



DETECCIÓN DE *Treponema pallidum subespecie pallidum* EN MUESTRAS CLÍNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE SÍFILIS CONGÉNITA MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE VARIANTES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTA D.C
2019**



DETECCIÓN DE *Treponema pallidum subespecie pallidum* EN MUESTRAS CLÍNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE SÍFILIS CONGÉNITA MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE VARIANTES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL

Estudiantes:

**MILENA PATRICIA BARBOSA BARRERO
BRIGETE STEPHANY GONZALEZ CHAVES**

Asesor:

MSc. GLADYS PINILLA BERMUDEZ

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C
2019**

DEDICATORIA

A Dios

Porque fue a través de su infinito amor y misericordia que recibí la fuerza, las virtudes, la perseverancia y la capacidad de imaginar y ejecutar los sueños que un día me permití crear, porque definitivamente merecemos lo que soñamos.

A mi amado esposo

Por su esfuerzo, sacrificio y apoyo incondicional desde el primer día en que emprendimos este sueño, porque creíste en mis capacidades y me diste la oportunidad de tener en mis manos algo mejor para nuestro futuro.

A mis padres, hermana y sobrina

Porque pese a la distancia, siempre estuvieron cerca. A mi madre que con su inmenso amor llena cualquier vacío y despeja toda angustia y tristeza, a mi padre que con su ejemplo me enseñó la responsabilidad y valentía; a mi hermana que me ha enseñado el valor de la perseverancia y la disciplina, y a mi pequeña Sara que es el motor que me hacía falta para todos los días intentar ser una mejor persona.

Milena Patricia Barbosa Barrero

Orgullosamente le dedico cada palabra de este escrito a mi hermosa familia: a mis padres, hermanos, sobrinos y a mi novio; por apoyarme día a día, por creer en mí, por sus infinitas palabras de aliento, por el amor. Sepan que todo el esfuerzo invertido en estos años es por y para ustedes.

Brigete Stephany Gonzalez Chaves

AGRADECIMIENTOS

A Dios por colocar en mi camino las personas idóneas, los elementos necesarios y las oportunidades para llevar a cabo este gran proyecto.

A mi esposo porque con su sacrificio, esfuerzo, apoyo y entereza me regaló la oportunidad de creer que podía lograrlo.

A mis padres, hermana y sobrina por ser la palabra, la fuerza, la esperanza y la motivación que necesita mi vida.

Milena Patricia Barbosa Barrero

A mis padres, porque hicieron de mí una mujer fuerte y dedicada que hoy cumple una meta más.

A mis hermanos, por su esfuerzo incondicional en apoyarme, gracias a ustedes pude lograr este gran sueño.

A mi novio, porque durante todo este tiempo ha sido la palabra de amor necesaria para triunfar.

Brigete Stephany Gonzalez Chaves

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y a su cuerpo docente por brindarnos los conocimientos y las habilidades necesarias para desarrollar este proyecto.

A la docente Gladys Pinilla por su compromiso y entrega en la ejecución de este proyecto.

Al grupo de investigación REMA por acogernos en este semillero y proveernos los materiales y herramientas necesarias para la investigación.

A los hospitales de tercer nivel de la ciudad de Bogotá por facilitarnos las muestras analizadas.

A Maryi Lorena Segura por su ayuda y apoyo constante

Al Departamento de Inmunopatología de la Sífilis de la Universidad de Washington Seattle USA por suministrarnos el control positivo para nuestros ensayos.

Milena Barbosa y Brigete Gonzalez

Tabla de Contenido

Objetivos específicos	18
ANTECEDENTES.....	19
MARCO TEÓRICO	22
1. Generalidades de la Sífilis	22
1.1 Patogenia.....	22
1.2 Sífilis primaria, secundaria y terciaria	23
1.3 Sífilis gestacional y congénita	26
1.4 Infección fetal	27
1.4.1. Sífilis Congénita Temprana	29
1.4.2. Sífilis Congénita Tardía	29
2. Agente etiológico.....	31
2.1 Taxonomía.....	32
2.2 Estructura	33
2.3 Virulencia y Componentes Antigénicos	33
2.4 Genoma.....	34
2.4.1 Gen <i>TpN47</i>	35
3. Inmunología.....	35
3.1 Respuesta Inmune	35
3.2 Mecanismo de Evasión	36
4. Epidemiología.....	37
4.1 Sífilis Congénita.....	38
5. Diagnóstico.....	40
5.1 Pruebas directas.....	41
5.2 Pruebas serológicas.....	41
5.2.1 Pruebas no treponémicas.....	42
5.2.2 Pruebas Treponémicas	43
5.3 Pruebas Moleculares.....	45
5.3.1 Fundamento de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	45
5.3.2 PCR en Tiempo Real (PCR tr)	45
5.3.3 PCR en tiempo real en el diagnóstico de sífilis.....	47
6. Tratamiento y Prevención	48
METODOLOGÍA	50

7. Tipo de investigación	50
8. Población de estudio.....	50
8.1 Muestra.....	50
9. Controles	50
9.1 Control Positivo	50
9.2 Control Negativo.....	50
9.3 Control Exógeno.....	50
9.4 Control Endógeno de extracción.....	51
9.5 Control Interno de Amplificación	51
10. Muestras Clínicas.....	51
11. Extracción de ADN.....	52
11.1 Control Positivo y Muestras Clínicas	52
11.2 ADN Plasmídico	52
12. PCR Convencional.....	52
12.1 Titulación del ADN.....	53
12.2 Titulación de primers	54
12.3 Ensayo de Sensibilidad en PCR convencional.....	54
13. PCR en Tiempo Real (PCR tr).....	55
13.1 Curva de Calibración para PCR tr	55
13.2 Ensayo de sensibilidad en PCR tr	56
13.3 Ensayo de especificidad en PCR tr	56
14. PCR en Tiempo Real con Sonda Taqman 47 REMA (PCR tr-Taqman)	57
14.1 Curva de Calibración para PCR tr-Taqman.....	58
14.2 Ensayo de sensibilidad en PCR tr-Taqman.....	58
14.3 Ensayo de especificidad en PCR tr-Taqman.....	59
RESULTADOS.....	60
15. PCR Convencional.....	60
15.1 Titulación de ADN	60
15.2 Titulación de los primers <i>TpN47</i>	61
15.3 Ensayo de sensibilidad por PCR convencional	61
16. PCR en Tiempo Real (PCR tr).....	62
16.1 Curva de calibración PCR tr.....	62

16.2 Ensayo de sensibilidad por PCR tr	65
16.3 Ensayo de especificidad por PCR tr	65
16.3.1 Análisis bioinformático de los primers <i>TpN47</i>	67
16.4 Controles negativos en PCR tr.....	71
16.5 Control interno de amplificación en PCR tr.....	71
17. PCR en Tiempo Real con Sonda Taqman (PCR tr Taqman)	72
17.1 Curva de Calibración PCR tr Taqman	72
17.2 Ensayo de sensibilidad PCR tr-Taqman.....	74
17.3 Ensayo de Especificidad PCR Taqman	74
17.3.1 Análisis bioinformático de la sonda Taqman 47 REMA.....	76
17.4 Control Negativo en PCR tr-Taqman.....	79
17.5 Control de amplificación en PCR tr-Taqman	79
18. Valores de Ct.....	80
19. Muestras Clínicas.....	81
DISCUSIÓN	87
CONCLUSIONES	97
ANEXOS	100
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Manifestaciones y secuelas de la sífilis congénita	30
Tabla 2: Cuadro comparativo de las pruebas diagnósticas para sífilis	44
Tabla 3: Tratamiento de la sífilis gestacional	49
Tabla 4: Número de muestras y su clasificación según origen y tipo.....	51
Tabla 5: Condiciones de amplificación del gen TpN47 por PCR convencional	52
Tabla 6: Programa de ciclaje del gen TpN47 por PCR convencional	53
Tabla 7: Características de primers TpN47	54
Tabla 8: Reactivos para la amplificación del gen TpN47 por PCR tr	55
Tabla 9: Programa de ciclaje para el gen TpN47 por PCR tr	55
Tabla 10: Características de la sonda Taqman 47 REMA.....	57
Tabla 11: Reactivos para la amplificación del gen TpN47 por PCR tr-Taqman.....	57
Tabla 12: Condiciones de amplificación para el gen TpN47 por PCR tr-Taqman	58
Tabla 13: Resultados de Ct de la curva de calibración por PCR tr	64
Tabla 14: Resultados de Ct del ensayo de especificidad con PCR tr	66
Tabla 15: Resultados de Ct de las muestras usadas como control de amplificación en PCR tr	72
Tabla 16: Resultados de Ct de la curva de calibración en PCR tr Taqman.....	73
Tabla 17: Resultados de Ct del ensayo de especificidad en PCR tr Taqman	75
Tabla 18: Resultados de Ct de las muestras usadas como control de amplificación en la PCR tr Taqman 47 REMA	80
Tabla 19: Comparación de la sensibilidad entre las variantes de PCR	80
Tabla 20: Comparación de especificidad entre las variantes de PCR	81
Tabla 21: Número y porcentaje de muestras positivas por técnica.....	81
Tabla 22: Comparación de resultados positivos según el tipo de muestra y la técnica empleada	81
Tabla 23: Comparación porcentual de resultados positivos según la técnica utilizada y el tipo de muestra	82
Tabla 24: Interpretación cualitativa y cuantitativa de resultados por PCR tr y PCR tr Taqman .	84
Tabla 25: Condiciones de amplificación para el gen beta actica y TpN47	107
Tabla 26: Programa de ciclaje para el gen beta actina.....	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Patogenia de la enfermedad	23
Figura 2: Chancro sifilítico	24
Figura 3: Lesiones de la etapa secundaria de la sífilis	25
Figura 4: Prevalencia de sífilis gestacional en Colombia, semana epidemiológica 52 de 2017. 39	
Figura 5: Número de casos de sífilis gestacional notificados en Colombia, semana epidemiológica 52 de 2017.....	40
Figura 6: Mecanismo de acción de las sondas de hidrólisis.....	47
Figura 7: Diluciones seriadas en base 10 de ADN plasmídico para ensayo de sensibilidad por PCR convencional	54
Figura 8: Diluciones seriadas en base 10 de ADN plasmídico para ensayo de sensibilidad por PCR tr.....	56
Figura 9: Diluciones seriadas en base 10 de ADN plasmídico para ensayo de sensibilidad por PCR tr Taqman	58
Figura 10: Titulación de ADN de <i>Treponema pallidum</i> subsp <i>pallidum</i>	60
Figura 11: Titulación de primers TpN47	61
Figura 12: Ensayo de sensibilidad por PCR convencional	62
Figura 13: Curva de amplificación del gen TpN47 por PCR tr.....	62
Figura 14: Curva de calibración PCR tr.....	63
Figura 15: Curva melting PCR tr	64
Figura 16: Curva melting del ensayo de especificidad por PCR tr	66
Figura 17: Análisis bioinformático del Primer Forward TpN47	67
Figura 18: Análisis bioinformático del Primer Reverse TpN47	68
Figura 19: Análisis bioinformático de primers TpN47 con plantilla de ADN de <i>Treponema denticola</i>	68
Figura 20: Análisis bioinformático de primers TpN47 con plantilla de ADN de <i>Treponema pallidum</i> subsp <i>pertenue</i>	69
Figura 21: Análisis bioinformático de primers TpN47 con plantilla de ADN de <i>Borrelia burgdorferi</i>	69
Figura 22: Análisis bioinformático de primers TpN47 con plantilla de ADN de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	70
Figura 23: Análisis bioinformático de primers TpN47 con plantilla de ADN de <i>Haemophilus ducreyi</i>	71
Figura 24: Alineamiento de los primers TpN47 en la secuencia del gen TpN47 de <i>Treponema pallidum</i> subsp <i>pallidum</i>	71
Figura 25: Curva de calibración PCR tr Taqman 47 REMA	73
Figura 26: Análisis bioinformático de la Sonda Taqman 47 REMA.....	76
Figura 27: Análisis bioinformático de la sonda Taqman 47 REMA con plantilla de ADN de <i>Treponema denticola</i>	77
Figura 28: Análisis bioinformático de la sonda Taqman 47 REMA con plantilla de ADN de <i>Treponema pallidum</i> subsp <i>pertenue</i>	77

Figura 29: Análisis bioinformático de la sonda Taqman 47 REMA con plantilla de ADN de <i>Borrelia burgdorferi</i>	78
Figura 30: Análisis bioinformático de la sonda Taqman 47 REMA con plantilla de ADN de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	78
Figura 31: Análisis bioinformático de la sonda Taqman 47 REMA con plantilla de ADN de <i>Haemophilus ducreyi</i>	79
Figura 32: Alineamiento de los primers TpN47 y sonda Taqman 47 REMA en la secuencia del gen TpN47	79
Figura 33: Control endógeno de amplificación del ADN de <i>Treponema pallidum</i> subsp <i>pallidum</i> con primers TpN47	108

INDICE DE ANEXOS

ANEXO A: Protocolo de extracción de ADN de muestras clínicas

ANEXO B: Protocolo de extracción de ADN plasmídico

ANEXO C: Control endógeno de amplificación

ANEXO D: Diploma de participación ponencia oral Séptimo Encuentro Institucional de Semilleros de Investigación. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, Colombia.

ANEXO E: Certificados de participación ponencia oral REDCOLSI nodo Bogotá, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, Colombia.



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

DETECCIÓN DE *Treponema pallidum subespecie pallidum* EN MUESTRAS CLÍNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE SÍFILIS CONGÉNITA MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE VARIANTES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL

RESUMEN

La sífilis es una enfermedad sistémica de transmisión sexual, sanguínea, y vertical (congénita, perinatal y neonatal) causada por la espiroqueta *Treponema pallidum subsp pallidum*, que se desarrolla en etapas agudas asintomáticas o sintomáticas y puede llegar a producir infecciones crónicas con secuelas y discapacidades considerables si no es detectada y tratada oportunamente. La sífilis congénita es un importante problema de salud pública en Colombia ya que puede conllevar a padecer una condición con consecuencias graves y un alto costo humano, social y económico para los pacientes.

En el presente estudio, por medio de variantes de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR tr y PCR tr-sondaTaqman) se evaluó la presencia del gen *TpN47* en muestras clínicas para la identificación de *Treponema pallidum subsp pallidum* para comparar la sensibilidad y especificidad de estas variantes.

De 27 muestras procesadas de sangre total periférica y suero de gestantes y neonatos, sangre de cordón umbilical y líquido cefalorraquídeo, el 48,14% arrojaron resultados positivos para la PCR tr y el 81,48% para PCR tr-Taqman en comparación con la técnica serológica VDRL con una especificidad del 100% para ambas variantes. El límite de detección para la PCR tr y PCR tr-Taqman fue de 4,5 fg y 1,135 fg respectivamente.

Se puede concluir que el gen *TpN47* es una diana molecular promisoría y la variante PCR tr-Taqman es una herramienta valiosa para el diagnóstico de sífilis congénita que minimiza tanto los falsos negativos como positivos de las técnicas serológicas.

Palabras Clave: Sífilis, Sífilis congénita, *Treponema pallidum subsp. pallidum*. PCR tr, *TpN47*

INTRODUCCIÓN

Las infecciones de transmisión sexual (ITS) constituyen la principal causa global de enfermedad aguda, infertilidad, discapacidad a largo plazo y muerte, con graves consecuencias tanto médicas como psicológicas para millones de hombres, mujeres y niños. (1) Estas infecciones tienen efectos profundos en la salud sexual y reproductiva de aquellos que las padecen y figuran dentro de las cinco principales razones por las cuales los adultos buscan atención médica (2).

En el año 2016 la OMS (Organización Mundial de la Salud) estimó que a diario más de 1 millón de personas contraen una ITS. También han reportado que anualmente unos 357 millones de personas contraen candidiasis, gonorrea, sífilis o tricomoniasis. Más allá del efecto inmediato de la infección en sí misma, las ITS pueden tener consecuencias graves, algunas como el herpes y la sífilis, pueden triplicar o cuadruplicar el riesgo de contraer VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana). Otra complicación derivada de estas, es la transmisión de la infección al feto que puede dar lugar a muerte prenatal, muerte neonatal, insuficiencia ponderal al nacer y prematuridad, septicemia, neumonía, conjuntivitis neonatal y deformidades congénitas como es el caso de la sífilis (2).

La sífilis es una infección causada por la espiroqueta *Treponema pallidum subsp pallidum*, de distribución mundial, que afecta anualmente a 12 millones de personas, con una alta tasa de morbilidad y mortalidad. Esta infección es un grave problema cuando ocurre en la embarazada, ocasionando sífilis gestacional (SG), debido a que se transmite fácilmente al feto ocasionando sífilis congénita (SC) produciendo graves complicaciones hasta en el 81% de los casos (3).

Aquella sífilis que se diagnostica durante el embarazo, el pos-aborto o el puerperio inmediato se define como sífilis gestacional, la cual se puede encontrar en cualquiera de sus estadios, aunque el más predominante es el latente indeterminado. La sífilis

congénita se presenta cuando la madre sífilítica transmite la infección al feto durante la gestación por vía hematógeno-transplacentaria o durante el parto por el contacto del neonato con lesiones en los genitales maternos (4).

La alta frecuencia de SC revela la fragilidad del servicio diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la infección por parte de las entidades competentes comprometiendo así el control epidemiológico. En el año 2012, 900.000 casos de sífilis se reportaron en mujeres embarazadas, de los cuales 350.000 presentaron complicaciones que incluyeron casos de muerte prenatal. Aunque existen medidas de control de la sífilis materna y congénita, aún se presentan dificultades dentro de la red sanitaria para proporcionar el diagnóstico de la infección durante el periodo prenatal (5)(2).

Debido a que el agente etiológico de la sífilis, no se puede cultivar en medios tradicionales, el diagnóstico de laboratorio se hace normalmente por métodos directos como la detección del microorganismo en muestras clínicas por microscopía de campo oscuro, la muestra empleada para el desarrollo de ésta, es el chancro, el cual es ausente en los neonatos, por lo que en éstos no se lleva a cabo dicho método, también es importante resaltar que este es un procedimiento de alto costo y requiere de personal entrenado, debido a que es necesario identificar y diferenciar al *Treponema pallidum subsp pallidum* de otras espiroquetas comensales, o por métodos indirectos como pruebas serológicas; no obstante, éstas últimas carecen de sensibilidad y especificidad, y no proporcionan una caracterización adicional de las cepas bacterianas implicadas. Por lo tanto, los estudios moleculares pueden considerarse métodos complementarios para el diagnóstico certero de la infección por sífilis, ya que también pueden proporcionar información de tipificación y susceptibilidad a los antibióticos (6).

La identificación de este patógeno en tejido neonatal sospechoso o líquidos corporales, rara vez puede ser llevado a cabo con éxito en el momento del nacimiento o en los primeros meses de vida, debido a la escasez del microorganismo en dichas muestras y a la limitada sensibilidad y especificidad de las pruebas de rutina mencionadas

anteriormente, es por esta razón que se hace imperativo el estudio y la aplicación de técnicas moleculares que permitan el diagnóstico oportuno de sífilis, especialmente de SC (7).

El objetivo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es amplificar un segmento específico de ADN de manera exponencial, ya que después de cada ciclo, si la reacción se lleva a cabo con máxima eficiencia, se duplica la cantidad de ADN existente. La PCR en tiempo real (PCR tr) es una metodología más robusta y ampliamente utilizada en investigación biológica, ya que puede detectar y cuantificar en un vial cerrado, cantidades muy pequeñas de secuencias específicas de ácidos nucleicos, sin necesidad de realizar procedimientos posteriores como la electroforesis (8).

La PCR tr puede identificar la presencia o ausencia de un patógeno, proporciona información sobre la carga en que se encuentra el mismo y aporta información valiosa para suministrar el tratamiento. (9) Además, es una técnica rápida y precisa que limita los falsos positivos que se obtienen en las pruebas no treponémicas, o falsos negativos causados en su mayoría por el efecto prozona especialmente en mujeres embarazadas, pacientes VIH positivos con bajos recuento de células T CD4 y con alta carga treponémica. Adicionalmente, esta técnica optimizada, puede llegar a reducir los costos por muestra y no es dependiente de la subjetividad del operario (10).

La tecnología de ADN recombinante ha permitido la purificación de antígenos treponémicos como el *TpN15*, *TpN17*, *TpN47* y *TmpA*, su clonación y expresión han llevado al desarrollo de pruebas inmunológicas y moleculares como la PCR (11). Estos antígenos han sido utilizados como dianas moleculares en diferentes estudios para la identificación de *Treponema pallidum subsp pallidum* en diferentes especímenes biológicos.

En el presente estudio se evaluó la utilidad clínica de la PCR tr utilizando el gen *TpN47*, que codifica una proteína integral de membrana e inmunógeno dominante de *Treponema pallidum subsp pallidum* ya que en estudios previos dicho gen arrojó resultados promisorios en la detección del agente etiológico de la sífilis con 78,4% de sensibilidad (10). Además, se contó con la utilización de la sonda taqman 47 REMA con el objeto de aumentar la sensibilidad y especificidad de esta técnica molecular para luego comparar los resultados de las dos variantes de PCR tr.

OBJETIVOS

Objetivo General

Comparar la utilización de la PCR en tiempo real con y sin el uso de la sonda taqman 47 REMA en la detección de *Treponema pallidum subsp pallidum* en muestras clínicas para el diagnóstico de sífilis congénita.

Objetivos específicos

- Validar la utilización del gen *TpN47* para la identificación de *Treponema pallidum subsp pallidum* en diferentes muestras clínicas.
- Comparar la especificidad y sensibilidad de la PCR en tiempo real con y sin el uso de sonda taqman 47 REMA.
- Correlacionar los resultados obtenidos con el origen y tipo de muestra.

ANTECEDENTES

Grimprel y colaboradores en 1991; plantearon el diagnóstico de SC como un desafío clínico, debido a que el serodiagnóstico de esta patología tiene limitaciones significativas. Ellos desarrollaron y aplicaron la PCR para la detección de *Treponema pallidum* en material clínico relevante para el diagnóstico de SC. Los materiales clínicos incluyeron líquidos amnióticos, sueros neonatales y líquidos cefalorraquídeos (LCR) neonatales. La PCR fue 100% específica para *T. pallidum* en comparación con la prueba de infectividad del conejo (RIT) y sensible para todos los materiales clínicos ensayados. Para los fluidos amnióticos, la PCR fue 100% sensible cuando se correlacionó con el RIT, pero tuvo una menor sensibilidad cuando se aplicó a sueros o LCR, que típicamente contienen concentraciones muy bajas de treponemas. La sensibilidad combinada de la PCR para todas las muestras clínicas fue del 78% (7).

En el mismo año, Jennifer Burstain y colaboradores publicaron un artículo en la revista de Microbiología Clínica, en este estudio se amplificó una porción de 658 pb del gen *tp47* y se probaron los productos de PCR mediante hibridación ADN-ADN con un fragmento de 496 pares de bases (pb) interno al ADN amplificado. El ensayo detectó aproximadamente 0,01 pg de ADN de *T. pallidum* purificado, y se obtuvo resultados positivos de forma rutinaria a partir de suspensiones de treponemas calculadas para contener 10 o más organismos, y de algunas suspensiones calculadas para contener un único organismo. Se detectó ADN de *T. pallidum* en suero, LCR y fluidos amnióticos de pacientes con sífilis, pero no en controles no sífilíticos (12).

En 2011 se realizó un estudio retrospectivo sobre mujeres reactivas a VDRL con resultados letales de embarazo. A partir de sangre y suero se amplificó el gen *poA* por PCR en el 72.7% (24/33) de las muestras, es decir, en el 80% (8/10) de las mujeres que tuvieron un aborto espontáneo, en el 57.9% (11/19) de aquellos cuyo hijo nació muerto y en el 71.4% (5/7) de aquellos cuyo hijo nació vivo y murió después del parto (5).

En 2012 se realizó un ensayo de PCR anidado (nPCR) amplificando el gen *tpp47* de *T. pallidum* de muestras de hisopados de úlceras y sangre. Se estudiaron 294 pacientes con sospecha de sífilis y 35 voluntarios sanos, en general, en el análisis de la PCR de muestras de hisopados, los resultados fueron altamente concordantes con el diagnóstico de sífilis, con una sensibilidad del 82% y una especificidad del 95%, sin embargo, no se evidenció la misma concordancia cuando se evaluaron las muestras de sangre (13).

