtat 2010-11-15.

Anonym. 2010. Sjukdomsinformation om syfilis. WWW-dokument 2010-08-18. http://www.smittskyddsinstitutet.se/sjukdomar/syfilis. Hämtat 2010-11-14.

Anonym. 2010. MeSH tree location(s) for neurosyphilis. WWW-dokument. http://mesh.kib.ki.se/swemesh/show.swemeshtree.cfm?Mesh_No=C01.252.200.750 . Hämtat 2010-11-16.

Bialynicki-Birula R. 2008. The 100th anniversary of Wassermann-Neisser-Bruck reaction. Clinics in Dermatology **26 :**79-88.

Blomqvist N. 2010. Syfilisdiagnostik. WWW-dokument 2010-03-01. http://www.bakteriologi.se/SU/4/Laboratoriemedicincom/Laboratoriemedicins-verksamheter/Klinisk-bakteriologi/Klinisk-bakteriologi/Provtagningsanvisningar-/Syfilisdiagnostik/ . Hämtat 2010-11-15.

Castro R, Prieto ES, Santo I, Azevedo J, Da L. Exposto F. 2003. Evaluation of an enzyme immunoassay technique for detection of antibodies against *Treponema pallidum.* Journal of Clinical Microbiology **41:** 250–253.

Castro AR, Esfandiari J, Kumar S, Ashto M, Kikkert SE, Park MM, Ballard RC. 2010. Novel Point-of-Care test for simultaneous detection of nontreponemal and treponemal antibodies in patients with syphilis. Journal of Clinical Microbiology **48:** 4615-4619.

Castro AR, Morrill WE, Shaw WA, Gale DC, Park MM, Peregrino-Ferreira LA, Bazzo ML, Pope V. 2000. Use of synthetic cardiolipin and lecithin in the antigen used by the Venereal Disease Research Laboratory Test for serodiagnosis of syphilis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology **7:** 658-661.

David LE, Azzato F, Karapanagiotidis T, Leydon J, Fyfe J. 2007. Development of a real-time PCR assay to detect *Treponema pallidum* in clinical specimens and assessment of the assay's performance by comparison with serological testing. Journal of Clinical Microbiology **45:** 93-96.

Dugdale DC, Vyas JM, Zieve D. 2009. Serology. WWW-dokument 2009-12-01. http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003511.htm . Hämtat 2010-11-17.

Espy MJ, Uhl JR , Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC,. Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR, Smith TF. 2006. Clinical Microbiology Reviews **19:** 165–256.

Flores JL. 1995. Syphilis- A tale of twisted *Treponemes.* Western Journal of Medicine **163**: 552-559.

Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, White O, Sutton GG, Dodson R, Gwinn M, Hickey EK, Clayton R, Ketchum KA, Sodergren E, Hardham JM, McLeod MP, Salzberg S, Peterson J, Khalak H, Richardson D, Howell JK, Chidambaram M, Utterback T, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Cotton MD, Fujii C, Garland S, Hatch B, Horst K, Roberts K, Sandusky M, Weidman J, Smith HO, Venter JC. 1998. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. Science **281:** 375-388.

Fitzgerald TJ, Johnson RC, Miller JN, Sykes JA. 1977. Characterization of the attachment of *Treponema pallidum* (Nichols strain) to cultured mammalian cells and the potential relationship of attachment to pathogenicity. Infection and Immunity **18**: 467-478.

French P**.** 2007. Syphilis. British Medical Journal **334:** 143-147.

Goh BT. 2005. Syphilis in adults**.** Sexually Transmitted Infections **81:** 448–452.

Heymans R, Van der Helm JJ, De Vries HJC, Fennema HSA, Coutinho, Bruisten. 2010. Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. Journal of Clinical Microbiology **48:** 497–502.

Hook EW, Peeling RW. 2004. Global health: Syphilis control-A continuing challenge. The New England Journal of Medicine **351:** 122-124.

Hunter EF, Deacon WE, Meyer PE. 1964. An improved FTA test for syphilis: the absorption procedure (FTA-ABS). Public Health Reports **79:** 410-412.

Koek AG, Bruisten SM, Dierdorp M, van Dam AP, Templeton K. 2006. Specific and sensitive diagnosis of syphilis using a real-time PCR for *Treponema pallidum*. Clinical Microbiology Infection **12:** 1233–1236.

LaFond RE, Lukehart SA. 2006. Biological basis for syphilis. Clinical Microbiology Reviews **19:** 29-49.

Larsen SA, Steiner BM, Rudulph AH. 1995. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. Clinical Microbiology Reviews **8:** 1-21.

Listgiamten MA, Socransky SS. 1964. Electron microscopy of axial fibrils, outer envelope and cell division of certain oral spirochetes. Journal of Bacteriology **88:** 1087-1103.