En 2014 se publica un artículo titulado "Performance of the 47-kilodalton membrane protein versus DNA polymerase I genes for detection of *Treponema pallidum* by PCR in ulcers" donde se realizó un estudio prospectivo multicéntrico en cinco ciudades europeas. En este estudio, se probó secuencialmente 272 muestras de pacientes con úlceras de transmisión sexual utilizando Tp-PCR dirigido a los genes *tpp47* y luego *polA*. Los dos métodos mostraron precisiones similares y un acuerdo casi perfecto. En conclusión, confirmaron que Tp-PCR es una herramienta de diagnóstico útil para las úlceras que sugieren sífilis primaria y que los resultados no dependen del gen objetivo, lo que sugiere que *tpp47* o *polA* se pueden usar en la práctica. La combinación de los resultados de los dos Tp-PCR no mejoró drásticamente la utilidad clínica de la prueba (14).

Rita Castro y colaboradores en el año 2016, llevan a cabo un estudio cuyo objetivo fue evaluar los genes 47-PCR y *polA*-PCR con la técnica PCR para la detección del ADN de *T. pallidum* en 124 muestras de LCR de pacientes con análisis de sangre reactivos para sífilis. El ADN de *Treponema pallidum* se detectó en 37 de las 124 muestras (29,8%) y 30 de 124 (24,2%) muestras con el 47-PCR y *polA*-PCR respectivamente. Las sensibilidades fueron 75,8% y 69,7% y las especificidades 86,8% y 92,3%, respectivamente (15).

Pinilla y colaboradores en un estudio piloto, mediante la amplificación de una región de 203 pb del gen 16S ADNr del *Treponema pallidum subsp pallidum*, utilizando PCR convencional, determinaron que esta alcanzó 10 veces menos sensibilidad que la obtenida con el gen *polA* (32 ng vs 3.28 ng) para la detección de ADN de la

espiroqueta, también se comprobó que añadiendo una segunda etapa de re-amplificación se aumentó la sensibilidad de estos dos genes, en cuanto al gen *poIA* los resultados muestran que logra una sensibilidad del orden de los nanogramos (ng) por PCR convencional y de picogramos (pg) por PCR tr; por otra parte con el gen *TpN47* se evidenció una sensibilidad del orden de pg utilizando tanto nPCR como PCR tr y una especificidad del 100% (16).

En abril del 2017 Pinilla y colaboradores publicaron un estudio titulado “Detección de *Treponema pallidum subespecie pallidum* para el diagnóstico de sífilis congénita mediante reacción en cadena de la polimerasa anidada”. La sensibilidad alcanzada por PCR convencional utilizando el gen blanco *TpN47* fue de 52 pg, mientras que con nPCR la sensibilidad alcanzada fue de 0.52 pg. Se encontró que los primers *TpN47* y *poIA* tienen una especificidad del 100%, también se evidenció que existe concordancia entre los resultados obtenidos con nPCR y las pruebas serológicas (17).

En 2017 Gama y colaboradores publicaron un estudio donde identificaban el gen *poIA* utilizando PCR tr a partir de muestras embebidas en parafina que habían dado resultados positivos para sífilis por inmunohistoquímica lo que les confirmaba el diagnóstico; sin embargo, al utilizar PCR convencional solo el 64.7% de las muestras fueron positivas, no obstante, cuando las muestras fueron procesadas por PCR tr con sonda taqman el 100% de las muestras fueron positivas (10).

MARCO TEÓRICO

1. Generalidades de la Sífilis

La sífilis es una infección crónica generalizada causada por la espiroqueta *Treponema pallidum subsp pallidum*,⁽¹⁸⁾ transmitida a través del contacto sexual, ya sea por vía vaginal, anal u oral, o por el contacto directo con las lesiones o heridas húmedas, estas lesiones son conocidas como chancros los cuales son indoloros, por lo tanto si en el área bucal se encuentra este tipo de heridas, la espiroqueta puede transmitirse a través de los besos. Esta infección es de suma importancia en las gestantes ya que éstas pueden transmitirla a sus hijos durante el periodo de gestación o a través del canal del parto (19). En el siglo pasado se generó gran preocupación debido a reportes que indicaban la transmisión de esta patología a través de la transfusión sanguínea, en este caso sus síntomas se presentan de 1 a 4 semanas después de la transfusión con manifestaciones que corresponden a la sífilis secundaria principalmente acentuada en las extremidades (20). En otras investigaciones se ha descrito que aunque el agente etiológico de la sífilis puede sobrevivir por más de 5 días en sangre refrigerada, la transmisión sanguínea es de menor importancia, sin embargo, otros estudios afirman que la espiroqueta solo puede sobrevivir entre 24 y 48 horas en condiciones de banco de sangre (21)⁽¹⁹⁾ por lo tanto, aún no es clara su transmisión en este tipo de eventos.

1.1 Patogenia

Treponema pallidum subsp pallidum tiene la capacidad de penetrar en el organismo a través de las membranas mucosas intactas o a través de heridas en la piel causando la lesión primaria o chancro, que contiene un gran número de espiroquetas demostrables por microscopía,⁽²⁰⁾ (22) a partir de allí se disemina por el cuerpo humano a través de los vasos linfáticos o sanguíneos. El período de diseminación varía según el tamaño del inóculo, con aparición en minutos en ganglios linfáticos y en pocas horas a todo el organismo. En la práctica, cualquier órgano del cuerpo humano puede ser invadido incluyendo el sistema nervioso central (SNC) y humor acuoso (20).

La sífilis tiene un periodo de incubación de 12 a 90 días (media de 21 días) (23) y se clasifica en sífilis temprana y tardía. La sífilis temprana se caracteriza por tener una duración corta, aproximadamente de un año y a su vez se divide en sífilis primaria, secundaria o latente temprana. Por otra parte, la sífilis tardía tiene mayor duración e incluye a la sífilis latente tardía, la sífilis terciaria y la neurosífilis (13) (24). *Treponema pallidum* es sensible a la penicilina, por lo que este antibiótico es el tratamiento de elección en todas las etapas de la enfermedad.(25)

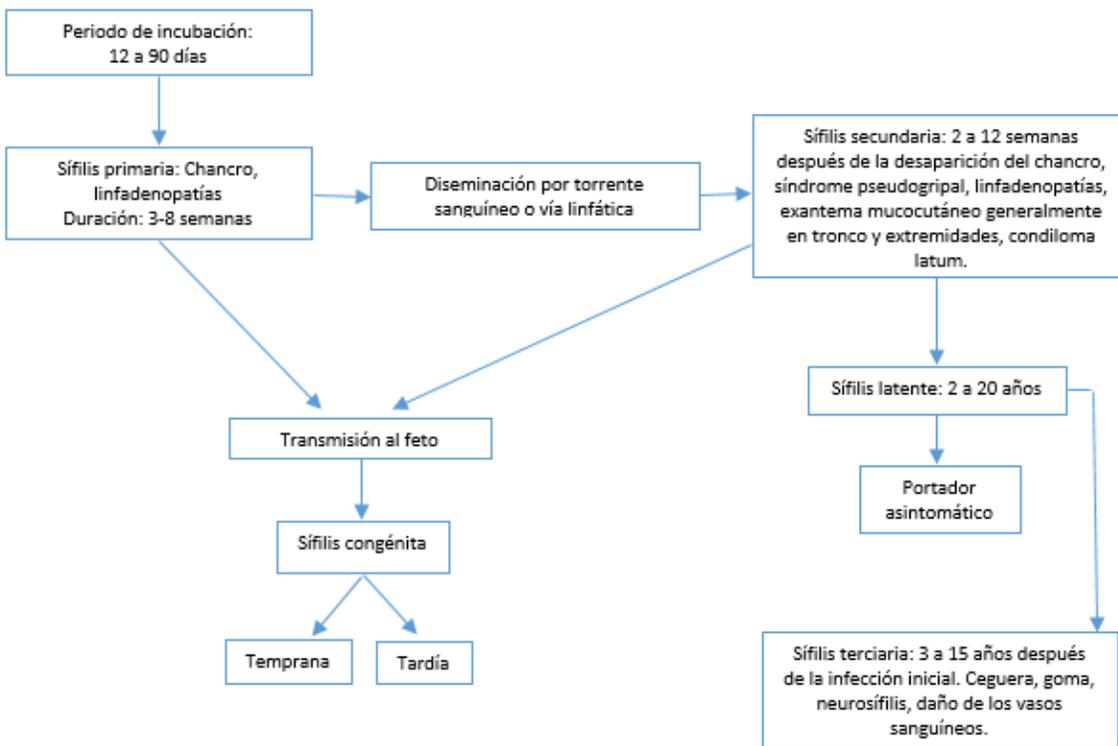


Figura 1: Patogenia de la enfermedad

Fuente: Duran T., Campos L., Pinilla G., Detección de *Treponema pallidum subsp pallidum* para el diagnóstico de sífilis congénita mediante reacción en cadena de la polimerasa anidada

1.2 Sífilis primaria, secundaria y terciaria

La sífilis primaria es altamente contagiosa (21) y se presenta poco después del período de incubación, inicialmente aparece como una pápula en el lugar de inoculación que rápidamente se erosiona dando lugar al chancro, este se caracteriza por tener un

diámetro de 0.3 a 3 cm, de base limpia e indurada, no exudativo y es poco o nada doloroso. En los pacientes inmunosuprimidos se pueden presentar múltiples chancros y es precisamente en estas lesiones donde se puede evidenciar la presencia de la espiroqueta con ayuda del microscopio de campo oscuro. Los genitales externos son los lugares más frecuentes donde aparece el chancro, seguidos del cuello uterino, boca, área perianal, etc. Su resolución se lleva a cabo de tres a seis semanas, sin lesión residual (20) (21).

También suele presentarse una linfadenopatía regional que consiste en la inflamación moderada de un ganglio linfático, que no es supurativo (20).

En los pacientes con úlceras sifilíticas se aumenta el riesgo de contraer la infección de VIH por disrupción de las mucosas y barreras epiteliales o por la presencia de macrófagos y linfocitos T CD4 en las úlceras que son las células diana para el VIH (24)(26).



Figura 2: Chancro sifilítico

Fuente: Contreras E, Zuluaga S, Ocampo V. Syphilis: the Great Mimicker

La sífilis secundaria empieza entre dos y ocho semanas después de la aparición del chancro, pudiendo estar éste presente todavía. Se produce en consecuencia a que *Treponema pallidum subsp pallidum* se disemina por el torrente sanguíneo o por vía linfática llegando así a todos los órganos y a la mayoría de los líquidos corporales (20)(26). Dentro de las manifestaciones se pueden encontrar el exantema maculopapular o pústular, que puede afectar cualquier superficie del cuerpo, siendo

frecuente su localización en palmas de las manos y plantas de los pies, lo cual orienta el diagnóstico y tiene una duración aproximada de 8 semanas (20).

La sintomatología sistémica incluye fiebre, faringitis, anorexia, artralgia y linfadenopatía generalizada, puede presentarse hepatitis sifilítica, alteraciones del sistema digestivo, cefaleas y meningismo, sinovitis, artritis y en el 40% de los casos el riñón se ve afectado debido a la presencia de complejos inmunes (20).

Si durante la fase primaria y secundaria de la enfermedad no se suministra el tratamiento adecuado, la infección entra en la etapa latente temprana, durante la cual se puede transmitir la infección al feto, aunque no se observan manifestaciones clínicas (26).



Figura 3: Lesiones de la etapa secundaria de la sífilis

Se observan sifilides máculo-papulosas y escamosas.

Fuente: Contreras E, Zuluaga S, Ocampo V. Syphilis: the Great Mimicker

La latencia ocurre después de la desaparición espontánea y abrupta de las manifestaciones clínicas de la sífilis secundaria, esta fase puede durar desde unos pocos hasta 25 años antes de que se manifiesten las lesiones destructivas de la sífilis terciaria. Generalmente en este periodo hay ausencia de sintomatología; sin embargo, hay progreso de la enfermedad detectándose únicamente mediante pruebas serológicas (27).

Este periodo se divide en latente temprano que abarca los primeros 11 meses y latente tardío. El primero se considera potencialmente infeccioso y normalmente abarca el primer año después de la resolución de la sífilis primaria y secundaria, por su parte el segundo se caracteriza por el desarrollo de resistencia adquirida (no duradera) contra la infección. Aunque la fase latente tardía no se considera infecciosa como la latente temprana, en las dos, las gestantes pueden transmitir la infección al feto (21)(27).

La sífilis terciaria es lentamente progresiva y puede afectar cualquier órgano (27). Usualmente solo afecta al 50% de los individuos enfermos y aparece varios años después de la fase secundaria, se caracteriza por la aparición de lesiones denominadas “gomas” o “sifilomas”, en tejidos blandos y huesos (21). Esta fase de la enfermedad representa una reacción de hipersensibilidad a pequeñas cantidades de *Treponema pallidum* que crecen y persisten en los tejidos, los síntomas dependen del lugar donde se presenten estas reacciones (28).

Se ha determinado que tras varios años o incluso décadas desde el inicio de la enfermedad, aproximadamente la tercera parte de los pacientes con sífilis latente no tratada tendrá manifestaciones como la neurosífilis tardía (parálisis general o tabes dorsal), sífilis cardiovascular o sífilis gomatosa. La sífilis cardiovascular se manifiesta con mayor frecuencia como un aneurisma de la aorta ascendente, insuficiencia valvular aórtica o enfermedad coronaria (29).

Los sifilomas corresponden a lesiones reactivas y granulomatosas que si bien contienen pocas espiroquetas, son el resultado de una exagerada respuesta inmunológica, se pueden considerar lesiones benignas, aunque sin el tratamiento adecuado pueden afectar gravemente los órganos implicados (21).

1.3 Sífilis gestacional y congénita

La mayor importancia que tiene la sífilis para la salud pública es la capacidad que tiene la mujer gestante de transmitirla a su hijo durante cualquier momento de la gravidez, lo que puede originar consecuencias nefastas e incluso la muerte (30).

La SG es la principal consecuencia de la falla en el sistema de atención prenatal, así como de los programas de control de la sífilis y en general del control de las infecciones transmitidas sexualmente (31).

1.4 Infección fetal

Las espiroquetas pueden atravesar la placenta e infectar al feto (26). La transmisión vertical puede ocurrir en cualquier estadio de la sífilis materna; sin embargo, el riesgo de transmisión es directamente proporcional con la carga treponémica presente en la circulación sanguínea de la madre, por consiguiente, la sífilis primaria y secundaria tienen mayor riesgo de transmisión al producto de la gestación en comparación con la fase latente o terciaria (32).

Según la ley de Kassowitz, cuanto más largo es el intervalo entre la infección y el embarazo, más benigno es el resultado en el bebé. Reportes anteriores sobre la sífilis en el embarazo informaron un riesgo de transmisión del 70% al 100% con sífilis primaria o secundaria no tratada y del 40% con sífilis latente temprana no tratada, además, refieren una tasa de transmisión de hasta 10% con sífilis latente tardía no tratada, pero no está claro si la transmisión en esta etapa se debe a reinfección o a recaída ya que no es común encontrar espiroquetas en sangre materna en la etapa latente tardía (33).

La SC es la complicación más devastadora cuando se trata de sífilis materna o gestacional (32) sus manifestaciones están influenciadas directamente por la edad gestacional, la etapa de sífilis materna, si la gestante recibió o no tratamiento y la respuesta inmunológica del feto (26)(32).

La manera más común de transmisión vertical es por vía transplacentaria, seguida de la transmisión que se presenta por el contacto del neonato con lesiones durante el parto vaginal. La mayoría de los bebés se infectan en el útero después del cuarto mes de gestación, no obstante, la infección puede ocurrir desde la novena semana (33).

Aproximadamente el 40% de los embarazos en mujeres con sífilis infecciosa (primaria, secundaria o latente precoz) provocan la muerte fetal. Los bebés o infantes sin

tratamiento con infección severa en el útero pueden presentar ceguera, sordera y secuelas neurológicas, alteraciones dentales y ortopédicas (33).

Dentro de las complicaciones en el embarazo derivadas de la infección treponémica se puede identificar, la restricción del crecimiento intrauterino, hidrops fetal no-inmune, mortinatos, partos a pre-término y abortos espontáneos, estos últimos generalmente después del primer trimestre (32)(26).

Dentro de las causas más comunes de muerte fetal se encuentran la infección de la placenta y la reducción del flujo sanguíneo que conlleva a la poca oxigenación del feto. Durante los primeros 4 años de enfermedad de una mujer no diagnosticada ni tratada, el riesgo de infección fetal es del 70%, en estos casos el 35% de los fetos infectados nacen vivos con SC y el bajo peso al nacer puede ser el único signo de infección. De hecho, alrededor del 60% de los nacidos vivos son asintomáticos al nacer (26).

La SC ha sido clasificada en sífilis congénita temprana y sífilis congénita tardía. En la primera los signos aparecen en los primeros 2 años de vida y son el resultado de la infección activa y la inflamación, por su parte, en la sífilis congénita tardía los signos aparecen en las dos primeras décadas y corresponden a malformaciones o estigmas que representan las cicatrices inducidas por lesiones iniciales de la temprana o puede ser el resultado de la inflamación crónica. Una vez se ha presentado la infección fetal, cualquier órgano del cuerpo puede verse afectado debido a la diseminación de las espiroquetas (26).

Se puede sospechar de SC en aquellos infantes nacidos de madres con sífilis activa y no tratadas, tratadas inadecuadamente o aquellas gestantes que fueron tratadas cuatro semanas antes del parto; infantes con signos y síntomas de SC; nacidos muertos sin evidencia de otras patologías y serología de la madre positiva o desconocida en el momento del parto (33).

A excepción de la lesión primaria que no se presenta en la SC debido a que la infección involucra la placenta y la transmisión al feto es hematógena, todos los demás cambios patológicos ocurren igual que en la forma adquirida (34).

1.4.1. Sífilis Congénita Temprana

Hace referencia a las manifestaciones clínicas que se presentan durante los primeros dos años de vida, algunas de ellas pueden ser detectadas en el momento del nacimiento. La hepatoesplenomegalia se presenta hasta en el 50% de los casos y la ictericia hasta en el 33% y es secundaria a la hepatitis; la rinitis puede conllevar a una laringitis manifestada como llanto afónico, las lesiones óseas son muy frecuentes en esta etapa cuando la enfermedad no es tratada. La osteítis, periostitis y osteocondritis se presentan en el 80 a 90% de los casos y generalmente requieren estudios radiológicos para su demostración (34).

El cuanto al compromiso del SNC puede presentarse hasta en el 60% de los pacientes, pudiendo pasar desapercibida desde el punto de vista clínico, detectándose únicamente mediante estudio del LCR cuya principal característica es la pleocitosis, además de un VDRL reactivo. Otros hallazgos incluyen la hidrocefalia leve, progresiva y comunicante, puede haber parálisis de nervios craneales, con compromiso del par VII más frecuentemente, pero puede afectar el par III, IV y VI. Las manifestaciones oculares incluyen coriorretinitis en sal y pimienta, glaucoma, uveítis y cataratas (34).(ver tabla 1)

1.4.2. Sífilis Congénita Tardía

Son malformaciones o estigmas causados por la inflamación o escaras asociadas a la infección en la fase temprana. Se presentan después de los 2 años de vida y pueden ser prevenidas cuando se suministra tratamiento adecuado durante el embarazo o durante los primeros tres meses de vida extrauterina (34).

En cuanto a la sífilis congénita tardía es raro que se presente y cursa con vasculitis sífilítica que puede dar lugar a anomalías dentales (dientes de Hutchinson), queratitis intersticial es la manifestación ocular típica y la sordera nerviosa se produce en un 3%

de los casos. Estas manifestaciones se denominan triada de Hutchinson. En pocos casos se observa hidrocefalia y convulsiones, entre otros (26). (ver tabla 1)

Tabla 1: Manifestaciones y secuelas de la sífilis congénita

Manifestación Clínica	Sífilis Congénita Temprana	Sífilis Congénita Tardía
Megalias	La hepatoesplenomegalia se presenta hasta en el 50% de los casos.	
Manifestaciones hematológicas	Anemia, Coombs negativo, leucopenia o reacción leucemoide, trombocitopenia con petequias y púrpura ocurre en aproximadamente 30% de los pacientes.	
Rinitis	Se presenta entre la primera semana y el tercer mes de vida. se caracteriza por descarga mucosa (alta carga treponémica) que se vuelve progresivamente más profusa y ocasionalmente es sanguinolenta	Puede llevar a la destrucción del cartílago nasal que se conoce como nariz en silla de montar.
Manifestaciones mucocutáneas	El exantema maculopapular. Otra forma de lesión cutánea es el pénfigo sifilítico y los condilomas que se presentan en áreas de mayor temperatura corporal como la región perianal o perioral.	
Lesiones Oseas	La osteítis, periostitis y osteocondritis se presentan en el 80 a 90% de los casos. Pseudoparálisis de Parrot	Frente olímpica, la tibia en sable, el engrosamiento de la unión esternoclavicular (signo de Higouménakis) y las articulaciones de Clutton caracterizadas por sinovitis con hidrartrosis.
Manifestación renal	El Síndrome Nefrótico que generalmente se presenta entre los 2 a 3 meses de vida.	

Manifestaciones oculares	Coriorretinitis en sal y pimienta, glaucoma, uveítis, cataratas.	Queratitis intersticial puede llevar a glaucoma u opacidad corneal.
Alteraciones Auditivas		Sordera uni o bilateral y vértigo.
Alteraciones en la dentición		Dientes de Hutchinson (anomalías de los incisivos centrales superiores) y Molares en mora.
Compromiso del SNC	Pleocitosis, hidrocefalia leve, parálisis de nervios craneales.	Retardo mental, hidrocefalias, convulsiones, anomalías de pares craneales incluyendo ceguera y sordera.
Otras	La ictericia se presenta hasta en el 33% de los casos y es secundaria a la hepatitis. Neumonitis, neumonía alba, miocarditis, pancreatitis, diarrea por malabsorción debido a inflamación y fibrosis a nivel del tracto genital.	Es poco frecuente las escaras lineales que se vuelven fisuradas o ulceradas y reciben el nombre de rágadez.

Fuente: González B, Barbosa. M autoras del presente trabajo. Modificado de Sífilis congénita Maribel Rivera

2. Agente etiológico

El género *Treponema* contiene especies tanto patógenas como no patógenas. Los patógenos humanos causan cuatro treponematosi: sífilis (*T. pallidum subsp pallidum*), pian o frambesia (*T. pallidum subsp pertenue*), sífilis endémica o bejel (*T. pallidum subsp endemicum*) y la pinta (*T. carateum*). Los treponemas no patógenos pueden ser parte de la flora normal del tracto intestinal, la cavidad oral o el tracto genital. Estas espiroquetas no pueden distinguirse por criterios morfológicos, antigénicos o bioquímicos por lo que su diferenciación se debe basar en ubicación geográfica, lo mecanismos de transmisión y las manifestaciones clínicas (35).

Los treponemas son organismos helicoidales en forma de sacacorchos que miden de 6 a 15 μm de largo y de 0,1 a 0,2 μm de ancho, no logran una adecuada coloración con tintes de anilina. Cuando están vivos son demasiado delgados para ser vistos con microscopía de luz convencional, así que solo pueden visualizarse mediante el uso de microscopía de campo oscuro. *Treponema pallidum subsp pallidum* exhibe una motilidad característica que consiste en una rotación rápida alrededor de su eje longitudinal, contracciones flexuosas y movimiento helicoidal (35)(36).

Treponema pallidum subsp pallidum es un microorganismo exigente que muestra rangos óptimos de pH y temperatura de 7.2 a 7.4 y 30 a 37 ° C respectivamente. Se inactiva rápidamente por el calor moderado, el frío, la desecación y la mayoría de los desinfectantes. Se considera microaerófilo ya que carece de enzimas que detoxifican las moléculas de oxígeno como catalasa y oxidasa y se multiplica por fisión binaria. El tiempo de duplicación in vivo es de aproximadamente de 30 horas. A pesar de los intensos esfuerzos , ninguno de los treponemas patógenos se han cultivado con éxito in vitro debido a que no realizan el ciclo de los ácidos tricarbónicos y la cadena de transporte de electrones, por tanto, no tienen una forma eficiente para producir energía (ATP) y dependen de las células hospedadoras para la obtención de todas las purinas y pirimidinas (35)(37).

2.1 Taxonomía

El *Treponema pallidum* es una espiroqueta Gram negativa clasificada dentro del dominio bacteria, filo Spirochaete, clase Spirichaetes, orden *Spirochaetales* y la familia *Spirochaetaceae*, en el género *Treponema* y especie *pallidum* (36). La familia *spirochaetaceae* también incluye el género *Leptospira* y *Borrelia*.

2.2 Estructura

La composición de *Treponema pallidum subsp pallidum* (peso seco) es de aproximadamente 70 % de proteínas, 20 % de lípidos y 5 % de carbohidratos. Su composición lipídica es compleja y consta de varios fosfolípidos como la cardiolipina (35).

En cada extremo del microorganismo en el espacio periplásmico se fijan filamentos axiales o endoflagelos que median la movilidad y adherencia en la célula huésped. Su membrana exterior se constituye principalmente por fosfolípidos y una concentración baja de proteínas. Esta característica fisiológica sumada al tiempo lento de multiplicación in vivo, puede explicar su habilidad para persistir en el huésped infectado. También contiene una capa de peptidoglicano y es sensible a los agentes beta-lactámicos como la penicilina (23).

2.3 Virulencia y Componentes Antigénicos

En cuanto a la virulencia del *Treponema pallidum subsp pallidum*, los principales factores se relacionan con las siguientes características:

1. La capacidad del microorganismo para transitar por diversas mucosas e invadir el cuerpo del hospedero.
2. Su movilidad tipo "sacacorchos", que promueve el cruce de las capas tisulares.
3. Su capacidad para atravesar placenta.

La membrana externa de la espiroqueta participa en uno de los procesos más importantes de la patogénesis e inmunidad, contribuyendo en la adherencia de las células hospederas y sirviendo como blanco de los anticuerpos opsonizantes respectivamente. Por otro lado, este microorganismo posee una membrana externa poco inmunogénica, hecho que es necesario analizar, puesto que contribuiría a su prolongada permanencia dentro del hospedero (23).

Finalmente, la diseminación se lleva a cabo gracias a la capacidad de las bacterias para producir hialuronidasa que degrada la sustancia basal de diversos tejidos humanos y de esta manera pueden penetrar las monocapas de células endoteliales y las membranas intactas, este hecho constituye un factor virulencia fundamental (23).

2.4 Genoma

La secuencia de ADN genómico de *Treponema pallidum subsp pallidum* (Nichols), comprende un cromosoma circular de 1.138.006 pb que contienen 1041 marcos de lectura abiertos (ORFs), es decir codifica 1041 proteínas, no contiene elementos extracromosomales y tiene una composición de base G + C del 52,8% (38)(39). Únicamente el 52% de los genes tienen funciones asignadas, el 27% funciones desconocidas y el 17% presenta similitud con otras especies de bacterias (39).

Al caracterizar genéticamente las cepas de *Treponema pallidum* pueden ser divididas en dos grupos: como cepas Nichols y como cepas SS14, estas cepas fueron secuenciadas completamente en 1998 y 2008 respectivamente y con esta secuenciación se confirma mucha de la información experimental anterior a la era genómica (40)(39).

Treponema pallidum cepa Nichols presenta pocas proteínas de superficie ya que solo posee 22 genes de codifican para ellas, en comparación con los 105 de *Borrelia burgdorferi*, su genoma también revela la falta de genes de lipopolisacáridos, tal es el caso de la endotoxina que es habitual encontrarla en la membrana externas de las bacterias Gram negativas y son la principal causa de fiebre e inflamación (39).

2.4.1 Gen *TpN47*

Se han utilizado varios genes de *Treponema pallidum* para su detección mediante PCR. Estos incluyen *tpf-1*, BMP, *tmpA* y *tmpB* y el gen de la proteína de membrana de 47 kDa, la mayoría de las funciones de estos genes son desconocidas o pobremente caracterizadas (41).

Dentro de los genes más utilizados que se han empleado como herramienta molecular diagnóstica en los últimos años, se encuentra el gen *TpN47*, que codifica para el inmunógeno dominante o lipoproteína de membrana de 47 kDa. En estudios previos se ha determinado una sensibilidad y especificidad promisorias utilizando este gen como diana molecular (16).

Aunque algunos han planteado la hipótesis de que la proteína de 47 kDa está implicada en la síntesis de la pared celular y se espera que se conserve en espiroquetas relacionadas, la función exacta del antígeno de 47 kDa no está clara (41).

3. Inmunología

3.1 Respuesta Inmune

Aunque *Treponema pallidum* carece de lipopolisacáridos (LPS), posee numerosas lipoproteínas proinflamatorias que activan eficazmente a varias células del sistema inmunológico incluidos los monocitos, macrófagos, linfocitos y células endoteliales (21).

La sífilis venérea despierta una fuerte respuesta inmune humoral y celular; (39) aunque en la actualidad no se ha descrito el tipo de célula que da inicio a la respuesta inmune, las células dendríticas (CD) (como las células de Langerhans de la epidermidis) son las primeras en detectar antígenos en la piel y en las membranas mucosas, siendo estos los lugares típicos de la primoinfección (42).

Durante la agresión por antígenos extraños, las CD inmaduras en los tejidos periféricos, capturan antígenos a través de fagocitosis y pinocitosis lo que conlleva a la liberación de lipoproteínas microbianas que interactúan con receptores celulares tales como el CD14 (receptor de lipopolisacáridos de macrófagos) y luego, por acción de las citoquinas estas células maduran mientras migran a los nódulos linfáticos, este proceso hace que la capacidad para la fagocitosis se vea reducida mientras aumenta la capacidad para presentar antígenos. Una vez en los ganglios linfáticos las CD inducen una respuesta primaria de células T antígeno específica. Posteriormente las células T activadas migran al sitio de deposición del antígeno. Bajo estas condiciones, las CD actúan como un centinela importante entre el entorno externo y el sistema inmune del huésped, y sirven como la interfaz celular para la transición a la respuesta inmune adaptativa (42)(43)(44).

Para dar inicio a una respuesta de células T antígeno específica, se destacan las células Th1 (sin que ello excluya la participación de las Th2) las cuales, junto con su patrón de citocinas (IL-2, INF- γ e IL-12), promueve la activación de macrófagos y la destrucción bacteriana en la sífilis temprana. En cuanto a la sífilis tardía, se piensa que los linfocitos Th1 sustentan la inmunidad hacia las infecciones (45).

Por su parte, la inmunidad humoral en la sífilis confiere protección pasiva, inhibe la adherencia e invasión de *T. pallidum* en cultivos celulares, potencia la fagocitosis por macrófagos e induce la acción bactericida del complemento dependiente de anticuerpos (46).

3.2 Mecanismo de Evasión

Algunas de las características que presenta *Treponema pallidum* para evadir la respuesta inmunológica del huésped son su exclusiva arquitectura molecular y su capacidad para recubrirse con proteínas u otras sustancias propias del hospedero, tales como la fibronectina, las inmunoglobulinas IgG, la glucosa y la transferrina (47). En cuanto a la arquitectura del microorganismo una gran cápsula (periplasto) de

mucopolisacáridos recubre a los antígenos superficiales impidiendo su detección inmunológica y complementario a esto, tiene algunas proteínas de baja inmunogenicidad (21).

4. Epidemiología

La sífilis se encuentra dentro de las principales causas de enfermedad en la mayoría de los países de América Latina; su situación epidemiológica a nivel mundial ha cambiado en los últimos años ya que su incidencia se ha incrementado en lugares donde se le consideraba bajo control, como en algunas regiones de Europa oriental y occidental (30).

Se estima que cada año más de 5 millones de casos nuevos de sífilis se presentan en todo el mundo y la mayoría de las infecciones ocurre en países en vía de desarrollo, donde la infección es endémica y la infección congénita es frecuente. En los países de ingresos más elevados la infección se presenta primordialmente en los sectores marginados, aquellos con un acceso deficiente a la atención en salud, o en las minorías raciales, étnicas y sexuales (29).

El resurgimiento periódico de la sífilis ha sido atribuido a la falta de continuidad de las medidas de control sanitario y epidemiológico, al cambio en las conductas de riesgo (como el consumo de cocaína, crack, promiscuidad, entre otros) crecimiento demográfico, disminución de la inmunidad parcial a la infección del huésped y a fallas en el diagnóstico oportuno (29).

Epidemiológicamente, la sífilis ha estado estrechamente asociada a la infección por el VIH. Las úlceras genitales sifilíticas están densamente infiltradas con linfocitos (las principales células objetivo de la infección por el VIH) y así proporcionan una puerta de entrada para la adquisición del VIH y un foco para su transmisión (y la de la sífilis) a otros (29).

4.1 Sífilis Congénita

La sífilis persiste como un problema de salud pública afectando a más de 12 millones de personas cada año de las cuales 2 millones corresponden a mujeres embarazadas a pesar de existir un tratamiento eficaz, económico y de fácil acceso. (48)(49) Se calcula que puede haber aproximadamente 459.108 casos de SG en la región de las Américas (exceptuando EE.UU. y Canadá), dando lugar cada año de 164,222 a 344,331 casos de SC (49). Existen regiones en Colombia consideradas endémicas para la sífilis venérea, que reflejan una alta incidencia de SG alcanzando el 1,6% de las gestantes. En el año 2010, el Valle del Cauca reportó una incidencia de 5.4 casos de embarazadas infectadas por 1000 nacidos vivos, datos que ubican al departamento dentro de los más afectados de este país.(48)

En la mayor parte de estos casos, la infección es transmitida al feto entre las semanas 16 y 28 de gestación y conlleva a un pronóstico fatal en el 30-50% de casos. La probabilidad de transmisión al feto durante el periodo de gestación en la sífilis materna primaria es de 70% y en la secundaria es de 90% a 100%. Esta probabilidad tiende a disminuir en la fase latente temprana y tardía alcanzando porcentajes de 30% y 20 % respectivamente (50).

En Colombia, la SC y SG son de notificación obligatoria, y las cifras reportadas por el Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) son de las más alarmantes en Latinoamérica y el Caribe. En el 2011 Colombia reportó 2,9 casos de sífilis congénita/1000 nacidos vivos, un valor que es casi seis veces mayor a la meta estipulada por la Organización Panamericana de Salud (OPS) en su Plan de Eliminación de Sífilis Congénita. Departamentos como el Valle del Cauca, Bogotá, Antioquia y Córdoba son los lugares que reportan mayor número de infectados. Según el Instituto Nacional de Salud (INS) la SC ha pasado de 1,3 a 2,5 casos por mil nacidos vivos, y la gestacional de 1,3 a 5,4 en los últimos 10 años (51)(52).

En Colombia es difícil conocer con exactitud la magnitud real de esta problemática en salud pública debido a que el subregistro es elevado, por ejemplo los casos de mortinatos y abortos asociados a esta enfermedad no se incluyen dentro de las estadísticas epidemiológicas (52).

En la siguiente gráfica se puede observar que las entidades territoriales con mayor razón de prevalencia de sífilis gestacional son: Buenaventura, Quindío, Magdalena, Chocó y Arauca (ver figura 4).

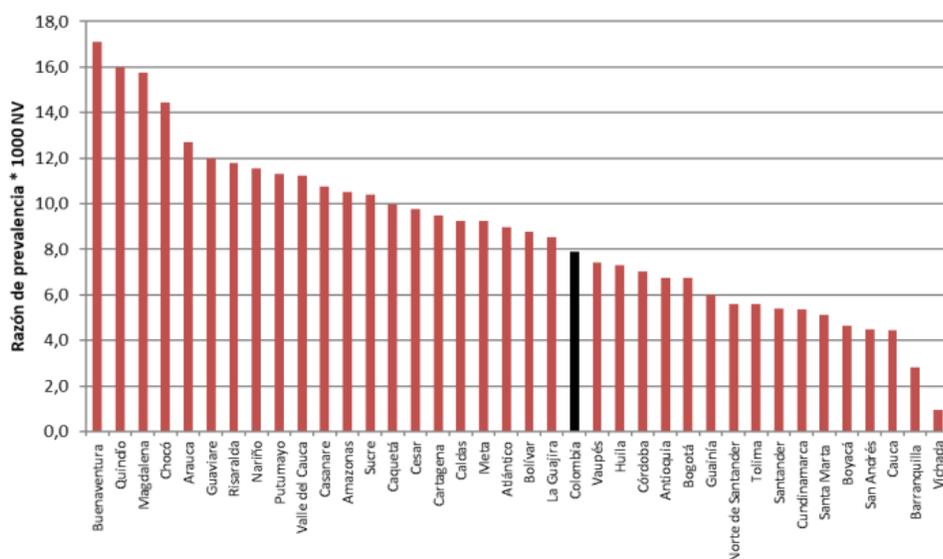


Figura 4: Prevalencia de sífilis gestacional en Colombia, semana epidemiológica 52 de 2017

Fuente: SIVIGILA, Instituto Nacional de Salud, Colombia, 2017

En la siguiente gráfica se puede observar que las entidades territoriales que más casos notifican son: Bogotá D.C, Valle del Cauca, Antioquia, Nariño y Magdalena (ver figura 5).

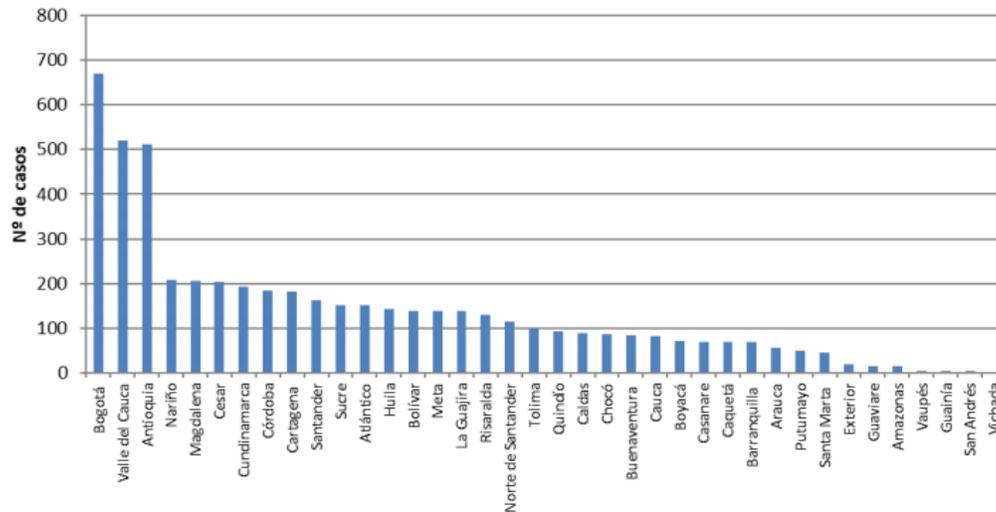


Figura 5: Número de casos de sífilis gestacional notificados en Colombia, semana epidemiológica 52 de 2017

Fuente: SIVIGILA, Instituto Nacional de Salud, Colombia, 2017

5. Diagnóstico

El diagnóstico de sífilis se basa en las manifestaciones clínicas, la observación directa del microorganismo y en pruebas serológicas. La detección de la sífilis a través de la presentación clínica es altamente subjetiva y compleja ya que sus síntomas pueden confundirse con otras patologías y además depende de factores tales como la integridad de la historia clínica, la presencia de lesiones y la experiencia del médico.

Debido a que *Treponema pallidum subsp pallidum* no ha podido ser cultivado fácilmente o teñido con simples tinciones de laboratorio, otros métodos se han desarrollado para identificar la infección en sus diversas etapas. Estas pruebas han sido clasificadas en 4 categorías: (i) examen microscópico directo, utilizado cuando las lesiones están presentes; (ii) pruebas no treponémicas, utilizadas para el cribado; (iii) pruebas treponémicas que son confirmatorias; y (iv) detección directa de antígeno utilizada actualmente en entornos de investigación y como estándar de oro para evaluación de las pruebas (53).

5.1 Pruebas directas

El único método útil para aislar *Treponema pallidum* es la prueba de inoculación en el conejo (RIT). Sin embargo, esta requiere de disponibilidad de animales vivos y tiempo prolongado así que dada su dificultad y peligrosidad sólo se practica en laboratorios de referencia específicos y de investigación (54)(55).

La microscopía de campo oscuro es útil para evaluar las lesiones cutáneas húmedas como el chancro de la sífilis primaria o los condilomas planos de la sífilis secundaria, esta técnica no puede ser usada en úlceras orales o anales ya que es difícil diferenciar *Treponema pallidum subsp pallidum* de otras espiroquetas que puedan estar presentes en dichas cavidades por lo que se requiere de personal entrenado. (56) Se ha estimado una sensibilidad del 74- 86% y especificidad del 97% aunque ésta es dependiente del operario, su sensibilidad se puede ver disminuida si la lesión es tratada con antisépticos (57).

La prueba de anticuerpos fluorescentes directos a *Treponema pallidum* (DFA-TP), se lleva a cabo con anticuerpo policlonal antitreponémico conjugado con fluoresceína en frotis obtenidos de lesiones sospechosas.(56) Esta técnica no requiere organismos móviles y es más sensible y específica que la de microscopía de campo oscuro pero es técnicamente más exigente y más costosa, además la sensibilidad de ambas técnicas puede ser afectada por el tiempo y la condición de la lesión y si esta ha sido o no tratada (57).

5.2 Pruebas serológicas

El diagnóstico presuntivo de sífilis se lleva a cabo mediante pruebas serológicas no treponémicas como Laboratorio de Investigación de Enfermedades Venéreas (VDRL) y Reagina Plasmática Rápida (RPR) y por pruebas que detectan anticuerpos

treponémicos como la absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes (FTA-Abs) y Hemaglutinación de *Treponema pallidum* (TPHA) (5).

La infección sifilítica provoca la aparición de dos tipos de anticuerpos, los anticuerpos anti lipídicos o “reagínicos” que no son específicos de esta patología y anticuerpos antitreponémicos específicos que puede cuantificarse mediante las pruebas no treponémicas y treponémicas respectivamente. Ambas son positivas en las personas que presentan cualquier tipo de infección treponémica, incluidos el pian, la pinta y la sífilis endémica (56).

5.2.1 Pruebas no treponémicas

Los anticuerpos dirigidos contra antígenos fosfolipídicos de la superficie del *Treponema pallidum* crean reacción cruzada con antígenos de cardiolipina, un componente de las membranas celulares y tejidos de los mamíferos. Los ensayos de floculación y aglutinación que detectan estos anticuerpos fosfolipídicos (RPR y VDRL) han sido desarrollados como test de tamizaje no específicos, que se caracterizan por ser simples, rápidos, económicos y tienen mediana especificidad y sensibilidad únicamente en la infección temprana, además ayudan a monitorear la efectividad del tratamiento. Su mayor desventaja es que no pueden ser usados en sangre total, además, pueden arrojar resultados falsos positivos y falsos negativos. Los resultados falsos negativos pueden ocurrir en exceso de anticuerpos (conocido como el fenómeno prozona), la reactividad cruzada también se presenta por otras treponematoses (57). Otras pruebas que se utilizan con menos frecuencia son la prueba sérica con azul de toluidina sin calentar (TRUST), prueba sérica reagínica sin calentamiento (USR) y la prueba de detección de reaginas (RST), en todas ellas, los anticuerpos se detectan mediante la floculación microscópica (VDRL y USR), o macroscópica (RPR, TRUST y RST) de la suspensión antigénica (56).

5.2.2 Pruebas Treponémicas

Las pruebas treponémicas tales como Hemaglutinación de *Treponema pallidum* (TPHA), Prueba de partículas de *Treponema pallidum* (TPPA) y la absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes (FTA-ABS) son usadas para confirmar las pruebas no treponémicas positivas; son pruebas costosas, requieren equipos especiales y conocimientos técnicos, por lo tanto, no están ampliamente disponibles y solo son utilizadas en laboratorios de referencia. Los falsos positivos pueden ser ligeramente más bajos que en los test no treponémicos, estas pruebas no son utilizadas como tamizaje debido a que no muestran sensibilidad en la infección primaria temprana, los anticuerpos treponémicos persisten toda la vida haciendo que estos test sean menos útiles como test confirmatorios en áreas donde la prevalencia es alta, además no es útil para monitorear la efectividad de tratamiento ya que no identifica infecciones presentes, pasadas o reactivación (57).

Tabla 2: Cuadro comparativo de las pruebas diagnósticas para sífilis

Criterio	Para pacientes que presentan lesión o úlcera			Para Tamizaje					
	Microscopía de campo oscuro	Detección de Antígeno (DFA-TP)	Detección de DNA (PCR)	Test no Treponémicos		Test Treponémicos			
				RPR	VDRL	Test Rápido	EIA	TPHA TPPA	FTA-ABS
Muestra	Lesiones (Chancro duro)	Frotis de lesiones	Sangre, LCR, lesiones	Suero o plasma	Suero o plasma	Suero o sangre entera	Suero o plasma	Suero o plasma	Suero o plasma
Sensibilidad	74-86%	73-100%	91%	86-100%	78-100%	84-98%	82-100%	85-100%	70-100%
Especificidad	85-97%	89-100%	99%	93-98%	98%	94-98%	97-100%	98-100%	94-100%
Fácil de usar	Fácil	Moderado	Complejo	Fácil	Fácil	Fácil	Moderado	Complejo	Complejo
Donde es usado	Cuarto de examen o laboratorios	Laboratorios intermedios o de referencia	Laboratorio de referencia	Cuarto de examen o laboratorios	Cuarto de examen o laboratorios	Cuarto de examen o laboratorios	Laboratorios intermedios o de referencia	Laboratorio de referencia	Laboratorio de referencia
Equipo necesario	microscopio óptico con condensador de campo oscuro	Microscopio de fluorescencia	Microcentrifuga, Centrifuga, Termociclador, Incubadora, placa de micropocillos y Lector	Rotador	Microscopio óptico	ninguno	Incubadora, placa de micropocillos, lavador y lector	Incubadora, placa de micropocillos, lavador y lector	Microscopio de fluorescencia
Entrenamiento necesario	Extensivo	Moderado	Extensivo	Mínimo	Mínimo	Mínimo	Moderado	Extensivo	Extensivo
Costo promedio	US\$ 0.40	US\$ 3.00	US\$ 14.00 incluyendo detección de <i>Haemophilus ducreyi</i> y virus del Herpes simple	US\$ 0.50	US\$ 0.50	US\$ 0.55-3.00	US\$ 3.00	US\$ 3.00	US\$ 3.00
Comentarios	Requiere de microorganismos vivos, la especificidad puede verse comprometida por la presencia de escombros <i>Treponema</i> endógenos	No requiere microorganismos vivos	No distingue entre las especies de <i>Treponema pallidum</i> y <i>pertenue</i>	La mayoría de los reactivos requieren refrigeración	Los reactivos requieren refrigeración	La mayoría de las pruebas son estables a temperatura ambiente en menos de 6 meses. El test no distingue entre infecciones activas e infecciones tratadas en el pasado.	Permite ser usado como tamizaje pero no distingue entre infecciones activas e infecciones tratadas en el pasado.	Es una prueba confirmatoria no distingue entre infecciones activas e infecciones tratadas en el pasado.	Es una prueba confirmatoria no distingue entre infecciones activas e infecciones tratadas en el pasado.

DFA-TP: prueba de anticuerpos fluorescentes directos a *Treponema pallidum*; PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa; RPR: Reagina plasmática rápida; VDRL: Laboratorio de Investigación de Enfermedades Venéreas; EIA: Enzimo-inmunoanálisis; TPHA-PTTA: ensayo de hemaglutinación de *Treponema pallidum*; test de partícula de hemaglutinación; FTA-ABS: Absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes

Fuente: Rosanna W. Peeling y Ye Htun Bulletin of the World Health Organization, 2004.

5.3 Pruebas Moleculares

5.3.1 Fundamento de la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica enzimática *in vitro* que amplifica exponencialmente una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos si ellos se llevan a cabo con máxima eficiencia. Para ello, se aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células (58). El inventor de esta técnica fue Kary Mullis por la cual se le adjudicó el Premio Nobel de Química en 1993, quien utilizó la PCR para la amplificación del gen de la b-globina humana (59). En poco tiempo esta técnica ha conseguido ser ampliamente utilizada no sólo en el campo de la genética molecular, sino en otras muchas ciencias ya que aporta gran sensibilidad, reproducibilidad, eficiencia y genera resultados confiables en poco tiempo y fáciles de analizar (58)(59).

5.3.2 PCR en Tiempo Real (PCR tr)

El principio de la técnica se basa en la PCR punto final o convencional, lo que varía es la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción y el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de ADN inicial en la muestra, a diferencia de la PCR punto final, donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia blanco (58). En la PCR tr, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior como la electroforesis en gel de agarosa. Sumado a esto, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación (60).

Los termocicladores utilizados para desarrollar esta técnica molecular incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento la

fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR tr pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos (60).

5.3.2.1 Agentes Intercalantes

Para aumentar significativamente la emisión de fluorescencia en la PCR se emplea diversos fluorocromos como el SYBER Green I, que es el más utilizado en esta técnica molecular; éste se une al ADN de doble hélice y el incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento directamente proporcional a la fluorescencia emitida. El principal inconveniente de estos agentes intercalantes es su baja especificidad dado que se unen de manera indistinta a productos inespecíficos o a los dímeros de primers que son muy frecuentes en la reacción. Por otro lado, este sistema de detección además de ser más económico que las sondas específicas ofrece la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción se realiza muy fácilmente.(60)

Las sondas hibridación están marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso de activación y funcionamiento se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las sondas más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas taqman, las sondas moleculares beacons y las sondas FRET.(60)

5.3.2.2 Sondas de Hidrólisis

Son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo en cada extremo: un donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Este proceso se puede llevar a cabo si las dos moléculas están cerca una de la otra, en este caso, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Durante la amplificación, la sonda se hibrida con su cadena complementaria desplazándose a lo largo en su acción de síntesis, posteriormente actúa la ADN

polimerasa la cual tiene una actividad 5' exonucleasa hidrolizando el extremo 5' de la sonda, lo que produce la liberación del fluorocromo donador. Ahora, como espacialmente están separados ambos fluorocromos el lector capta la fluorescencia emitida por el donador (60)(ver figura 6).