Macedo de Souza E. 2005. A hundred years ago, the discovery of *Treponema pallidum.* Anais Brasileiros de Dermatologia **80:** 547-548.

Maple PA, Ratcliffe D, Smit A. 2010. Characterization of *Treponema pallidum* particle Agglutination assay-negative sera following screening by treponemal total antibody enzyme immunoassays. Clinical and Vaccine Immunology **17:** 1718–1722.

Meritxell S, Benzaken AS, De Andrade Rodrigues JE, Mayaud P. 2009. Rapid Point-of-Care diagnostic test for syphilis in high- risk populations, Manaus, Brazil. Emerging Infectious Diseases **15:** 547-549.

Muller I, Brade V, Hagedorn HJ, Straube E, Schorner C, Frosch M, Hlobil H, Stanek G, Hunfeld KP. 2006. Is serological testing a reliable tool in laboratory diagnosis of syphilis? Meta-analysis of eight external quality control surveys performed by the german infection serology proficiency testing program. Journal of Clinical Microbiology **44:** 1335–1341.

Muller IF, Hansmann F, Tiemann C, Hagedorn HJ, Solbach W, Roider J, Nolle B, Laqua H, Hoerauf H. 2007. Detection of *Treponema pallidum* in the vitreous by PCR. British Journal of Ophthalmology **91:** 592–595.

Nielsen HA, Reyn A. 1956. The *Treponema pallidum* imobilization test. Bulletin of the World Health Organization **14:** 263-288.

Ovcinnikov VV, Delektorskij NM. 1966. Morphology of *Treponema pallidum*. Bulletin of the World Health Organization **35:** 223-229.

Pettit DE, Larsen SA, Harbec PS, Feeley JC, Parham CE, Cruce DD, Hammbie EA, Perryman MW. 1983. Toluidine red unheated serum test, a nontreponemal test for syphilis. Journal of Clinical Microbiology **18:** 1141-1145.

Ratnam S. 2005. The laboratory diagnosis of syphilis. The Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology **16:** 45-51.

Ponyai K, Ostorhazi E, Marschalko M, Karpati S, Rozgonyi F. 2010. Syphilis today. Reviews in Medical Microbiology **21:** 84-95.

Schmidt H. 1961. Further studies on seroreactivity in Leprosy by means of Lecithin-free cardiolipin antigen (Cardchol) and other antigens ordinarily used in the serodignosis of Treponematoses. Bulletin of the World Health Organization **25:** 189-195.

Scott LJ, Gunson RN, Carman WF, Winter, Andrew J. 2010. A new multiplex real-time PCR test for HSV1/2 and syphilis: an evaluation of its impact in the laboratory and clinical setting. Sexually Transmitted Infections **86:** 537-539.

Sena AC, White BL, Sparling PF. 2010. Novel *Treponema pallidum* serologic tests: A paradigm shift in syphilis screening for the 21st century. Clinical Infectious Diseases **55:** 700-708.

Sequeira PJL, Eldridge AE. 1973. Treponemal haemagglutination test. The British Journal of Venereal Diseases and Genitourinary Medicine **49:** 242-248.

Singh AE, Romanowski B. 1999. Syphilis: Review with emphasis on clinical, epidemiologic, and some biologic features. Clinical Microbiology Reviews **12**: 187–209.

Smith AM, Shuming N. 2009. Next-generation quantum dots. Nature Biotechnology **27:** 732–733.

Van Voorhis WC, Barrett LK, Lukehart SA, Schmidt B, Schriefer M, Cameron CE. 2003. Serodiagnosis of syphilis: Antibodies to recombinant Tp0453, Tp92, and Gpd proteins are sensitive and specific indicators of infection by *Treponema pallidum.* Journal of Clinical Microbiology **41:** 3668–3674.

Wikström A, Löwhagen GB, Wretlind B, Andersson O. 2009. Lues (Syfilis). WWW-dokument 2009-05-04. http://www.medscinet.se/infpreg/specinfo/main.asp?topic=24 . Hämtat 2010-11-16.

Workowski KA, William CL. 2002. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. WWW-dokument 2002-05-10. http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5106a1.htm#SyphilisHIV-Infected . Hämtat 2010-11-16.

World Health Organization. 2007. The global elimination of congenital syphilis: rationale and strategy for action. WWW-dokument 2007. http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9789241595858_eng.pdf. Hämtat: 2010-12-10.

Yang H, Ding L, Rong H, Qin G, Kan W, Xueqing Z, Peng H, Daxiang C. 2010. A novel quantum dots–based point of care test for syphilis. Nanoscale Research Letter **5**: 875–881.