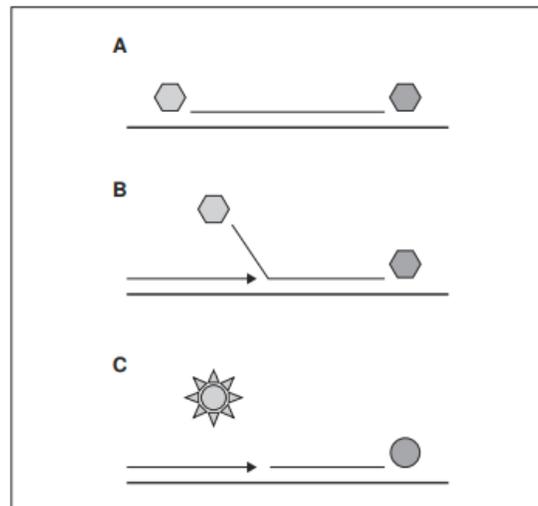


Figura 6: Mecanismo de acción de las sondas de hidrólisis

- A: La sonda Taqman se hibrida con su cadena de ADN complementaria
- B: La ADN polimerasa hidroliza el extremo 5' de la sonda Taqman
- C: Liberación del fluorocromo donador y emisión de fluorescencia

Fuente: Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real

5.3.3 PCR en tiempo real en el diagnóstico de sífilis

Al utilizar técnicas de amplificación genética como la PCR para detectar un agente infeccioso como *Treponema pallidum* se mejora la eficacia diagnóstica al complementar los métodos convencionales utilizados (técnicas serológicas) que en ocasiones deja casos sin diagnosticar. La PCR tr para el diagnóstico de sífilis congénita ofrece ventajas tales como una valoración y dictamen rápido, precoz y fiable del agente etiológico para poder iniciar el tratamiento específico de manera oportuna, resaltando su capacidad de distinguir fácilmente entre *Treponema pallidum* y *Borrelia burgdorferi*; importante debido a que existe reactividad cruzada entre estas dos espiroquetas (61).

Además, el éxito de un tratamiento no sólo se basa en un diagnóstico etiológico precoz, sino también en la determinación rápida de la sensibilidad del agente causal a los fármacos antimicrobianos. La PCR proporciona un método ágil y sencillo para la identificación de mutaciones puntuales asociadas con resistencias a los fármacos (61).

La potencial utilidad de esta técnica para el diagnóstico prenatal es múltiple contribuyendo a la rápida identificación de la enfermedad, ya que de lo contrario podría conducir a resultados adversos del embarazo con efectos perjudiciales sobre el recién nacido (62).

Aunque la PCR es una técnica molecular valiosa, es imperativo tener en cuenta que la contaminación de los reactivos y muestras en cualquiera de las fases de manipulación induce falsos positivos; por otro lado, las condiciones de almacenamiento de las muestras podrían ser la explicación de casos de falsos negativos (7).

6. Tratamiento y Prevención

El fármaco de primera elección para el tratamiento de la sífilis en cualquiera de sus etapas es la penicilina (gestantes y no gestantes) ya que no se ha identificado cepas resistentes. La finalidad del tratamiento está dirigida a tratar la enfermedad de la madre, prevenir la transmisión al feto y tratar la enfermedad fetal establecida (63).

Los paciente que deben recibir tratamiento son aquellos que tuvieron contacto sexual con una o más personas con sífilis documentada, que presenten positividad en exámenes de observación directos, evidencia serológica de sífilis reactivas con pruebas treponémicas y aquellos individuos que luego de ser tratados sigan presentando títulos elevados (63).

En las pacientes gestantes con alergia a penicilina, los fármacos alternativos como Eritromicina, Azitromicina, Ceftriaxona no están recomendados, debido a que no existe la evidencia suficiente para su uso. Por lo cual dichas pacientes deberían someterse al protocolo de desensibilización para la penicilina (63).

Tabla 3: Tratamiento de la sífilis gestacional

Estadío de sífilis	Tratamiento
Primaria, secundaria, latente temprana	Penicilina G benzatínica 2.4 millones de unidades vía IM (1.2 millones en cada región glútea)
Latente tardía, terciaria, latente de duración desconocida	Penicilina G benzatínica 7.2 millones de unidades vía IM (2.4 millones IM semanal por 3 semanas)
Neurosífilis	Penicilina G sódica 18 a 24 millones de unidades diario (3 a 4 millones de unidades cada 4 horas vía intravenosa por 10 a 14 días o Penicilina procaínica 2.4 millones de unidades vía IM cada 24 horas más Probenecid 500 mg vía oral cada 6 horas, por 10 a 14 días)

Fuente: Samalvides F, Banda C. Sífilis en la gestación.

En lactantes y niños con sífilis recién diagnosticada debe examinarse el LCR antes de iniciar el tratamiento. Los Centros de Control y Prevención de Enfermedades Centers for Disease Control and Prevention (CDC) recomiendan tratar a cualquier niño con sífilis congénita tardía con penicilina G cristalina acuosa 50.000 unidades/kg IV cada 4-6 horas durante 10 días. Una sola dosis de penicilina G benzatínica 50.000 unidades/kg IM también se puede dar en la finalización de la terapia intravenosa. Alternativamente, si una evaluación completa es totalmente negativa y el niño está asintomático, se puede usar penicilina G benzatínica 50.000 unidades/kg IM una vez/semana 3 dosis. Muchos pacientes no se vuelven seronegativos, pero sí muestran un descenso de 4 veces en el título de reaginas. Los pacientes deben ser reevaluados periódicamente para garantizar que ha ocurrido la respuesta serológica adecuada a la terapia y que no hay indicios de recaída (64).

METODOLOGÍA

7. Tipo de investigación

Cuantitativa descriptiva

8. Población de estudio

Mujeres gestantes y neonatos atendidos en hospitales de tercer nivel de la ciudad de Bogotá.

8.1 Muestra

Mujeres gestantes con diagnóstico presuntivo de sífilis y neonatos con diagnóstico presuntivo de sífilis congénita atendidos en hospitales de tercer nivel de Bogotá.

9. Controles

9.1 Control Positivo

Exudado de testículo de conejos infectados con la cepa control Nichols, de la bacteria *Treponema pallidum subsp pallidum*. Esta muestra fue proporcionada por el Departamento de Inmunopatología de sífilis de la Universidad de Washington Seattle USA. Los exudados fueron re suspendidos en Buffer de lisis 2X (Tris 10mM pH 8.0, SDS 0,5% y EDTA 0.1M pH 8.0).

9.2 Control Negativo

Muestras de sangre de pacientes sin sospecha clínica de sífilis y con VDRL no reactivos y agua ultrapura.

9.3 Control Exógeno

ADN recombinante (gen *TpN47*). Este fue el patrón usado para realizar la curva de calibración.

9.4 Control Endógeno de extracción

Se realizó amplificación del gen beta actina a muestras clínicas escogidas aleatoriamente según tipo de muestra y amplificación del gen *TpN47* a muestras de *Treponema pallidum subsp pallidum*.

9.5 Control Interno de Amplificación

Se realizó infección in vitro con 2 ul y 5ul ADN de *Treponema pallidum subsp pallidum* a muestras presuntamente positivas y muestras de pacientes no reactivos para sífilis respectivamente.

10. Muestras Clínicas

Se procesaron 27 muestras. En la tabla número 4, se especifica el número, tipo de muestra y procedencia.

Tabla 4: Número de muestras y su clasificación según origen y tipo

Tipo de muestras	Muestras de Gestantes			Muestras de Neonatos			Total de muestras por tipo
	Cantidad	Código *	%	Cantidad	Código *	%	
Sangre total Periférica	4	8,9,10 y 11	14,8	1	27	3,7	5 (18,5%)
Suero	5	1,2,3,13 y 14	18,5	4	4, 5,6 y 7	14,8	9 (33,3 %)
Sangre de cordón umbilical	0	-		2	3a y 12	7,40	2 (7,40 %)
Líquido Cefalorraquídeo	0	-		11	15,16,17, 18,19,20, 21,22,23, 24,25	40,7	11 (40,7%)
Total de muestras							27 (100%)

* Código numérico asignado a cada una de las muestras

11. Extracción de ADN

11.1 Control Positivo y Muestras Clínicas

Se realizó un pretratamiento con Proteinasa K a concentración final de 2 ug/ul, posteriormente se siguieron las indicaciones suministradas en el kit UltraClean® Blood spin DNA isolation kit MOBIO. (ver anexo A)

11.2 ADN Plasmídico

Se siguieron las especificaciones del kit UltraClean 6 minutes mini plasmid prep kit MOBIO. Posteriormente se verificó la integridad de ADN por electroforesis y se realizó cuantificación por espectrofotometría nanodrop. (ver anexo B)

12. PCR Convencional

Como control endógeno de extracción se utilizó: ADN humano proveniente de las muestras clínicas y ADN de *Treponema pallidum subsp pallidum* proveniente de testículo de conejo; a estos se les realizó PCR con primers dirigidos al gen beta actina y al gen *TpN47* respectivamente. (ver anexo C)

Las condiciones de amplificación del producto de 210 pares de bases del gen *TpN47* se basaron en ensayos previos estandarizados por Pinilla y colaboradores (16).

En las tablas 5 y 6 se muestran las condiciones de amplificación y el programa de ciclaje.

Se utilizó la polimerasa Taq Flexi DNA Polymerase de Promega; Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en el termociclador Maxigene. Los productos fueron analizados en geles de agarosa teñidos con GelRed Nucleic Acid stain y se utilizó patrón de peso molecular (Bioline).

Tabla 5: Condiciones de amplificación del gen *TpN47* por PCR convencional

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen inicial para 20 ul
Agua	10.1uL

Buffer	5x	1x	4uL
MgCl ₂	25mM	3mM	2,4uL
dNTPs	10mM	0.2mM	0,4uL
Primer forward	10uM	0.25uM	0,5uL
Primer reverse	10uM	0.25uM	0,5uL
Taq polimerasa	5U/uL	0.025U/uL	0.1uL
ADN	2ul

Tabla 6: Programa de ciclaje del gen TpN47 por PCR convencional

Fase	Temperatura	Tiempo	Numero de Ciclos
Denaturación inicial	94°C	5 min	1
Denaturación	94°C	30 seg	35
Hibridación	62°C	45 seg	
Elongación	72°C	45 seg	
Elongación final	72°C	10 min	1
Conservación	10°C	5 min	

12.1 Titulación del ADN

Se realizaron 6 diluciones seriadas en base 2 por duplicado de ADN de *Treponema pallidum subsp pallidum* con una concentración y cantidad inicial de ADN de 17,84 ng/ul y 35,68 ng respectivamente. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

12.2 Titulación de primers

Se realizaron diluciones seriadas por duplicado de los primers *TpN47* con las siguientes concentraciones: 0,125 – 0,15 – 0,20 y 0.25 uM. Los productos de amplificación se analizaron en gel de agarosa al 1.5%.

Tabla 7: Características de primers TpN47

Nombre	Secuencia 5' 3'	Long	Tm	%GC	Ubicación en el genoma de <i>Treponema pallidum</i>	Tamaño de producto
TpN47-1sifF	GCATTGTCTTAAG GCCGTTG	20 pb	60-64°C	50	672-692	210 pb
TpN47-1sifR	AAGCAGTCGAGGG TGCAGTA	20 pb	61°C	55	861-881	210 pb

Fuente: Pinilla G, y colaboradores. Determinación de los genes, 16S ADN_r, polA, y TpN47, en la detección de *Treponema pallidum subsp. pallidum* para el diagnóstico de sífilis congénita.

12.3 Ensayo de Sensibilidad en PCR convencional

ADN plasmídico: 22.7ng/ul

Se realizaron 5 diluciones seriadas en base 10 del ADN plasmídico partiendo de una cantidad de ADN de 45,4 ng.

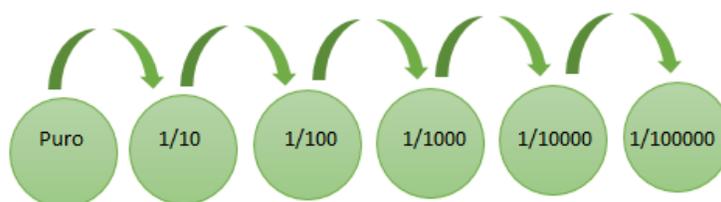


Figura 7: Diluciones seriadas en base 10 de ADN plasmídico para ensayo de sensibilidad por PCR convencional

13. PCR en Tiempo Real (PCR tr)

Las condiciones para la amplificación del gen *TpN47* se basaron en ensayos previos estandarizados por Pinilla y colaboradores (16).

Para la detección del gen *TpN47* por PCR tr se usó el kit GoTaq qPCR Master Mix de Promega y se llevó a cabo en el Termociclador iQ5 (BioRad). Las condiciones de amplificación y ciclaje utilizadas se encuentran en la tabla 8 y 9.

Tabla 8: Reactivos para la amplificación del gen *TpN47* por PCR tr

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen Inicial
SYBR® Green	2x	1x	12.5 uL
Primer Forward	10 uM	0,14 uM	0,35 uL
Primer Reverse	10 uM	0,14 uM	0,35 uL
DNA	-	-	2uL
Agua	-	-	9,8uL

Tabla 9: Programa de ciclaje para el gen *TpN47* por PCR tr

ciclo 1	ciclo 2	ciclo 3 (40 ciclos)		ciclo 4 (81 ciclos) curva melting
Paso 1	Paso 1	Paso 1	Paso 2	Paso 1
50°C	95°C	95°C	62°C	55°C
2 min	3 min	15 Seg	30 seg	30 Seg

13.1 Curva de Calibración para PCR tr

Se realizaron 8 diluciones seriadas en base 10 de ADN plasmídico partiendo de una cantidad inicial de ADN de 45,4 ng. Se realizó el montaje correspondiente en el equipo IQ5, donde se utilizó como agente intercalante el SYBR® Green 1X, una vez

alcanzados los valores adecuados de eficiencia, pendiente y coeficiente de correlación para la curva (Eficiencia 100%, pendiente -3,32 y coeficiente de correlación 0,99), se procedió a realizar los ensayos con las muestras clínicas.

13.2 Ensayo de sensibilidad en PCR tr

La sensibilidad de la técnica se determinó realizando 8 diluciones seriadas en base 10 del ADN plasmídico con una cantidad inicial de 45,4 ng; de esta manera, se conoció cuál es la mínima cantidad de ADN que detectó la técnica.

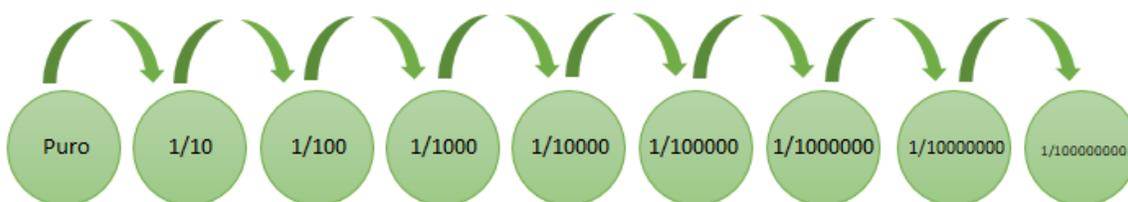


Figura 8: Diluciones seriadas en base 10 de ADN plasmídico para ensayo de sensibilidad por PCR tr

13.3 Ensayo de especificidad en PCR tr

Se realizó análisis bioinformático para corroborar la no complementariedad de los primers con bacterias filogenética y clínicamente relacionadas con *Treponema pallidum subsp pallidum* (*Treponema denticola*, *Treponema pallidum subsp pertenue*, *Borrelia burgdorferi*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus ducreyi*). Adicionalmente se realiza amplificación por PCR tr con ADN de bacterias de importancia clínica como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, y *Klebsiella spp.*

14. PCR en Tiempo Real con Sonda Taqman 47 REMA (PCR tr-Taqman)

Tabla 10: Características de la sonda Taqman 47 REMA

Sonda Taqman: Oligo 47 sonda Sif	
Secuencia	5" CCG TGA ACC TTT ACG TTC GT 3"
Concentración de G y C	50%
nmol	28.0
Tm (C)	58.4
Modificación	5" FAM- 3" BHQ1

Las condiciones para la amplificación del gen *TpN47* utilizando sonda taqman, se basaron en el artículo publicado por Gama y colaboradores (10).

Para la detección del gen *TpN47* por PCR tr se usó la sonda 47 Sif y se llevó a cabo en el Termociclador iQ5 (BioRad). Las condiciones utilizadas están estipuladas en las tablas 11 y 12.

Tabla 11: Reactivos para la amplificación del gen *TpN47* por PCR tr-Taqman

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen
Sonda	1 uM	0.10 uM	2uL
Master mix	2X	1X	10uL
Primer Forward	10 uM	0,14 uM	0,28 uL
Primer Reverse	10 uM	0.14 uM	0,28 uL
DNA	-	-	5uL
Agua	-	-	2.44 uL

Tabla 12: Condiciones de amplificación para el gen TpN47 por PCR tr-Taqman

Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3 (50 ciclos)		
Paso 1	Paso 1	Paso 1	Paso 2	Paso 3
50°C	95°C	95°C	60°C	72°C
2 min	7 min	30 Seg	30 Seg	5 Seg

14.1 Curva de Calibración para PCR tr-Taqman

Se realizaron 9 diluciones seriadas en base 10 de ADN plasmídico con una cantidad inicial de 113,5 ng. Se realiza el montaje correspondiente en el equipo IQ5, donde se utilizó el kit TaqMan Universal PCR Master Mix; una vez alcanzado los valores adecuados de eficiencia, pendiente y coeficiente de correlación para la curva, (Eficiencia 100%, pendiente -3,32 y coeficiente de correlación 0,99) se procedió a realizar los ensayos con las muestras clínicas.

14.2 Ensayo de sensibilidad en PCR tr-Taqman

Se realizaron 9 diluciones seriadas en base 10 del ADN plasmídico con una cantidad inicial de ADN de 113,5 ng, utilizando la sonda taqman 47 REMA; de esta manera, se conoció cuál es la mínima cantidad de ADN que detectó la técnica.

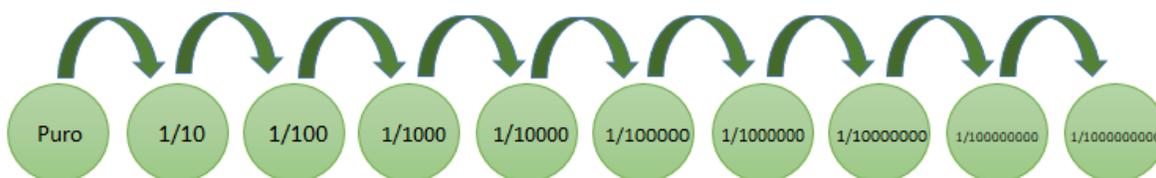


Figura 9: Diluciones seriadas en base 10 de ADN plasmídico para ensayo de sensibilidad por PCR tr Taqman

14.3 Ensayo de especificidad en PCR tr-Taqman

Se realizó análisis bioinformático para corroborar la no complementariedad de la sonda taqman 47 REMA con bacterias filogenética y clínicamente relacionadas con *Treponema pallidum subsp pallidum* (*Treponema denticola* *Treponema pallidum subsp pertenu*, *Borrelia burgdorferi*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus ducreyi*). Adicionalmente se realizó amplificación por PCR tr-Taqman con ADN de bacterias de importancia clínica como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, y *Klebsiella spp.*

RESULTADOS

15. PCR Convencional

Por medio de la PCR convencional se establecen los parametros y condiciones optimas de los reactivos para llevar a cabo los experimentos posteriores por PCR tr y PCR tr Taqman.

Adicionalmente se establece la sensibilidad de la PCR convencional para la detección del gen TpN47 para comparla posteriormente con las sensibilidades obtenidas por PCR tr y PCR tr Taqman.

15.1 Titulación de ADN

Se consideró que la cantidad óptima de ADN para emplear en esta técnica molecular es 2,23 ng, este valor fue determinado por las bandas observadas en el gel de agarosa.

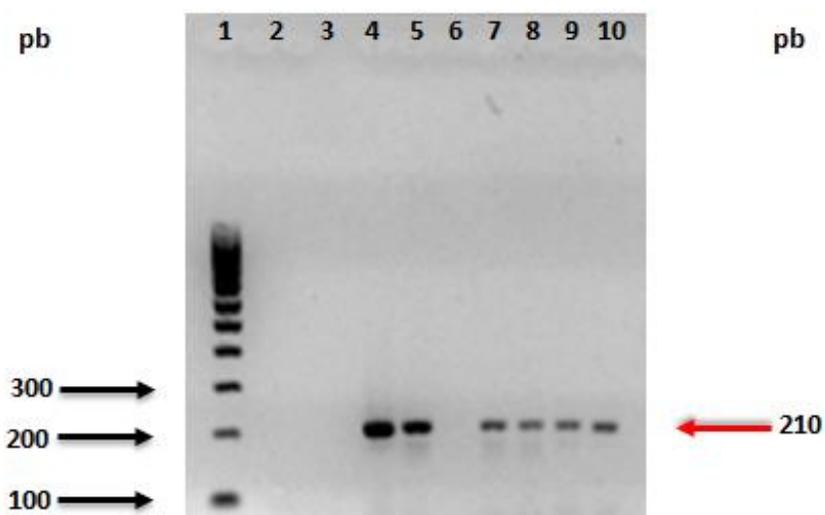


Figura 10: Titulación de ADN de *Treponema pallidum* subsp *pallidum*

Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. **Carril 1.** Marcador de peso molecular 100bp BIOLINE **Carril 2 y 3.** No hay muestra **Carril 4.** ADN puro 35,68 ng **Carril 5.** 17,84 ng **Carril 6.** Control negativo agua ultra pura **Carril 7.** 8,92 ng **Carril 8.** 4,46 ng **Carril 9.** 2,23 ng y **Carril 10.** 1,11 ng

15.2 Titulación de los primers *TpN47*

La concentración óptima de primers fue de 0,14 uM, este valor fue escogido con base en las bandas observadas en la electroforesis en gel de agarosa. Esta concentración de primers será utilizada para PCR tr y PCR tr Taqman.

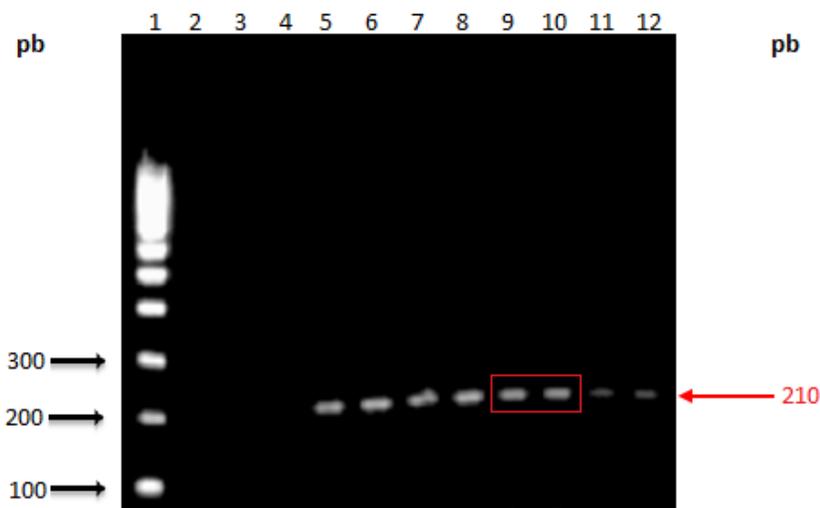


Figura 11: Titulación de primers *TpN47*

Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. **Carril 1.** Marcador de peso molecular 100bp BIOLINE. **Carril 2 y 3.** (sin muestra) **Carril 4.** Control negativo agua ultra pura **Carril 5 y 6.** Concentración 0,25 uM; **Carril 7 y 8.** 0,20 uM; **Carril 9 y 10.** 0,15uM **Carril 11 y 12.** 0,125 uM

15.3 Ensayo de sensibilidad por PCR convencional

La sensibilidad alcanzada en la PCR convencional para detectar la presencia del gen *TpN47* fue del orden de los picogramos, el límite de detección de esta técnica molecular fue de 4,54 pg.

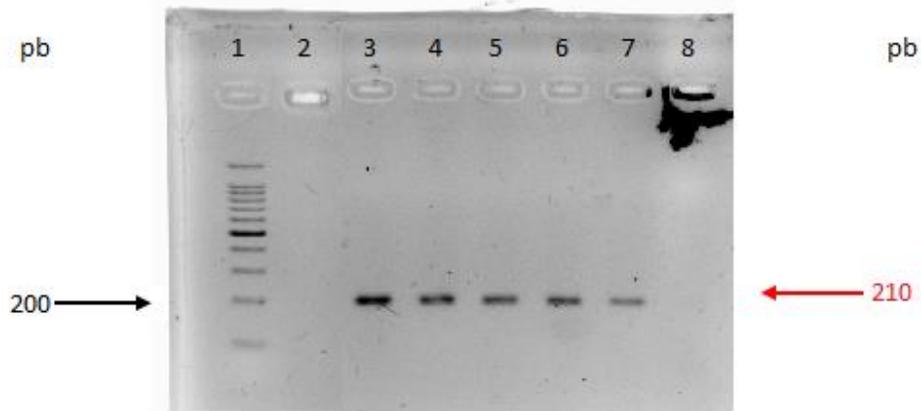


Figura 12: Ensayo de sensibilidad por PCR convencional

Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% **Carril 1.** Marcador de peso molecular 100bp BIOLINE **Carril 2.** Control negativo agua ultra pura **Carril 3.** ADN puro 45400 pg **Carril 4.** 4540 pg **Carril 5.** 454 pg **Carril 6.** 45,4 pg **Carril 7.** 4,54 pg **Carril 8.** 0,454

16. PCR en Tiempo Real (PCR tr)

16.1 Curva de calibración PCR tr

8 Diluciones seriadas de ADN plasmídico con una concentración y cantidad inicial de 22,7ng/ul y 45,4 ng respectivamente; dicha curva se realizó con el objetivo de conocer mediante regresión lineal la cantidad inicial de ADN de las muestras clínicas.

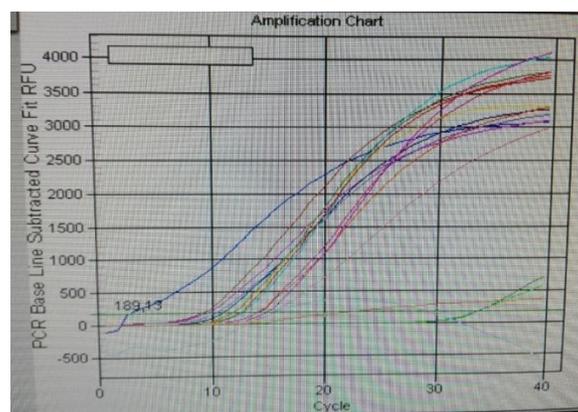


Figura 13: Curva de amplificación del gen TpN47 por PCR tr

Fluorescencia relativa vs. Numero de ciclo.

Esta grafica evidencia la señal fluorescente de cada muestra en función del número de ciclos, las muestras positivas arrojan valores de Ct (ciclo umbral) en un intervalo de 10 hasta 32, por encima de este valor las muestras se consideran negativas.

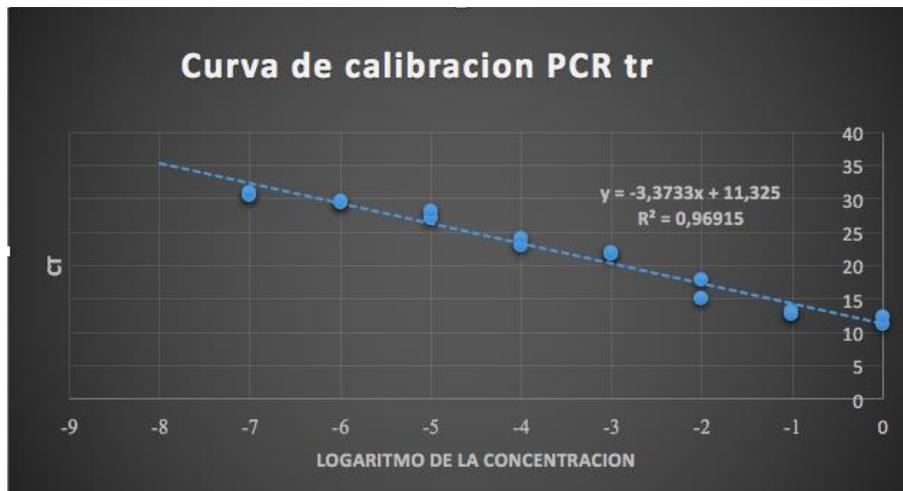


Figura 14: Curva de calibración PCR tr

Ct vs Logaritmo de la concentración del ADN plasmídico

Se obtuvo una eficiencia del 96%, valor de Coeficiente de correlación (R^2) de 0,96 y una pendiente de -3,373, estos valores proporcionan información sobre el comportamiento de la reacción, una vez obtenidos estos resultados se realizaron los montajes con las muestras clínicas.

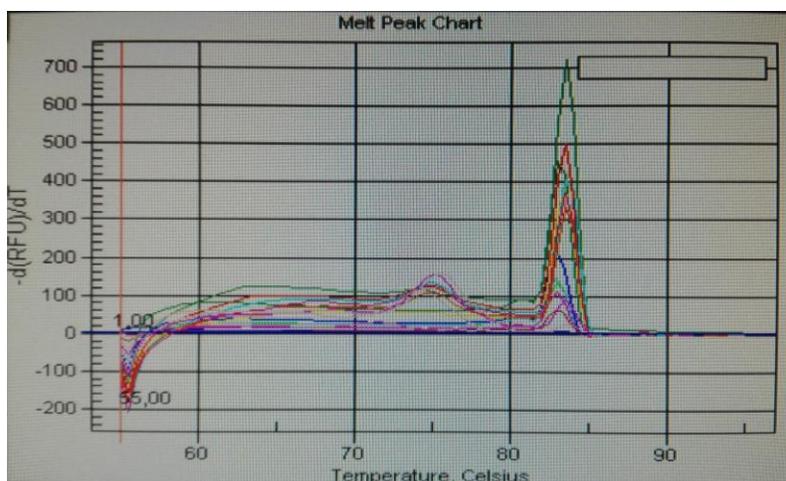


Figura 15: Curva melting PCR tr

Se observa la temperatura de disociación de las cadenas de ADN de *Treponema pallidum subsp pallidum* que corresponde a 82°C.

Tabla 13: Resultados de Ct de la curva de calibración por PCR tr

Muestra	Concentración de ADN ng/uL	Cantidad de ADN en ng	Cantidad de ADN en fg	Valores de Ct
ADN plasmídico puro	22,7	45,4	45.400.000	11,17
ADN plasmídico puro	22,7	45,4	45.400.000	12,22
Dilución 10 ⁻¹	2,27	4,54	4.540.000	13,20
Dilución 10 ⁻¹	2,27	4,54	4.540.000	12,76
Dilución 10 ⁻²	0,227	0,454	454.000	15,03
Dilución 10 ⁻²	0,227	0,454	454.000	17,91
Dilución 10 ⁻³	0,0227	0,0454	45.400	21,68
Dilución 10 ⁻³	0,0227	0,0454	45.400	21,92
Dilución 10 ⁻⁴	0,00227	0,00454	4.540	23,10

Dilución 10 ⁻⁴	0,00227	0,00454	4.540	24,0
Dilución 10 ⁻⁵	0,000227	0,000454	454	27.01
Dilución 10 ⁻⁵	0,000227	0,000454	454	28,05
Dilución 10 ⁻⁶	0,0000227	0,0000454	45,4	29,54
Dilución 10 ⁻⁶	0,0000227	0,0000454	45,4	29,72
Dilución 10 ⁻⁷	0,00000227	0,00000454	4,54	30,51
Dilución 10 ⁻⁷	0,00000227	0,00000454	4,54	30.92
control negativo agua ultra pura	-	-	-	35.33
control negativo agua ultra pura	-	-	-	36,02

16.2 Ensayo de sensibilidad por PCR tr

Se determinó que la sensibilidad de la técnica de PCR tr para detectar la presencia del gen *TpN47* es del orden de los femtogramos. Esta técnica detectó 4,5 fg de ADN recombinante de *Treponema pallidum subsp pallidum*.

16.3 Ensayo de especificidad por PCR tr

La especificidad de los primers *TpN47* en los montajes experimentales fue del 100% ya que no hubo amplificación del ADN de bacterias de importancia clínica tanto Gram positivas como Gram negativas. La especificidad de estos primers también se corroboró con el análisis bioinformático utilizando como plantilla ADN de bacterias filogenética y clínicamente relacionadas.

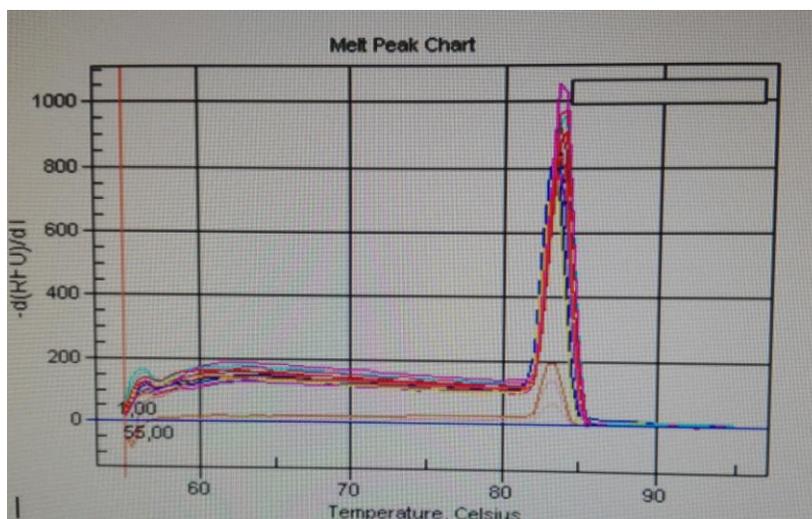


Figura 16: Curva melting del ensayo de especificidad por PCR tr

Se observa la disociación de las cadenas de ADN de *Treponema pallidum subsp pallidum* a una temperatura de 82°C. No se observan picos inespecíficos.

Tabla 14: Resultados de Ct del ensayo de especificidad con PCR tr

Muestras	valor de Ct	Interpretación
Control negativo	N/A	Negativo
Control negativo	N/A	Negativo
Cepa ATCC 12228 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	N/A	Negativo
Cepa ATCC 35984 de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	N/A	Negativo
Cepa USA 2 de <i>Staphylococcus aureus</i>	N/A	Negativo
Cepa 2239 de <i>Staphylococcus aureus</i>	35,03	Negativo
Cepa C478 de <i>Escherichia coli</i>	38,20	Negativo
Cepa 2260 de <i>Klebsiella spp</i>	N/A	Negativo
Control positivo	24,62	Positivo
Control positivo	22,27	Positivo

16.3.1 Análisis bioinformático de los primers *TpN47*

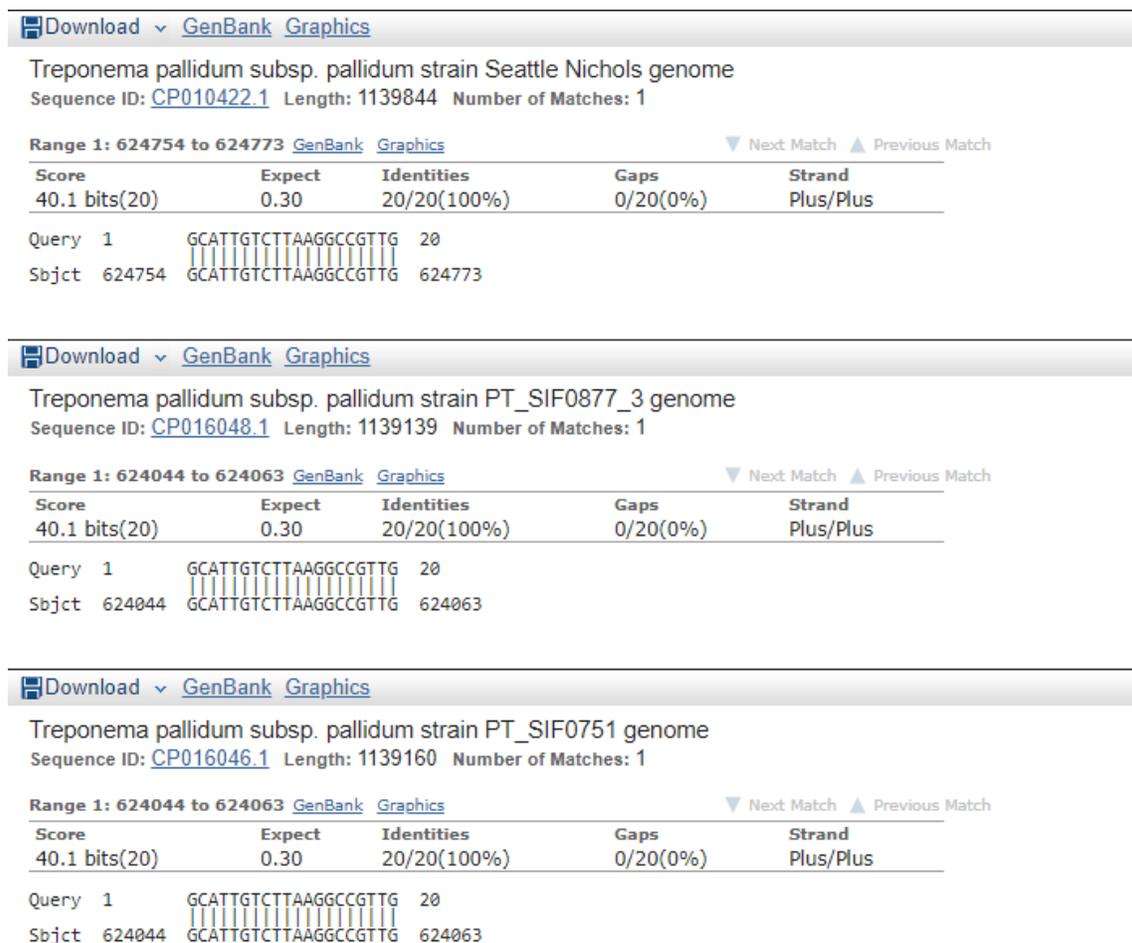


Figura 17: Análisis bioinformático del Primer Forward *TpN47*

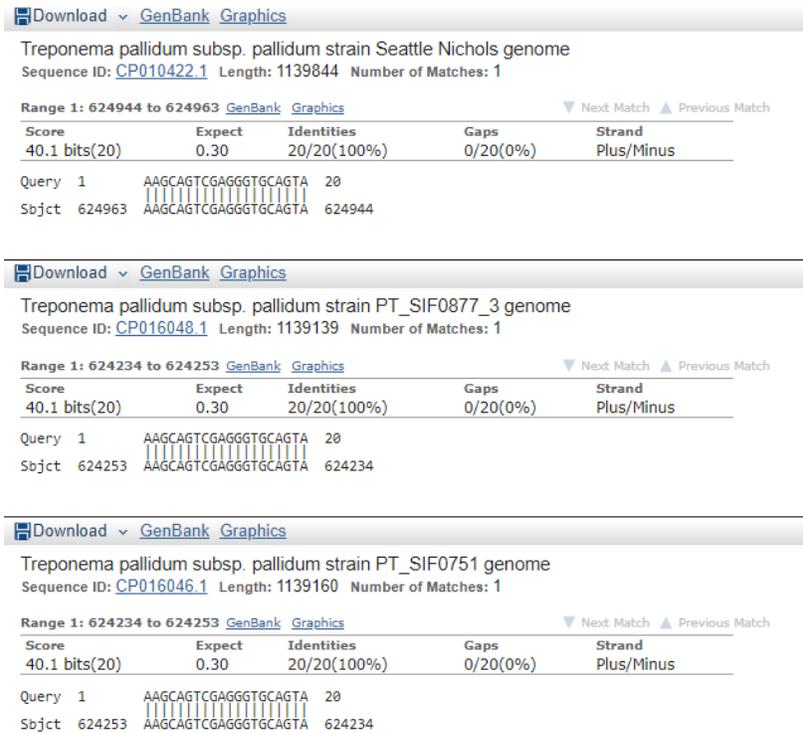


Figura 18: Análisis bioinformático del Primer Reverse TpN47

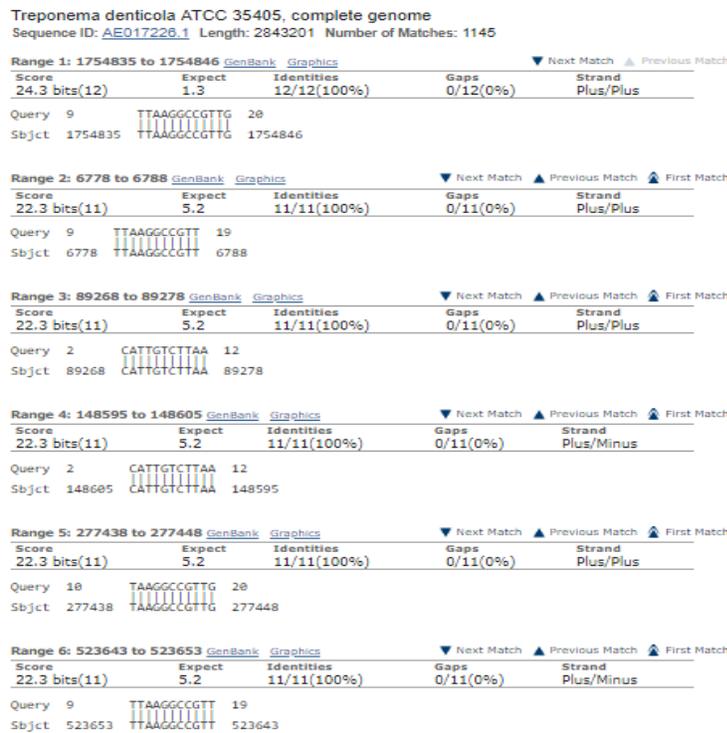


Figura 19: Análisis bioinformático de primers TpN47 con plantilla de ADN de Treponema denticola

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
22.3 bits(11)	9.7	11/11(100%)	0/11(0%)	Plus/Plus
Query 8	CTTAAGGCCGT	18		
Sbjct 519823	CTTAAGGCCGT	519833		

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
20.3 bits(10)	38	10/10(100%)	0/10(0%)	Plus/Plus
Query 7	TCTTAAGGCC	16		
Sbjct 276968	TCTTAAGGCC	276977		

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
20.3 bits(10)	38	10/10(100%)	0/10(0%)	Plus/Plus
Query 9	TTAAGGCCGT	18		
Sbjct 337096	TTAAGGCCGT	337105		

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
20.3 bits(10)	38	10/10(100%)	0/10(0%)	Plus/Plus
Query 1	GCATTGTCTT	10		
Sbjct 666068	GCATTGTCTT	666077		

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
20.3 bits(10)	38	10/10(100%)	0/10(0%)	Plus/Minus
Query 2	CATTGTCTTA	11		
Sbjct 802006	CATTGTCTTA	801997		

Figura 20: Análisis bioinformático de primers TpN47 con plantilla de ADN de *Treponema pallidum* subsp *pertenue*

Borrelia burgdorferi strain CS1 DbpA (dbpA) gene, partial cds
 Sequence ID: [DQ437429.1](#) Length: 567 Number of Matches: 1
[▶ See 2 more title\(s\)](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
22.3 bits(11)	54	11/11(100%)	0/11(0%)	Plus/Minus
Query 10	AGGGTGCAGTA	20		
Sbjct 518	AGGGTGCAGTA	508		

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Borrelia burgdorferi strain 132a DbpA (dbpA) gene, partial cds
 Sequence ID: [DQ437411.1](#) Length: 573 Number of Matches: 1
[▶ See 10 more title\(s\)](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
22.3 bits(11)	54	11/11(100%)	0/11(0%)	Plus/Minus
Query 10	AGGGTGCAGTA	20		
Sbjct 524	AGGGTGCAGTA	514		

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Borrelia burgdorferi strain IA decorin-binding protein A (dbpA) gene, complete cds
 Sequence ID: [AF441834.1](#) Length: 576 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
22.3 bits(11)	54	11/11(100%)	0/11(0%)	Plus/Minus
Query 10	AGGGTGCAGTA	20		
Sbjct 524	AGGGTGCAGTA	514		

Figura 21: Análisis bioinformático de primers TpN47 con plantilla de ADN de *Borrelia burgdorferi*

Neisseria gonorrhoeae strain FDAARGOS_205 chromosome, complete genome
 Sequence ID: [CP020418.2](#) Length: 2232444 Number of Matches: 25

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
24.3 bits(12)	22	12/12(100%)	0/12(0%)	Plus/Plus
▼ Next Match ▲ Previous Match				
Query 8	CGAGGGTGCAGT 19			
Sbjct 1462765	CGAGGGTGCAGT 1462776			
Range 2: 1785928 to 1785939 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
24.3 bits(12)	22	12/12(100%)	0/12(0%)	Plus/Minus
▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match				
Query 1	AAGCAGTCGAGG 12			
Sbjct 1785939	AAGCAGTCGAGG 1785928			
Range 3: 974386 to 974400 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
22.3 bits(11)	85	14/15(93%)	0/15(0%)	Plus/Plus
▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match				
Query 6	GTCGAGGGTGCCAGTA 28			
Sbjct 974386	GTCGAGGGTGCCAGTA 974400			
Range 4: 1389901 to 1389911 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
22.3 bits(11)	85	11/11(100%)	0/11(0%)	Plus/Plus
▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match				
Query 10	AGGGTGCCAGTA 28			
Sbjct 1389901	AGGGTGCCAGTA 1389911			
Range 5: 131518 to 131527 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
20.3 bits(10)	336	10/10(100%)	0/10(0%)	Plus/Minus
▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match				
Query 1	AAGCAGTCGA 18			
Sbjct 131527	AAGCAGTCGA 131518			
Range 6: 139609 to 139618 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
20.3 bits(10)	336	10/10(100%)	0/10(0%)	Plus/Minus
▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match				
Query 9	GAGGGTGCAG 18			
Sbjct 139618	GAGGGTGCAG 139609			

Figura 22: Análisis bioinformático de primers TpN47 con plantilla de ADN de Neisseria gonorrhoeae

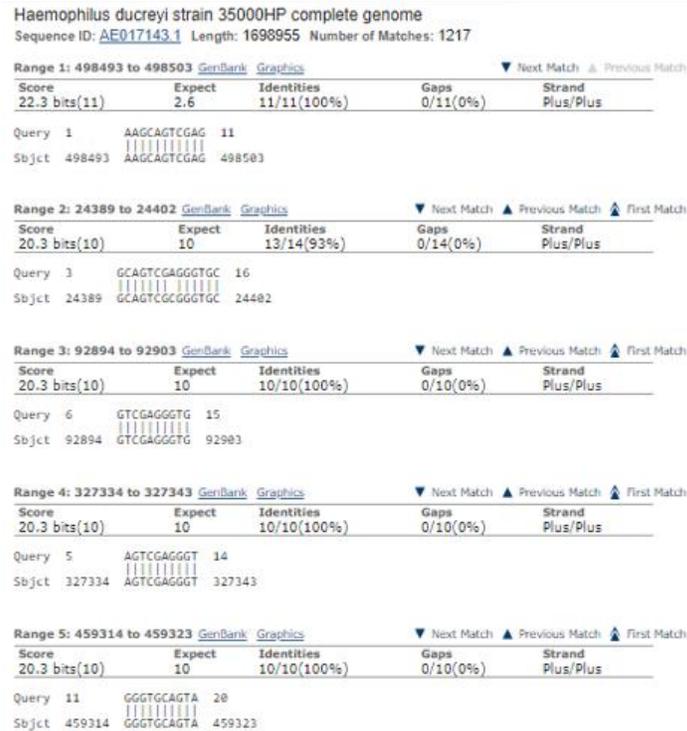


Figura 23: Análisis bioinformático de primers TpN47 con plantilla de ADN de Haemophilus ducreyi

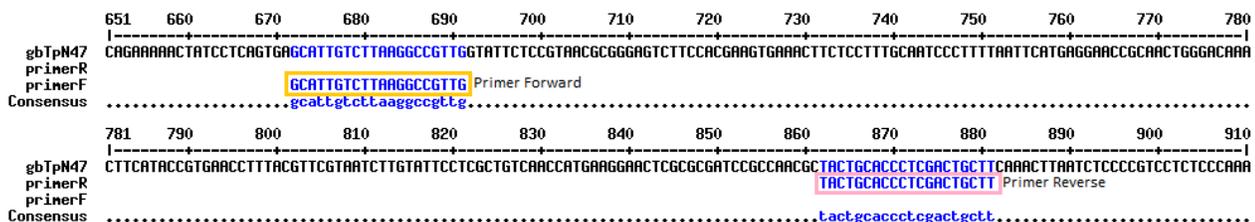


Figura 24: Alineamiento de los primers TpN47 en la secuencia del gen TpN47 de Treponema pallidum subsp pallidum

16.4 Controles negativos en PCR tr

Todas las muestras procesadas consideradas negativas, sin sospecha clínica de sífilis y con valores de VDRL no reactivas, arrojaron valores de Ct por encima de 32, los cuales son interpretados como negativos.

16.5 Control interno de amplificación en PCR tr

Se logró la amplificación de todas las muestras infectadas en el laboratorio usando como blanco el gen *TpN47*. Cabe resaltar que las muestras infectadas en el laboratorio

usadas en este ensayo, corresponden a muestras que inicialmente arrojaron resultados negativos con la técnica de PCR tr (muestra 001, 004,006 y 012).

Las muestras 001, 004, 006 y 012 fueron infectadas con 2 uL de ADN de *Treponema pallidum subsp pallidum*

Tabla 15: Resultados de Ct de las muestras usadas como control de amplificación en PCR tr

Muestra	Valor de Ct
Control negativo agua ultrapura	N/A
Control negativo agua ultrapura	N/A
Muestra no reactivas para VDRL	N/A
Muestra no reactivas para VDRL	N/A
Muestra no reactivas para VDRL	N/A
Muestra 001 infectada en el laboratorio	13,07
Muestra 004 infectada en el laboratorio	13,60
Muestra 006 infectada en el laboratorio	12,89
Muestra 012 infectada en el laboratorio	12,70
Control positivo	21,09
Control positivo	21,80

17. PCR en Tiempo Real con Sonda Taqman (PCR tr Taqman)

17.1 Curva de Calibración PCR tr Taqman

9 diluciones seriadas de ADN plasmídico con una concentración y cantidad inicial de 22.7 ng/ul y 113,5 ng respectivamente, esta curva se realizó con el objetivo de conocer mediante regresión lineal la cantidad inicial de ADN de las muestras experimentales.

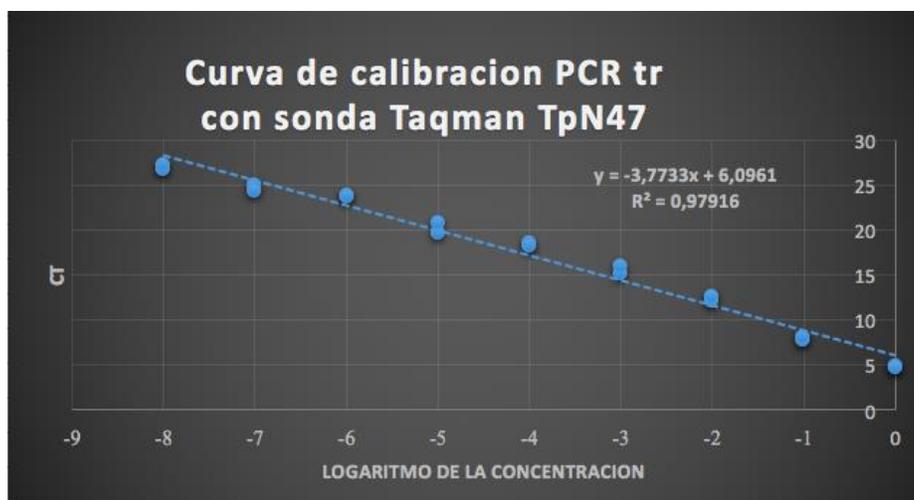


Figura 25: Curva de calibración PCR tr Taqman 47 REMA

Ct vs Logaritmo de la concentración de ADN plasmídico

Se obtuvo una eficiencia del 96% y un valor de Coeficiente de correlación (R2) de 0.97 y una pendiente de -3,7733; estos valores proporcionan información sobre el comportamiento de la reacción, una vez obtenidos estos resultados se realizaron los montajes con las muestras clínicas.

Tabla 16: Resultados de Ct de la curva de calibración en PCR tr Taqman

Muestra	Concentración de ADN ng/ul	Cantidad de ADN en ng	Cantidad de ADN en fg	valores de Ct
ADN plasmídico puro	22,7	113,5	113.500.000	4,88
ADN plasmídico puro	22,7	113,5	113.500.000	4,70
Dilución 10 ⁻¹	2,27	11,35	11.350.000	7,86
Dilución 10 ⁻¹	2,27	11,35	11.350.000	8,14
Dilución 10 ⁻²	0,227	1,135	1.135.000	12,15
Dilución 10 ⁻²	0,227	1,135	1.135.000	12,56
Dilución 10 ⁻³	0,0227	0,1135	113.500	15,12

Dilución 10 ⁻³	0,0227	0,1135	113.500	15,98
Dilución 10 ⁻⁴	0,00227	0,01135	11.350	18,53
Dilución 10 ⁻⁴	0,00227	0,01135	11.350	18,19
Dilución 10 ⁻⁵	0,000227	0,001135	1.135	19,60
Dilución 10 ⁻⁵	0,000227	0,001135	1.135	20,77
Dilución 10 ⁻⁶	0,0000227	0,0001135	113,5	23,79
Dilución 10 ⁻⁶	0,0000227	0,0001135	113,5	23,72
Dilución 10 ⁻⁷	0,00000227	0,00001135	11,35	25,03
Dilución 10 ⁻⁷	0,00000227	0,00001135	11,35	24,40
Dilución 10 ⁻⁸	0,000000227	0,000001135	1,135	26,69
Dilución 10 ⁻⁸	0,000000227	0,000001135	1,135	27,30
control negativo agua ultra pura	-			30,55
control negativo agua ultra pura	-			31,65

17.2 Ensayo de sensibilidad PCR tr-Taqman

Se determinó que la sensibilidad de la técnica de PCR tr con la utilización de la sonda Taqman 47 REMA para detectar la presencia del gen *TpN47* alcanza el orden de los femtogramos, el límite de detección de esta técnica fue 1,135 fg de ADN recombinante de *Treponema pallidum subsp pallidum*.

17.3 Ensayo de Especificidad PCR Taqman

La especificidad de los primers alcanzada en los montajes experimentales con la técnica de PCR tr-Taqman es del 100%, ya que no se observa amplificación con ADN de bacterias de importancia clínica tanto Gram positivas como Gram negativas utilizadas en el ensayo. La especificidad también fue corroborada mediante análisis

bioinformático, utilizando plantillas de ADN de bacterias filogenética y clínicamente relacionadas.

Tabla 17: Resultados de Ct del ensayo de especificidad en PCR tr Taqman

Muestras	valor de Ct	Interpretación
Control negativo	N/A	Negativo
Control negativo	N/A	Negativo
Cepa ATCC 12228 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	N/A	Negativo
Cepa ATCC 35984 de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	N/A	Negativo
Cepa USA 2 de <i>Staphylococcus aureus</i>	N/A	Negativo
Cepa 2239 de <i>Staphylococcus aureus</i>	N/A	Negativo
Cepa C478 de <i>Escherichia coli</i>	N/A	Negativo
Cepa 2260 de <i>Klebsiella spp</i>	N/A	Negativo
Control positivo	16,02	Positivo
Control positivo	15,42	Positivo

17.3.1 Análisis bioinformático de la sonda Taqman 47 REMA

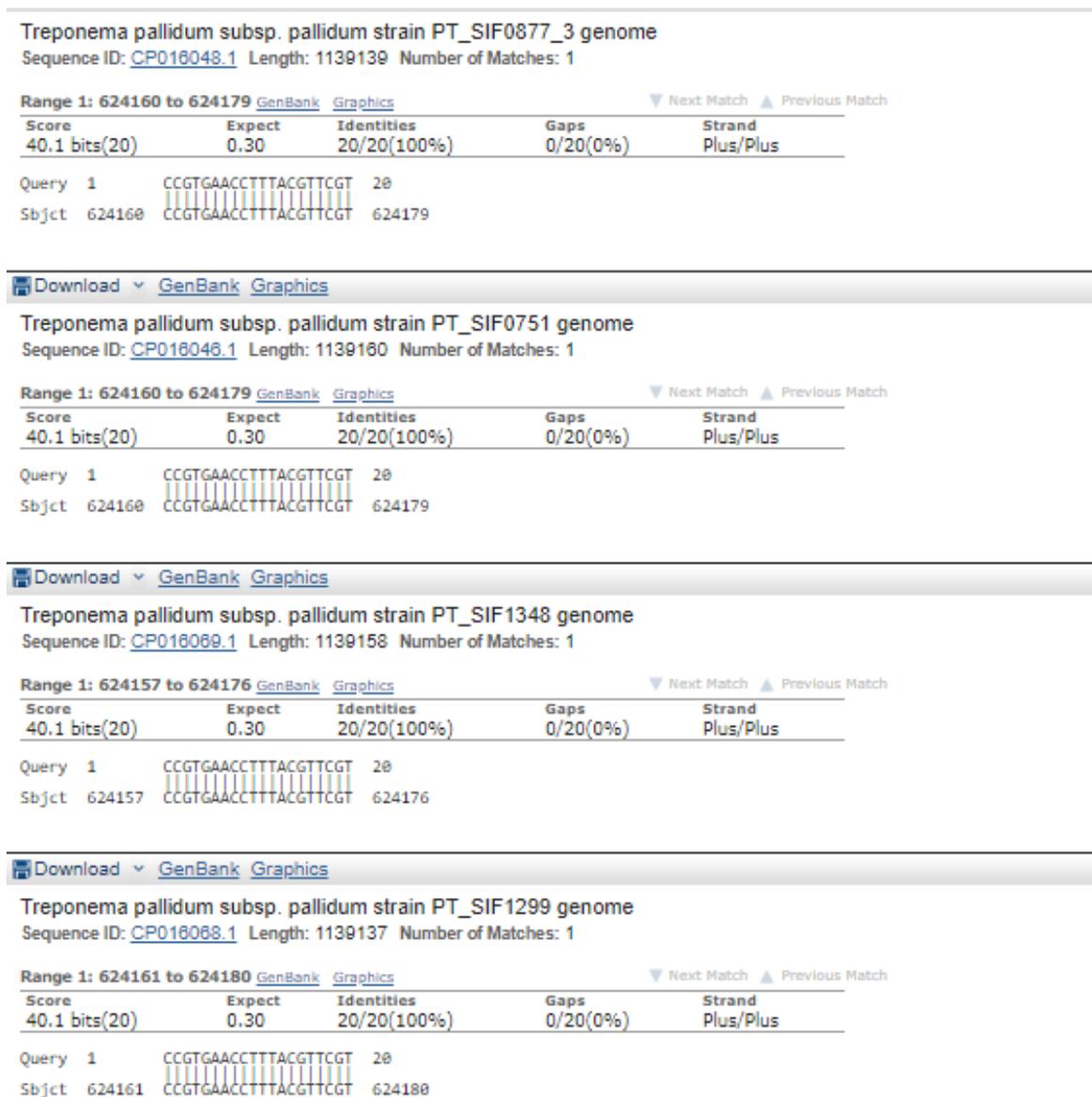


Figura 26: Análisis bioinformático de la Sonda Taqman 47 REMA

Treponema denticola ATCC 35405, complete genome
Sequence ID: [AE017228.1](#) Length: 2843201 Number of Matches: 920

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
28.2 bits(14)	0.084	14/14(100%)	0/14(0%)	Plus/Plus

Range 1: 1652749 to 1652762 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼](#) Next Match [▲](#) Previous Match

Query 1 CCGTGAACCTTTAC 14
Sbjct 1652749 CCGTGAACCTTTAC 1652762

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
24.3 bits(12)	1.3	12/12(100%)	0/12(0%)	Plus/Plus

Range 2: 438235 to 438246 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼](#) Next Match [▲](#) Previous Match [▲](#) First Match

Query 6 AACCTTTACGTT 17
Sbjct 438235 AACCTTTACGTT 438246

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
22.3 bits(11)	5.2	11/11(100%)	0/11(0%)	Plus/Plus

Range 3: 614250 to 614260 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼](#) Next Match [▲](#) Previous Match [▲](#) First Match

Query 1 CCGTGAACCTT 11
Sbjct 614250 CCGTGAACCTT 614260

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
22.3 bits(11)	5.2	11/11(100%)	0/11(0%)	Plus/Plus

Range 4: 1167298 to 1167308 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼](#) Next Match [▲](#) Previous Match [▲](#) First Match

Query 4 TGAACCTTTAC 14
Sbjct 1167298 TGAACCTTTAC 1167308

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
22.3 bits(11)	5.2	11/11(100%)	0/11(0%)	Plus/Plus

Range 5: 1223861 to 1223871 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼](#) Next Match [▲](#) Previous Match [▲](#) First Match

Query 1 CCGTGAACCTT 11
Sbjct 1223861 CCGTGAACCTT 1223871

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
22.3 bits(11)	5.2	11/11(100%)	0/11(0%)	Plus/Plus

Range 6: 1419977 to 1419987 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼](#) Next Match [▲](#) Previous Match [▲](#) First Match

Query 3 GTGAACCTTTA 13
Sbjct 1419977 GTGAACCTTTA 1419987

Figura 27: Análisis bioinformático de la sonda Taqman 47 REMA con plantilla de ADN de *Treponema denticola*

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
22.3 bits(11)	2.0	11/11(100%)	0/11(0%)	Plus/Plus

Range 3: 85698 to 85708 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼](#) Next Match [▲](#) Previous Match [▲](#) First Match

Query 2 CGTGAACCTTT 12
Sbjct 85698 CGTGAACCTTT 85708

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
22.3 bits(11)	2.0	11/11(100%)	0/11(0%)	Plus/Plus

Range 4: 235139 to 235149 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼](#) Next Match [▲](#) Previous Match [▲](#) First Match

Query 1 CCGTGAACCTT 11
Sbjct 235139 CCGTGAACCTT 235149

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
22.3 bits(11)	2.0	11/11(100%)	0/11(0%)	Plus/Plus

Range 5: 283533 to 283543 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼](#) Next Match [▲](#) Previous Match [▲](#) First Match

Query 1 CCGTGAACCTT 11
Sbjct 283533 CCGTGAACCTT 283543

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
22.3 bits(11)	2.0	11/11(100%)	0/11(0%)	Plus/Plus

Range 6: 1056080 to 1056090 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼](#) Next Match [▲](#) Previous Match [▲](#) First Match

Query 9 CTTTACGTTCCG 19
Sbjct 1056080 CTTTACGTTCCG 1056090

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
22.3 bits(11)	2.0	14/15(93%)	0/15(0%)	Plus/Minus

Range 7: 216176 to 216190 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼](#) Next Match [▲](#) Previous Match [▲](#) First Match

Query 6 AACCTTTACGTCGT 20
Sbjct 216190 AACCTTTACGTCGT 216176

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
22.3 bits(11)	2.0	11/11(100%)	0/11(0%)	Plus/Minus

Range 8: 413097 to 413107 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼](#) Next Match [▲](#) Previous Match [▲](#) First Match

Query 2 CCGTGAACCTTT 12
Sbjct 413097 CCGTGAACCTTT 413097

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
22.3 bits(11)	2.0	11/11(100%)	0/11(0%)	Plus/Minus

Range 9: 741263 to 741273 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼](#) Next Match [▲](#) Previous Match [▲](#) First Match

Figura 28: Análisis bioinformático de la sonda Taqman 47 REMA con plantilla de ADN de *Treponema pallidum* subsp *pertenue*

Borrelia burgdorferi 297 23S ribosomal RNA (rrfB), 5S ribosomal RNA (rrfB), 23S ribosomal RNA (rrfA), and 5S ribosomal RNA (rrfA) genes, complete sequence
 Sequence ID: [JX584836.1](#) Length: 6361 Number of Matches: 2

Range 1: 2146 to 2159 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
28.2 bits(14)	0.85	14/14(100%)	0/14(0%)	Plus/Plus

Query 1 CCGTGAACCTTTAC 14
 Sbjct 2146 CCGTGAACCTTTAC 2159

Range 2: 5391 to 5404 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [▲ First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
28.2 bits(14)	0.85	14/14(100%)	0/14(0%)	Plus/Plus

Query 1 CCGTGAACCTTTAC 14
 Sbjct 5391 CCGTGAACCTTTAC 5484

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

B. burgdorferi 23S rRNA, 5S rRNA and 23S rRNA genes
 Sequence ID: [X85745.1](#) Length: 2093 Number of Matches: 1

Range 1: 886 to 899 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
28.2 bits(14)	0.85	14/14(100%)	0/14(0%)	Plus/Plus

Query 1 CCGTGAACCTTTAC 14
 Sbjct 886 CCGTGAACCTTTAC 899

Figura 29: Análisis bioinformático de la sonda Taqman 47 REMA con plantilla de ADN de *Borrelia burgdorferi*

Neisseria gonorrhoeae strain FDAARGOS_207 chromosome, complete genome
 Sequence ID: [CP020419.2](#) Length: 2189300 Number of Matches: 24

Range 1: 296213 to 296226 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
28.2 bits(14)	1.3	14/14(100%)	0/14(0%)	Plus/Plus

Query 1 CCGTGAACCTTTAC 14
 Sbjct 296213 CCGTGAACCTTTAC 296226

Range 2: 518755 to 518768 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [▲ First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
28.2 bits(14)	1.3	14/14(100%)	0/14(0%)	Plus/Plus

Query 1 CCGTGAACCTTTAC 14
 Sbjct 518755 CCGTGAACCTTTAC 518768

Range 3: 683578 to 683591 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [▲ First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
28.2 bits(14)	1.3	14/14(100%)	0/14(0%)	Plus/Plus

Query 1 CCGTGAACCTTTAC 14
 Sbjct 683578 CCGTGAACCTTTAC 683591

Range 4: 1054561 to 1054574 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [▲ First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
28.2 bits(14)	1.3	14/14(100%)	0/14(0%)	Plus/Plus

Query 1 CCGTGAACCTTTAC 14
 Sbjct 1054561 CCGTGAACCTTTAC 1054574

Range 5: 1117112 to 1117122 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [▲ First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
22.3 bits(11)	83	11/11(100%)	0/11(0%)	Plus/Plus

Query 3 GTGAACCTTTA 13
 Sbjct 1117112 GTGAACCTTTA 1117122

Range 6: 374165 to 374175 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [▲ First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
22.3 bits(11)	83	11/11(100%)	0/11(0%)	Plus/Minus

Query 5 GAACCTTTACG 15
 Sbjct 374175 GAACCTTTACG 374165

Figura 30: Análisis bioinformático de la sonda Taqman 47 REMA con plantilla de ADN de *Neisseria gonorrhoeae*

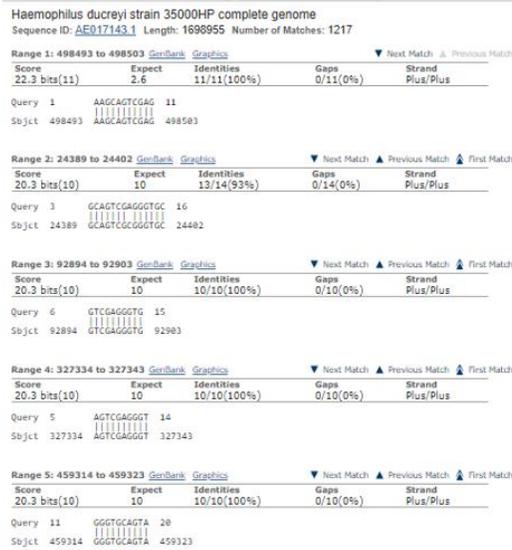


Figura 31: Análisis bioinformático de la sonda Taqman 47 REMA con plantilla de ADN de Haemophilus ducreyi

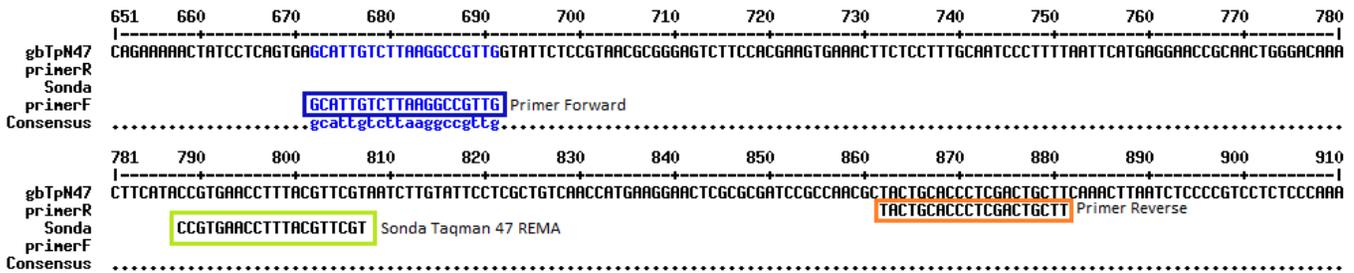


Figura 32: Alineamiento de los primers TpN47 y sonda Taqman 47 REMA en la secuencia del gen TpN47

17.4 Control Negativo en PCR tr-Taqman

Todas las muestras procesadas consideradas negativas, sin sospecha clínica de sífilis y con valores de VDRL no reactivas, arrojaron valores de Ct por encima de 30, las cuales son interpretados como negativos.

17.5 Control de amplificación en PCR tr-Taqman

Se logró la amplificación de todas las muestras infectadas en el laboratorio usando como blanco el gen *TpN47*. Las muestras infectadas en el laboratorio usadas en este

ensayo, corresponden a muestras que inicialmente arrojaron resultados negativos con la técnica de PCR en tiempo real con sonda Taqman (muestra 001, 003a, 014 y 018). Las muestras 001, 003^a, 014 y 018 fueron infectadas con 2 uL de ADN de *Treponema pallidum subsp pallidum*

Tabla 18: Resultados de Ct de las muestras usadas como control de amplificación en la PCR tr Taqman 47 REMA

Muestra	Valor de Ct
Control negativo agua ultrapura	N/A
Control negativo agua ultrapura	N/A
Muestra no reactivas para VDRL	N/A
Muestra no reactivas para VDRL	N/A
Muestra no reactivas para VDRL	N/A
Muestra 001 infectada en el laboratorio	11,92
Muestra 003a infectada en el laboratorio	10,49
Muestra 014 infectada en el laboratorio	9,92
Muestra 018 infectada en el laboratorio	10,23
Control positivo	10,46
Control positivo	12,27

18. Valores de Ct

Para PCR tr los valores de Ct considerados como positivos son los valores que se encuentran por debajo de 32 y para la PCR tr-Taqman son aquellas muestras con valores de Ct menores a 30, esto es debido a la mayor sensibilidad y especificidad lograda con la sonda de hidrolisis.

Tabla 19: Comparación de la sensibilidad entre las variantes de PCR

PCR Convencional	PCR en tiempo Real sin sonda	PCR en tiempo real con sonda
4540 fg	4,5 fg	1,135 fg

Tabla 20: Comparación de especificidad entre las variantes de PCR

PCR en tiempo Real sin sonda	PCR en tiempo real con sonda
100%	100%

19. Muestras Clínicas

Tabla 21: Número y porcentaje de muestras positivas por técnica

	PCR en Tiempo Real (PCR tr)	PCR en Tiempo Real con Sonda 47 Rema (PCR tr Taqman)
Número de muestras positivas	13 /27*	22 /27*
Porcentaje	48,14 %	81,48 %

*Número de muestras procesadas

Se observa un aumento significativo de la sensibilidad de la técnica de PCR tr con el uso de la sonda, ya que del 100 % de las muestras procesadas, solo el 48,14 % fueron positivas por PCR tr sin sonda, y con el uso de esta, este valor aumenta a un 81,48 %, una diferencia de 33,34%.

Tabla 22: Comparación de resultados positivos según el tipo de muestra y la técnica empleada

Descripción de las muestras	Cantidad de muestras	Técnica	
		Muestras positivas por PCR en Tiempo Real	Muestras positivas por PCR en Tiempo Real con Sonda
Sangre total periférica de mamá	4	4/4*	4/4*
Suero de	5	3/5*	3/5*

	mama			
	Sangre total periférica de neonatos	1	0/1*	0/1*
	Suero de neonatos	4	1/4*	4/4*
	Sangre de Cordón umbilical	2	0/2*	1/2*
	Líquido cefalorraquídeo	11	5/11*	10/11*
total muestras		27	13/27*	22/27*

*Número de muestras procesadas por tipo de muestra

Tabla 23: Comparación porcentual de resultados positivos según la técnica utilizada y el tipo de muestra

Descripción de las muestras		Cantidad de muestras	Técnica			
			Muestras positivas por PCR en tiempo Real		Muestras positivas por PCR en tiempo Real con Sonda	
			Cantidad	% según tipo de muestra	Cantidad	% según tipo de muestra
Tipos de muestra	Sangre periférica de mamá	4	4	100	4	100
	Suero de mamá	5	3	60	3	60
	Sangre periférica de neonato	1	0	0	0	0

Tipos de muestra	Suero de neonato	4	1	25	4	100
	Sangre de Cordón Umbilical	2	0	0	1	50
	Líquido cefalorraquídeo	11	5	45,45	10	90,9
	Total de muestras analizadas	27	13	48,14	22	81,48

Se pudo evidenciar que, de la totalidad de muestras de sangre periférica de mamá procesadas, todas arrojaron resultados positivos con las dos técnicas; del 100% de las muestras de suero de mamá solo el 60 % arrojaron resultados positivos para cada una de las técnicas, la muestra procesada de sangre periférica de neonato, arrojó resultados negativos para ambas variantes. Del 100% de las muestras de suero de neonatos solo el 25% evidenció resultados positivos por PCR tr, en contraste con un valor del 100% de muestras positivas para la PCR tr-Taqman, este mismo comportamiento se pudo observar en las muestras de sangre de cordón umbilical y muestras de LCR donde los porcentajes aumentaron de 0 a 50% y de 45,45 a 90,9% respectivamente, con lo cual se puede corroborar el aumento de la sensibilidad de esta técnica adicionado el uso de la sonda taqman.

Tabla 24: Interpretación cualitativa y cuantitativa de resultados por PCR tr y PCR tr Taqman

		PCR en tiempo Real			PCR en Tiempo Real con Sonda		
		Valor de Ct	Interpretación	Concentración aproximada de ADN bacteriano en fg/ul	Valor de Ct	Interpretación	Concentración aproximada de ADN bacteriano en fg/ul
Código de las muestras	Muestra 1	32,19	Negativo	-	N/A	Negativo	-
	Muestra 2	28,05	Positiva	227	18,40	Positiva	2.270
	Muestra 3	30,55	Positiva	2,27	10,60	Positiva	227.000
	Muestra 3a	N/A	Negativo	-	36,77	Negativo	-
	Muestra 4	N/A	Negativo	-	13,00	Positiva	227.000
	Muestra 5	N/A	Negativo	-	17,00	Positiva	2.270
	Muestra 6	N/A	Negativo	-	25,00	Positiva	2,27
	Muestra 7	30,47	Positiva	2,27	10,11	Positiva	227.000
	Muestra 8	30,07	Positiva	2,27	25,32	Positiva	2,27
	Muestra 9	9,04	Positiva	$2,27 \times 10^7$	14,09	Positiva	22.700
	Muestra 10	28,33	Positiva	227	14,59	Positiva	22.700
Muestra 11	29,13	Positiva	22,7	12,11	Positiva	227000	

Muestra 12	N/A	Negativo	-	12,17	Positiva	227.0000
Muestra 13	30,14	Positiva	2,27	21,12	Positiva	227
Muestra 14	N/A	Negativo	-	N/A	Negativo	-
Muestra 15	N/A	Negativo	-	12,94	Positiva	227.000
Muestra 16	N/A	Negativo	-	14,03	Positiva	22.700
Muestra 17	N/A	Negativo	-	15,02	Positiva	22.700
Muestra 18	N/A	Negativo	-	N/A	Negativo	-
Muestra 19	33,00	Negativo	-	13,14	Positiva	227.000
Muestra 20	28,20	Positiva	227	14,29	Positiva	22.700
Muestra 21	31,09	Positiva	2,27	12,17	Positiva	227.000
Muestra 22	30,07	Positiva	2,27	17,29	Positiva	2.270
Muestra 23	32,46	Negativo	-	12,13	Positiva	227.000
Muestra 24	27,53	Positiva	227	12,52	Positiva	227.000
Muestra 25	29,13	Positiva	22,7	12,34	Positiva	227.000
Muestra 27	N/A	Negativo	-	N/A	Negativo	-

Se puede analizar que aunque la sensibilidad alcanzada en las dos técnicas es muy similar (2,27 fg/ul en comparación con 0,27 fg/ul), la totalidad de muestras positivas por

PCR tr-Taqman, supera significativamente los resultados positivos de la misma técnica sin el uso de la sonda, el hecho de que del 100% de las muestras procesadas, sin discriminar su origen pase de 48,14% a 81,48% con el uso de la sonda, indicaría que se puede minimizar el margen de error al disminuir la tasa de resultados falsos negativos, lo cual favorece el diagnóstico oportuno especialmente en los neonatos que carecen de signos y síntomas patognomónicos de esta enfermedad.

DISCUSIÓN

La sífilis es una enfermedad crónica perteneciente al grupo de las infecciones de transmisión sexual, causada por la espiroqueta *Treponema pallidum subsp pallidum*, que puede transmitirse de madre a hijo dando lugar a la sífilis congénita; esta última, es considerada un problema de salud pública que persiste debido a factores tales como: limitaciones en el acceso a los servicios de salud o acceso tardío, falencias en cuanto a la capacitación del personal de salud, dificultades en el diagnóstico oportuno, deficiencias en la administración y seguimiento del tratamiento y discriminación asociada a las ITS(4).

Debido a las fallas existentes en el diagnóstico oportuno de esta patología, los casos de morbilidad neonatal han aumentado considerablemente, demostrando así la necesidad de desarrollar e implementar nuevas estrategias diagnósticas con el uso de técnicas moleculares que mejoren la calidad y confiabilidad de los resultados, y así poder brindar un tratamiento eficiente. Es así, como diversas variantes de PCR han sido utilizadas en el diagnóstico de sífilis, dirigidas a diferentes dianas moleculares tales como el gen *Tpf-1*, *16S ADNr*, *polA*, *tpp47*, *bmp*, *TmpA*, *tmpB* y *TpN47*(10).

En el presente estudio se evaluó la presencia del gen *TpN47* por medio de la PCR tr con primers específicos para el gen que codifica la lipoproteína de membrana e inmunógeno dominante de 47 KDa (*TpN47*) y PCR tr adicionando el uso de la sonda taqman 47 REMA (PCR tr-Taqman) con el objetivo de comparar los resultados de estas técnicas moleculares.

Estudios previos del grupo de investigación REMA, (16)(17) evaluaron la reacción en cadena de la polimerasa convencional, anidada y en tiempo real, dirigidas a diferentes dianas moleculares. Para el gen *polA* y *16S ADNr* lograron una sensibilidad del 70% mediante PCR de punto final y para el gen *TpN47* la sensibilidad alcanzada por nPCR y PCR tr fue del 100 y 90% respectivamente, en el mismo estudio se alcanzó

especificidades que oscilan entre 70 y 100%. Por lo tanto, la presente investigación pretendió superar estos niveles alcanzados. Mediante PCR convencional dirigida al gen *TpN47* se logró superar la sensibilidad alcanzada por Pinilla y colaboradores, (52 pg) (17) ya que se obtuvo una sensibilidad de 4,5 pg.

Por otra parte, Burstain y col. (12) lograron una sensibilidad de aproximadamente 0,01 pg de ADN purificado de *Treponema pallidum subsp pallidum*, utilizando dos métodos combinados, PCR y southern blot: el primero, dirigido a una porción de 658 pares de bases del gen *tpp47* y el segundo dirigido a un fragmento de 496 pares de bases interno del ADN amplificado. Esta mejora puede deberse al uso de ADN purificado, al tamaño del producto de amplificación y a la combinación de los dos métodos. además, se minimizó los falsos negativos resultantes de la variación de las secuencias del gen *tpp47*.

Usando la técnica de PCR, Palmer y colaboradores (61) reportaron un límite de detección de 1 pg de ADN purificado de *Treponema pallidum subsp pallidum* que representa aproximadamente 800 copias del genoma, utilizando como blanco el gen que codifica para la lipoproteína de membrana integral de 47 KDa. En el presente trabajo haciendo uso de la PCR tr dirigida al gen *TpN47*, este límite de detección fue superado llegando a 0,0045 pg ó 4,5 fg lo que indica que con PCR tr se detectó aproximadamente 3,6 copias del genoma; estos resultados se correlacionan con los publicados por Gama en cuyo estudio, utilizando el gen *polA* por PCR tr llegaron a detectar 2,3 copias del genoma, pero usando sonda taqman;(10) por otra parte, mediante la técnica de nPCR y PCR tr, utilizando el gen *TpN47* se han reportado sensibilidades de 0,032 pg y 10 pg respectivamente de ADN purificado de *Treponema pallidum subsp pallidum* (16).

En cuanto a la PCR tr se han encontrado sensibilidades que varían según el tipo de muestra y el estadio clínico de la sífilis. Para ensayos realizados en muestras de úlceras, Craig Tipple y colaboradores lograron una sensibilidad de 100 % en estadio

primario y secundario de esta patología y especificidad de 97,14%. En cuanto a muestras de sangre total, la sensibilidad lograda fue de 34,1 y 57,89% en sífilis primaria y secundaria respectivamente, con especificidad del 100%; además reportan una sensibilidad del 27,7% en muestra de sangre total con respecto a la serología (65). En cuanto a nuestro trabajo, la sensibilidad global obtenida por PCR tr con respecto a la serología fue superior, alcanzando un 48,14%; sin embargo, con las muestras de sangre total periférica de gestantes se alcanzó una sensibilidad del 100% (muestras 8,9,10 y 11) confirmando los resultados reactivos de las serologías, es decir, en este caso hubo concordancia entre la técnica serológica y la técnica molecular PCR tr. Como era de esperarse no hubo concordancia entre la serología y la PCR tr de la muestra clínica de sangre total periférica de neonato (muestra 27) ya que esta última presentó un VDRL reactivo y PCR tr negativa, lo cual reafirma la baja confiabilidad de las técnicas serológicas en el diagnóstico de la sífilis congénita, ya que el resultado de la serología constituye un falso positivo, explicado por la presencia de anticuerpos maternos presentes en la circulación sanguínea del neonato en el momento de la toma de la muestra.

Una explicación probable al hecho de que la PCR presente un resultado negativo con una serología previa reactiva como se evidencia en el estudio de Graig Tipple y corroborado en la presente investigación; puede deberse a la etapa de la sífilis que este cursando el paciente, a la presencia o no de las espiroquetas en el sitio de muestreo al momento de la toma de la muestra, una sífilis tratada o en el caso de sífilis congénita por la presencia de anticuerpos maternos en circulación neonatal; (66), además, es importante tener en cuenta que las técnicas serológicas como VDRL y RPR, detectan anticuerpos reagínicos y no anticuerpos treponémicos, es decir que estas serologías pueden ser reactivas con otras patologías como sarampión, varicela, hepatitis, mononucleosis infecciosa, lepra, tuberculosis, malaria, enfermedades autoinmunes, drogadicción, embarazo y edad avanzada (67).

La alta sensibilidad alcanzada con las muestras de sangre periférica de gestantes en el presente estudio (100%), supera por mucho los resultados reportados por Craig Tipple; este mismo comportamiento se pudo observar al comparar los resultados de la presente investigación con las sensibilidades obtenidas por Gayet-Ageron en el mismo tipo de muestra que corresponden a 28% y 36% en sífilis primaria y secundaria respectivamente (68).

Comparando las sensibilidades obtenidas en el presente estudio de muestras de sangre periférica materna y sueros de maternas que corresponden a 100 y 60% respectivamente, se puede inferir que estos resultados superan a los obtenidos por Grange,(13) donde utilizando nPCR dirigida al gen *tpp47* para muestras de células mononucleares de sangre periférica, suero y fracciones de sangre completa, alcanzaron sensibilidades de 29, 14,7 y 24% respectivamente. En el caso de las muestras de sueros de neonatos en el presente estudio se alcanzó una sensibilidad de 25%, resultado que se asemeja con la sensibilidad alcanzada para las fracciones de sangre completa en el estudio de Grange, por otra parte, la mejor sensibilidad alcanzada por Grange fue la obtenida en las muestras de hisopados de lesiones mucosas, la cual llegó a 82%, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Hsi Liu donde reportan una sensibilidad del 95,8% en la PCR dirigida al gen *poIA* utilizando este tipo de muestra, lo anterior puede ser atribuido a una mayor carga treponémica en este tipo de lesiones directamente relacionada con el estadio clínico de esta patología (41).

El 16,6% de los LCR de neonatos, hijos de madres sífilíticas analizados por Grimprel y colaboradores obtuvieron resultados positivos para la técnica de PCR dirigida a una porción de 658 pb del gen que codifica para la lipoproteína de 47 KDa, con una sensibilidad del 60% con respecto al RIT (Rabbit Infectivity Test) que es la prueba Gold estándar. (7) Comparando con los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede inferir que utilizando este mismo tipo de muestra se alcanzó una mejor sensibilidad (45,45%), esta mejora se puede explicar sobre la base de una mayor carga

treponémica en estas muestras, lo cual puede ser debido a la falta de tratamiento en las gestantes y en los neonatos. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los publicados por Patricia García y col. (55) cuya sensibilidad fue del 50% en los LCR y también con los reportados por Molepo (24) ya que utilizando 50 muestras de LCR, la mitad fueron positivas, esto se asemeja a los obtenidos en el presente trabajo, ya que de 11 muestras analizadas 5 fueron positivas para PCR tr.

En la actualidad existe una gran variedad de sondas de hibridación las cuales garantizan la especificidad de la detección y mejoran la sensibilidad de la técnica, además permiten identificar polimorfismos o mutaciones puntuales (69). Dentro de las sondas de hibridación la más utilizada en la detección de *Treponema pallidum subsp pallidum* ha sido sonda de hidrolisis taqman.

Kai hua Chi en su publicación, (70) demuestra la ventaja clínica de usar sondas de hidrolisis para mejorar la especificidad y sensibilidad de la técnica diagnóstica de PCR tr; cuando hay patologías cuyo agente etiológico está relacionado filogenéticamente con otros microorganismos y cuyas presentaciones clínicas se confunden. Las interpretaciones de sus resultados muestran que las sondas taqman hibridaron específicamente con la platilla de ADN de la subespecie de *Treponema pallidum* a la cual estaban dirigidas (*Treponema pallidum subsp pallidum*, *Treponema pallidum subsp pertenue*, *Treponema pallidum subsp endemicum*), lo cual corrobora su alta especificidad, permitiendo eliminar falsos positivos por las reacciones cruzadas.

En cuanto a la técnica de PCR en tiempo real adicionando el uso de la sonda taqman se obtuvo una sensibilidad del 81,48% con respecto a la serología VDRL, dato que concuerda con los publicados por David Leslie (66) donde con respecto a la serología muestra una concordancia del 95% y una especificidad del 98,40%; este último dato también es concordante con el obtenido en este trabajo ya que la especificidad alcanzada fue del 100% en las dos variantes de PCR tr; en cuanto al límite de detección en la presente investigación con el uso de la sonda fue de 1,135 fg lo que

representa 0,908 copias del genoma aproximadamente. Estos resultados superan los publicados por Gama y colaboradores donde utilizando PCR tr-Taqman dirigida al gen *poIA*, alcanzaron una sensibilidad del 100% y un límite de detección de 2 copias del genoma. El hecho de que en el presente estudio se haya superado el límite de detección en comparación con los resultados publicados por Gama puede deberse a que el gen *TpN47* según datos bibliográficos ha demostrado mejor sensibilidad que el gen *poIA* y no al tipo de muestra, ya que Gama utilizó biopsia de piel embebidas en parafina las cuales eran positivas para *Treponema pallidum subsp pallidum* por inmunohistoquímica(10).

En un estudio publicado por Heymans y colaboradores (71) donde determinan el valor clínico adicional de la PCR tr-Taqman dirigida al gen *poIA*, para la identificación del *Treponema pallidum subsp pallidum* en el diagnóstico de sífilis utilizando diferentes algoritmos, determinaron una sensibilidad de 87% con respecto a la microscopia de campo oscuro y una especificidad del 93,1%; estos resultados concuerdan con los obtenidos en este trabajo, donde se alcanzó una sensibilidad de 81,48% con respecto a la técnica serológica VDRL y una especificidad del 100%.

Las muestras 1 y 14 que corresponden a sueros de gestantes, la muestra 18 que corresponde a LCR, la muestra 27 que corresponde a sangre total periférica de neonato y la muestra 3^a que corresponde a sangre de cordón umbilical tuvieron resultados negativos por ambas variantes de la PCR usadas en este estudio, aunque presentaron previamente test serológico de VDRL reactivo. La disparidad presentada en los sueros de gestantes puede deberse a que la serología fue practicada durante la gestación o en el puerperio, tiempo en el cual pueden aparecer anticuerpos no treponémico o reagínicos por el mismo estado fisiológico mencionado, o también puede deberse a que la madre este cursando con otras patologías que producen este tipo de anticuerpos como se describió anteriormente.

En el caso de las demás muestras que provienen de neonatos, el resultado positivo de la serología puede ser un falso positivo debido a la transferencia pasiva de anticuerpos maternos.

En el presente estudio las muestras de sangre de cordón umbilical fueron negativas para la PCR tr, este resultado mejoró drásticamente con la PCR tr-Taqman en un 50%; Sin embargo, los estudios han evidenciado que, para las pruebas serológicas en el recién nacido, la muestra de preferencia es la sangre venosa y no la de cordón umbilical ya que esta última comúnmente se puede contaminar con la sangre materna.
(33)

Haciendo un análisis introspectivo se puede determinar que aunque el límite de detección alcanzado en las dos variantes (PCR tr y PCR tr-Taqman) es muy similar (4,5 fg vs 1,135fg), la totalidad de muestras positivas por PCR tr-Taqman, supera significativamente los resultados positivos de la misma técnica sin el uso de ella, el hecho de que del 100% de las muestras procesadas, sin discriminar su tipo ni origen pase de 48,14% a 81,48% con el uso de la sonda, indicaría que se puede minimizar el margen de error al disminuir la tasa de resultados falsos negativos, lo cual favorece el diagnóstico oportuno especialmente en los neonatos que carecen de signos y síntomas patognomónicos de esta enfermedad.

También se pudo evidenciar que, de la totalidad de muestras de sangre periférica de gestante procesadas, todas arrojaron resultados positivos con las dos técnicas; del 100% de las muestras de suero de mamá solo el 60 % arrojó resultados positivos para cada una de las técnicas. La muestra de sangre total periférica de neonato, tuvo resultados negativos para ambas variantes, aunque su test serológico fue reactivo. Del 100% de las muestras de suero de neonatos solo el 25% evidenció resultados positivos por PCR tr, en contraste con un valor del 100% de muestras positivas para esta misma técnica con el uso de la sonda, este mismo comportamiento se pudo observar en las muestras de sangre de cordón umbilical y muestras de LCR donde los

porcentajes aumentaron de 0 a 50% y de 45,45 a 90,9% respectivamente, con estos resultados se puede corroborar el aumento de la sensibilidad de esta técnica adicionado el uso de la sonda taqman. Aunque esta mejora solo se evidenció en las muestras de neonatos, es necesario realizar más experimentos donde se pueden optimizar los resultados con respecto a las muestras de origen materno; sin embargo, lo anterior no afecta el objetivo del presente estudio ya que este tenía como finalidad detectar la presencia del ADN de *Treponema pallidum subsp pallidum* en muestras clínicas para el diagnóstico de sífilis congénita.

En estudios previos del grupo REMA las muestras de LCR no habían reportado amplificación debido a la baja carga treponémica; sin embargo en el presente estudio es importante recalcar que mediante el uso de la técnica de PCR tr-Taqman 10 de las 11 muestras de LCR obtuvieron resultados positivos, llegando a una sensibilidad del 90,9% con respecto a la técnica serológica de VDRL, lo cual demuestra que la sonda es altamente sensible y específica logrando detectar la presencia del ADN de la espiroqueta en muestras clínicas que usualmente tienen muy baja carga bacteriana.

Este resultado es valioso ya que, en el caso de los neonatos asintomáticos hijos de madres tratadas, un resultado positivo para PCR en este tipo de muestra puede ser la única evidencia de sífilis congénita (33).

De acuerdo a la literatura reportada, se puede inducir que la mejor muestra a analizar en el diagnóstico de la sífilis primaria es el hisopado de úlceras en piel o mucosas, ya que obtienen altas sensibilidades, lo cual es importante para darle validez a las técnicas de diagnóstico (61)(65)(67); sin embargo, en el presente estudio este tipo de muestra no fue utilizada debido a que los neonatos no presentan úlceras sifilíticas o chancros, ya que la transmisión se lleva a cabo de manera transplacentaria; en este caso, basados en el análisis bibliográfico se puede deducir que la muestra que mejor sensibilidad reporta para el diagnóstico de sífilis congénita utilizando PCR es el líquido amniótico, demostrando una sensibilidad del 100% como lo informa Emmanuel

Grimprel (7), pero este tipo de muestra en la práctica clínica es difícil de obtener, por lo cual en el presente estudio se muestra la aplicabilidad de la técnica molecular en muestras con mayor facilidad de obtención

Teniendo en cuenta que al momento de la toma de la muestra puede haber contaminación con flora de la piel y con otros patógenos de importancia clínica, la especificidad de los primers y la sonda fue evaluada utilizando plantillas de amplificación de ADN de bacterias tales como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella spp* y *Escherichia coli*, se pudo poner en evidencia que al amplificar el gen *TpN47*, los primers y la sonda taqman 47 REMA mostraron especificidad del 100%, además se realizó un análisis bioinformático utilizando la herramienta Primer-BLAST donde se alineó cada par de primers y la sonda con los genomas de bacterias filogenética y clínicamente relacionadas tales como *Treponema denticola*, *Treponema pallidum subsp pertenue*, *Borrelia burgdorferi*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus ducreyi*; este análisis evidencia la no complementariedad de los primers y la sonda con el ADN de estas bacterias.

La técnica utilizada en esta investigación se convierte en una herramienta diagnóstica valiosa para el control epidemiológico de esta patología ya que presenta ventajas muy significativas sobre las técnicas serológicas, empezando porque con esta técnica no es necesario considerar el periodo de ventana serológico que puede llegar a ser hasta de 3 meses. (71) Además, los anticuerpos transferidos a través de la placenta pueden persistir en un infante hasta los 15 meses de edad, y solo hasta después de los 18 meses de edad las pruebas serológicas tienen validez para el diagnóstico, es en estos casos donde el diagnóstico se convierte en un reto para el médico ya que las manifestaciones clínicas son nulas en más del 60% de los infantes o pueden presentar hallazgos sutiles nos específicos (33).

Finalmente, se puede concluir que el gen *TpN47* es una diana molecular promisoriosa y la variante de la PCR tr-Taqman es una herramienta valiosa para el diagnóstico de sífilis

congénita que minimiza los falsos negativos y positivos de las técnicas serológicas. Una vez estandarizada y validada esta técnica molecular podrá ser implementada en laboratorios clínicos de referencia para diagnosticar oportunamente la sífilis materna y congénita y proporcionar tratamiento adecuado, evitando así, secuelas graves e incluso la muerte neonatal o infantil.

CONCLUSIONES

- Se validó la utilización del gen *TpN47* como diana molecular para detectar la presencia de la espiroqueta *Treponema pallidum subsp pallidum* en muestras clínicas para el diagnóstico de sífilis congénita.
- Se determinó que el límite de detección de la técnica PCR tr y PCR tr-Taqman fue de 4,5 fg y 1,135 fg respectivamente, con especificidades del 100% para ambas variantes.
- Al comparar los resultados obtenidos en la PCR tr y PCR tr-Taqman, se estableció que esta última es significativamente más sensible ya que de las 27 muestras analizadas; 13 fueron positivas por PCR tr y 22 por PCR tr Taqman, estas 9 muestras representan un 33,34% de diferencia.
- La eficiencia de la variante PCR tr-Taqman se comprobó, comparando sus resultados con los obtenidos en la PCR tr, demostrando mayor número de muestras positivas al usar la sonda taqman; este comportamiento se evidenció en las muestras de suero de neonato, sangre de cordón umbilical y líquido cefalorraquídeo, pasando de 25 a 100, 0 a 50 y 45,45 a 90,9% respectivamente, resaltando así la sensibilidad que aporta la sonda Taqman a la técnica.
- El uso de diversos controles de amplificación tanto internos como externos, minimizó resultados falsos positivos y negativos, que se pueden presentar por la presencia de inhibidores de la PCR.
- La validación de esta técnica molecular podrá ser implementada en laboratorios clínicos de referencia para diagnosticar oportunamente la sífilis materna y congénita y proporcionar tratamiento adecuado, evitando así, secuelas graves e incluso la muerte neonatal o infantil.

- La muestra ideal para utilizar en el diagnóstico de sífilis haciendo uso de las técnicas moleculares, depende directamente del estadio clínico de la enfermedad.
- El uso de la sonda Taqman 47 *REMA* aumenta la sensibilidad de la PCR tr en el diagnóstico de sífilis congénita, disminuyendo los falsos positivos y negativos que se generan cuando se usan técnicas serológicas.

RECOMENDACIONES

- Disponer de la mayor parte de los datos clínicos de los pacientes incluidos en este tipo de estudios, tales como signos y síntomas, tiempo de evolución de la enfermedad, tratamiento, estado inmunológico, entre otros, para poder correlacionar mejor los resultados.
- Se requiere mayor número de muestras para validar la técnica en el campo clínico.

ANEXOS

ANEXO A: Protocolo de extracción de ADN de muestras clínicas

kit ultraClean® Blood spin DNA isolation kit MOBIO

1. Añadir 200 μ l de sangre total o fluidos corporales a un tubo de colección de 2 ml (incluido) y añadir 10 μ l de Proteinase K. **Nota:** (Opcional: se puede agregar RNasa A en este paso. Use 2 μ l de 20 mg / ml.)
2. Agregue 200 μ l de Solución B1 y mezcle agitando en vórtex durante 15 segundos.
3. Incube la muestra a 65 ° C durante 10 minutos. Centrifugar brevemente para recolectar el lisado.
4. Agregue 200 μ l de solución B2 y vortex durante 15 segundos. Centrifugar brevemente para recoger la muestra de la tapa.
5. Transfiera el lisado al filtro de centrifugado y centrifugue durante 1 minuto a 13,000 x g.
6. Transfiera el filtro de centrifugado al nuevo tubo de recolección de 2 ml (incluido).
7. Agregue 500 μ l de solución B3 al filtro de centrifugado. Centrifugar durante 30 segundos a 13,000 x g
8. Retire el filtro de centrifugado y deseche el flujo. Vuelva a colocar el filtro de centrifugado en el mismo tubo de recolección de 2 ml.
9. Agregue 500 μ l de solución B4 al filtro de centrifugado. Centrifugar 30 segundos a 13,000 x g.

10. Retire el filtro de centrifugado y deseche el flujo. Vuelva a colocar el filtro de centrifugado en el mismo tubo de recolección de 2 ml.
11. Centrifugar de nuevo durante 30 segundos a 13,000 x g para secar la membrana del filtro de centrifugado.
12. Retire con cuidado el filtro de centrifugado y transféralo a un nuevo tubo de recolección de 2 ml (incluido).
13. Agregue 100-200 µl de Solución B5. Nota: Para aumentar los rendimientos, incube durante 5 minutos a 65 ° C.
14. Centrifugue 1 minuto a 13,000 x g.
15. Retire la unidad del filtro de giro y cierre la tapa del tubo. El ADN genómico en el tubo ahora está listo para usar en cualquier aplicación.

Anexo B: Protocolo de extracción de ADN plasmídico

kit UltraClean 6 minutes mini plasmid prep kit MOBIO

Los pasos críticos para el aislamiento exitoso del ADN del plásmido usando este kit son los pasos 6-9 del protocolo. Eliminación del medio residual del sedimento celular antes de la adición de la solución de resuspensión S1 permite una lisis alcalina eficiente y un sedimento compacto después de la neutralización. El incumplimiento de estos pasos puede dar como resultado rendimientos más bajos.

1. Cultivar células (cultivo de plásmido) a una densidad típica de $A_{600} = 2.0$ o superior.
2. Cada preparación de plásmido requerirá un conjunto de dos tubos de recogida de 2 ml y una unidad de filtro de centrifugado (una cesta de plástico con una membrana de sílice blanca dentro de un tubo de 2 ml).

3. Etiquete las tapas de cada conjunto con un marcador de laboratorio resistente al etanol. Es conveniente colocar estos juegos en una gradilla de tubos de microcentrifugación en este orden: tubo, filtro de giro, tubo.

4. En el primer tubo en cada conjunto, y agregue hasta 2 ml de cultivo. Oriente los tubos de recogida de 2 ml de la misma manera cada vez que los gire en todos los procedimientos siguientes para que la bisagra del tubo quede orientada hacia fuera del centro del rotor.

5. Centrifugar durante 1 minuto a 16,000 x g (velocidad máxima).

Qué está pasando: las células bacterianas están siendo forzadas al fondo del tubo.

6. Decante el sobrenadante invirtiendo el tubo y vertiéndolo en un contenedor de desechos. Tendrá que hacer otro giro para asegurarse de eliminar todos los rastros de líquido de los lados del tubo como se describe en los próximos 3 pasos.

7. Oriente los tubos con las bisagras en la misma posición (las bisagras apuntan directamente desde el centro del rotor).

8. Centrifugue 5 segundos a 16,000 x g (velocidad máxima).

9. Retire todo el líquido visible con una punta de pipeta estrecha. La eliminación de todo el líquido en este paso es fundamental. Usar una punta de pipeta de calibre pequeño ayuda a eliminar todos los rastros de medios líquidos.

Qué está pasando: las células se han sedimentado y ahora están separadas del medio de cultivo.

10. Agregue 50 ul de Solución 1 a cada tubo de sedimento celular y cierre los tubos.

11. Resuspenda el sedimento bacteriano mediante agitación con vortex a la velocidad más alta por 10 segundos, quítelo durante 1 segundo y luego manténgalo en el vortex de nuevo. Repita este proceso por 1 minuto. Después de 1 minuto, sostenga el tubo en posición horizontal hasta una luz y mírelo. Si ve algún grupo de células, mantenga la agitación vorticial hasta que se vayan. Se necesita un mínimo de 1 minuto con el vórtice a su velocidad máxima para resuspender las células en el volumen de 50 ul. Un procedimiento alternativo es raspar las puntas de los tubos hacia adelante y hacia atrás sobre los orificios de una gradilla de tubos de micro centrifuga de 80 pocillos.

Qué está sucediendo: las células bacterianas se vuelven a suspender en un pequeño volumen de tampón que evita que se abran (lisis). Es importante hacer esta suspensión de células homogénea porque las células atrapadas en grupos serán resistentes a los reactivos de lisis. La solución 1 contiene RNasa A; sin embargo, no puede digerir ARN hasta que las células se lisan en el siguiente paso.

12. Verifique la solución 2. Si se precipitó, caliente a 55 - 65°C durante 5 minutos para que se disuelva. Mezcle antes de usar.

Qué está pasando: la solución 2 contiene un detergente SDS que puede precipitar si se enfría. Este precipitado es fácil de volver a suspender por calentamiento. Por esta razón, siempre almacene este kit a temperatura ambiente (20-25C). La solución 2 se puede usar cuando aún está caliente.

13. Agregue 100 ul de Solución 2 a la suspensión celular.

Qué está pasando: lisis de células alcalinas. La solución 2 es muy alcalina (pH 12) y contiene el detergente SDS. La adición de la Solución 2 hace que las células bacterianas se lisen porque las proteínas de la membrana celular se desnaturalizan de

forma similar a cuando se cocina un huevo. Todo el ADN se desnaturaliza a su forma monocatenaria en este punto. El ADN cromosómico bacteriano es largo y está unido a pedazos rotos de la membrana celular. El ADN del plásmido está vinculado por lo que forma dos círculos adjuntos. Como dos enlaces de una cadena. Todo el ARN se digiere durante este paso muy corto porque la RNasa A está activa incluso en condiciones muy alcalinas.

14. Cierre todos los tubos.

15. Invierta suavemente los tubos hasta 8 veces para mezclar. No vortex en este paso. Causa contaminación del ADN cromosómico rompiendo pedazos del ADN cromosómico de la bacteria que luego se purificará conjuntamente con el ADN del plásmido.

16. Agregue 325 ul de Solución 3.

Qué está pasando: la solución de neutralización 3 contiene acetato de potasio y sal. El acetato de potasio forma un precipitado cuando interactúa con SDS. Al mismo tiempo, las proteínas desnaturalizadas coprecipitan con la SDS. La solución 3 neutraliza el pH alcalino a un pH 7 más neutro. Todo el ADN intenta volver a la naturaleza. El plásmido puede reformarse fácilmente a su forma de doble cadena. El ADN cromosómico bacteriano encuentra difícil volver a la naturaleza porque no tiene un punto de referencia y es homólogo

17. Cierre los tubos e invierta suavemente hasta 8 veces para mezclar. No vortex en este paso.

18. Centrifugar durante 1 minuto (16,000 x g mínimo, velocidad máxima).

Nota: La centrifugación durante un minuto debe ser a velocidad máxima. Centrifugue por más de 1 minuto si su centrífuga requiere tiempo adicional para alcanzar la velocidad máxima.

Qué está sucediendo: los desechos celulares densos se sedimentan en el fondo del tubo. El ADN cromosómico también se sedimenta junto con los restos celulares.

19. Retire los tubos de la centrífuga. Debe haber un sobrenadante transparente no viscoso encima de una gran bolita blanca pegada a los lados del tubo. Si el pellet no es firme, sino que está suelto o engominado, esta es una indicación clara de que no eliminó todos los medios de cultivo cuando originalmente sedimentó las células. Deberá volver a empezar en este caso y tener más cuidado de eliminar todos los medios de cultivo.

20. Abra la tapa de tantos filtros de centrifugado como tenga preparaciones de plásmido.

21. Transfiera todo el líquido sobrenadante líquido a un filtro de centrifugación (evite el precipitado blanco). Decantar es el mejor método aquí. Simplemente gire el tubo para que salga de la bisagra. La pastilla blanca permanecerá pegada al costado del tubo. Si se desea, el sobrenadante puede transferirse usando una pipeta al filtro de centrifugado. Cierre las tapas de los filtros de giro.

22. Centrifugue 30 segundos a 10,000 x g. El líquido fluirá a través de la membrana blanca Spin Filter dejando el ADN del plásmido unido a la membrana del filtro.

Qué está pasando: el ADN del plásmido ahora se une a la membrana de sílice blanca en el filtro de espín. El ADN del plásmido se une debido a las altas condiciones de sal. Las impurezas no deseadas, como el ARN digerido, y cualquier otro componente celular que no se nodulice se pasan a través del filtro de centrifugación y terminan en el flujo a través del tubo de recolección. Este flujo se descarta

23. Levante la cesta del filtro del tubo de colección de 2 ml, deseche el líquido del tubo de colección de 2 ml y luego vuelva a colocar la cesta del filtro en el tubo.

Nota: No permita que el líquido en el tubo de recolección del filtro de giro entre en contacto con el blanqueador.

24. Agregue 300 l de Solución 4 al filtro de centrifugado. Cerrar la tapa.

25. Centrifugar 30 segundos a 16,000 x g. Deseche el flujo a través del líquido del Tubo de recolección de 2 ml y vuelva a centrifugar durante 30 segundos.

Qué está sucediendo: la Solución 4 lava el ADN que está unido al filtro de espín. La solución 4 es aproximadamente 50% de etanol. El etanol mantiene el ADN plasmídico unido al filtro a medida que se eliminan las impurezas.

26. Con cuidado de no derramar líquido sobre la canasta del filtro, coloque la canasta del filtro de centrifugado en un nuevo tubo de recolección de 2 ml (incluido).

27. Agregue 50 ul de Solución 5 o agua estéril directamente en el medio de la membrana del filtro de giro blanco.

Qué está pasando: la solución 5 es 10 mM Tris. A medida que pasa a través del filtro de giro, el ADN del plásmido se libera (eluye) del filtro y pasa al tubo de recolección. El ADN del plásmido se libera porque no queda ligado al filtro de centrifugado cuando no hay sal presente.

28. Centrifugue 30 segundos a 10,000 x g.

29. Retire la cesta del filtro y cierre la tapa del tubo. El ADN plásmido en el Tubo de recolección de 2 ml ahora está listo para usar en cualquier aplicación.

Anexo C: Control endógeno de Extracción

Gen Beta actina

Se realizó PCR convencional al ADN proveniente de muestras clínicas presuntamente positivas para sífilis y muestras de pacientes sin sospecha clínica de sífilis y con VDRL no reactivos, seleccionadas aleatoriamente, utilizando primers dirigidos a un segmento del gen β -actina humano para verificar la correcta extracción de ADN.

Tabla 25: Condiciones de amplificación para el gen beta actica y TpN47

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen inicial para 20 ul
Agua	10.1uL
Buffer	5x	1x	4uL
MgCl ₂	25mM	3mM	2,4uL
dNTPs	10mM	0.2mM	0,4uL
Primer forward	10uM	0.25uM	0,5uL
Primers reverse	10uM	0.25uM	0,5uL
Taq	5U/uL	0.025U/uL	0.1uL
ADN	2ul

Tabla 26: Programa de ciclaje para el gen beta actina

Fase	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
Denaturación inicial	94°C	5min	1
Denaturación	94°C	1min	25
Hibridación	60°C	1min	
Elongación	72°C	1min	
Elongación final	72°C	10 min	1

Conservación	15°C	
--------------	------	-------	--

Gen TpN47

Se realizó PCR convencional al ADN extraído de *Treponema pallidum subsp pallidum* proveniente de testículo de conejo y a las muestras infectadas en el laboratorio con este ADN, utilizando primers *TpN47*. Los productos de amplificación fueron analizados en gel de agarosa al 1.8%

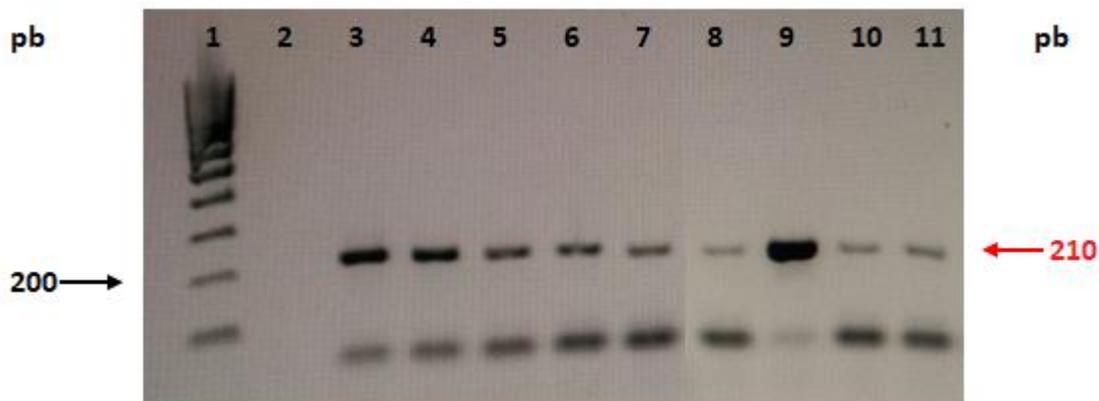


Figura 33: Control endógeno de amplificación del ADN de *Treponema pallidum subsp pallidum* con primers *TpN47*

Electroforesis en gel de agarosa al 1.8% **Carril 1.** Marcador de peso molecular **Carril 2.** Control negativo **Carril 3 y 4.** ADN de *treponema pallidum subsp pallidum* proveniente de testículo de conejo **Carril 5, 6, 7, 8, 10, 11.** Muestras infectadas con ADN de *treponema pallidum subsp pallidum* proveniente de testículo de conejo **Carril 9.** Control positivo

Se observan bandas correspondientes a un producto de amplificación de 210 pares de bases del gen *TpN47*

ANEXO D: Diploma de participación ponencia oral Séptimo Encuentro Institucional de Semilleros de Investigación. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, Colombia.



ANEXO E: Certificados de participación ponencia oral REDCOLSI nodo Bogotá, Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, Colombia.

La Red Colombiana de Semilleros de Investigación
Nodo Bogotá - Cundinamarca

otorga el certificado a:

Milena Patricia Barbosa

con cedula de ciudadanía 1.045.677.776

en calidad de: **Ponente**

por su participación en el XVI encuentro regional de semilleros de investigación,
Nodo Bogotá - Cundinamarca, en la Universidad Jorge Tadeo Lozano durante
los días 10 y 11 de Mayo del 2018.



German Eduardo Vargas Zapata
Coordinador RedCOLSI
Nodo Bogotá - Cundinamarca



Nora Milena Roncancio Parra
Secretaria Nacional

*Nodo Bogotá Cnd.
16 años*

La Red Colombiana de Semilleros de Investigación
Nodo Bogotá - Cundinamarca

otorga el certificado a:

Brigete Stephany González Chaves

con cedula de ciudadanía 1.010.216.925

en calidad de: **Ponente**

por su participación en el XVI encuentro regional de semilleros de investigación,
Nodo Bogotá - Cundinamarca, en la Universidad Jorge Tadeo Lozano durante
los días 10 y 11 de Mayo del 2018.



German Eduardo Vargas Zapata
Coordinador RedCOLSI
Nodo Bogotá - Cundinamarca



Nora Milena Roncancio Parra
Secretaria Nacional

*Nodo Bogotá Cnd.
16 años*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections.
<http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/stisestimates/en/index.html> [Internet]. 2001 [cited 2018 May 28]; Available from: <http://www.who.int/hiv/pub/sti/pub7/en/>
2. WHO. Infecciones de transmisión sexual. Menendez C, editor. 2016 Feb 26 [cited 2018 May 28];(2). Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1001396>
3. Giraldo-Ospina B, Henao-Nieto DE, Flórez-Salazar M, Parra-Londoño F, Gómez-Giraldo EL, Mantilla-Moreno OJ. Prevalencia de sífilis en una población de gestantes de dos comunidades de un municipio de Colombia. *Biosalud* [Internet]. 2015 [cited 2018 May 28];14(2):9–18. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v14n2/v14n2a02.pdf>
4. Vanegas-Castillo N, Cáceres-Buitrago YN, Jaimes-González CA, Ángel-Muller E, Rubio-Romero JA. Tratamiento de la sífilis gestacional y prevención de la sífilis congénita en un hospital público en Bogotá, 2010. *Investig Orig Rev Fac Med* [Internet]. 2011 [cited 2018 May 28];59(3):167–89. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112011000300002
5. Damasceno Casal C.A, Oliveira da silva M., Brasil Costa I., da Cunha Araujo E. de OICTC. 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* [Internet]. 2011 Jul 22 [cited 2018 May 28];44(4):451–6. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822011000400010&lng=en&tlng=en
6. Martin IE, Gu W, Yang Y, Tsang RSW. Macrolide Resistance and Molecular Types of *Treponema pallidum* causing primary syphilis in Shanghai, China. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2009 Aug 15 [cited 2018 May 28];49(4):515–21. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/600878>
7. Grimpel E, Sanchez PJ, Wendel GD, Burstain JM, McCracken GH, Radolf JD, 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 Microbiol* [Internet]. 1991 Aug [cited 2018 May 29];29(8):1711–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1761693>
8. Rodríguez M&, Rodríguez W, Stock RP, Rodríguez SI. Métodos físico-químicos en Biotecnología (2006-II). [cited 2018 May 29]; Available from: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/realtime_pcr.pdf

9. T. Dorak. Real-time PCR. Taylor Fr Gr [Internet]. 2006 [cited 2018 May 29]; Available from: <http://www.gene-quantification.com/dorak-book-real-time-pcr-2006.pdf>
10. Gama A, Carrillo-Casas E, Hernández-Castro R, Vázquez-Aceituno V, Toussaint-Caire S, Xicohtencatl-Cortes J, et al. *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* identification by real-time PCR targetting the *polA* gene in paraffin-embedded samples positive by immunohistochemistry. *Int J STD AIDS* [Internet]. 2017 Nov 11 [cited 2018 May 29];28(13):1299–304. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0956462417704123>
11. Sanguineti Diaz A.C. Tafur Davila J.R. ACTUALIZACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DE LA SÍFILIS. *Dermatología Peru* [Internet]. 2004 [cited 2018 May 29];14(3):190–7. Available from: https://www.researchgate.net/publication/237237932_ACTUALIZACION_EN_EL_DIAGNOSTICO_DE_LA_SIFILIS
12. Burstain JM, Grimprel E, Lukehart SA, Norgard M V, Radolf JD. Sensitive detection of *Treponema pallidum* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1991 Jan 1 [cited 2018 May 29];29(1):62–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1993770>
13. Grange P., Gressier L ., Dion P., Farhi D. BN et. al. Evaluation of a PCR test for detection of *Treponema pallidum* in swabs and blood. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2012 Mar 1 [cited 2018 May 29];50(3):546–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22219306>
14. Gayet-Ageron A, Laurent F, Schrenzel J, Charton B, Jimenez-Getaz G, Tangomo M, et al. Performance of the 47-kilodalton membrane protein versus DNA polymerase I genes for detection of *Treponema pallidum* by PCR in ulcers. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2018 May 29];53(3):976–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25520453>
15. Castro R., Águas M.j., Batista T., Araújo c., Mansinho K. PF. Detection of *Treponema pallidum* Sp. *pallidum* DNA in Cerebrospinal Fluid (CSF) by Two PCR Techniques. *J Clin Lab Anal* [Internet]. 2016 Sep [cited 2018 May 29];30(5):628–32. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcla.21913>
16. Pinilla G., Chavarro B., Moreno N., Navarrete J. ML. Determinación de los genes, 16S ADNr, *polA*, y *TpN47*, en la detección de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* para el diagnóstico de sífilis congénita. *NOVA* [Internet]. 2015 Dec 30 [cited 2018 May 29];13(24):17–25. Available from: <http://unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/305/572>
17. Pinilla G., Campos L., Duran A., Navarrete J. ML. Detección de *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* para el diagnóstico de sífilis congénita mediante reacción en cadena de la polimerasa anidada. *Biomédica* [Internet]. 2017 Mar 15 [cited 2018 May 29];38(1):128. Available from:

<https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/3740>

18. Murillo Calderon A. Actualización: Sífilis en Medicina Legal. *Med Leg Costa Rica* [Internet]. 2011 [cited 2018 May 29];28(1):55–64. Available from: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152011000100007
19. SIFILIS [Internet]. [cited 2018 May 29]. Available from: <https://previniendo.files.wordpress.com/2009/05/its-sifilis.pdf>
20. Contreras E., Zuluaga S. O V. Syphilis: the Great Mimicker. *Asoc Colomb Infectología* [Internet]. 2008 [cited 2018 May 29];12(2):340–7. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v12n2/v12n2a06.pdf>
21. Garza-Velasco R. G-PI, Manero-Brito S. La sífilis y los principales factores de virulencia de *Treponema pallidum*. *Dep Biol Fac Química UNAM* [Internet]. [cited 2018 May 29]; Available from: <http://depa.fquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-Tpallidum.pdf>
22. Martin I., Raymond S.W., Sutherland, K., Tilley P., Read R., Anderson B. et al. Molecular characterization of syphilis in patients in Canada: azithromycin resistance and detection of *Treponema pallidum* DNA in whole-blood samples versus ulcerative swabs. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2009 Jun [cited 2018 May 29];47(6):1668–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19339468>
23. Burgos P. LE. *Treponema pallidum*: Estructura Y Antigenicidad. *Univ Ciencias Y Soc St Cruz la Sierra* [Internet]. 2010 [cited 2018 May 29];1(2):42–4. Available from: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S8888-88882010000100008&script=sci_arttext
24. Molepo J., Pillay A., Weber B., Morse S. A. HAA. Molecular typing of *Treponema pallidum* strains from patients with neurosyphilis in Pretoria, South Africa. *Sex Transm Infect* [Internet]. 2007 Jun [cited 2018 May 29];83(3):189–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17244664>
25. Ryan Kenneth J. (Kenneth James), Ray CG, Sherris JC. Sherris, microbiología médica [Internet]. 5°. Kenneth J. RM, C. GEORGE RAY M, editors. McGraw-Hill; 2011 [cited 2018 May 29]. 489-505 p. Available from: <https://docs.google.com/file/d/0B3LwG0yL873sMVY4WThHQi10dIE/edit>
26. De Santis M, De Luca C, Mappa I, Spagnuolo T, Licameli A, Straface G, et al. Syphilis Infection during Pregnancy: Fetal Risks and Clinical Management. *Infect Dis Obstet Gynecol* [Internet]. 2012 Jul 5 [cited 2018 May 29];2012:1–5. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/idog/2012/430585/>
27. Pranatharthi Haran Chandrasekar. Syphilis Clinical Presentation: History, Physical Examination, Complications [Internet]. 2017 [cited 2018 May 29].

Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/229461-clinical>

28. Eugene W. Nester, Denise G. Anderson, C. Evans Roberts Jr. MTN. *Médecina: Microbiología humana* [Internet]. 5°. 2007 [cited 2018 May 29]. Available from: https://www.manualmoderno.com/apoyos_electronicos/9707292873/nester1a_main.php
29. Hook E. *Epidemiologia Actual de La Sífilis*. *Lancet* [Internet]. 2017 [cited 2018 May 29];389(10078):1550–7. Available from: <https://es.scribd.com/document/353897462/Epidemiologia-Actual-de-La-Sifilis>
30. Galban E. BA. *Situación De La Sífilis en 20 Países de Latinoamérica Y El Caribe: Año 2006*. *DST – J bras Doenças Sex Transm* [Internet]. 2007 [cited 2018 May 30];19(3–4):166–72. Available from: <http://www.dst.uff.br/revista19-3-2007/9.pdf>
31. Chowdhary N, Rani BK, Mukunda KS, Kiran NK. Early detection of congenital syphilis. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* [Internet]. 2014 [cited 2018 May 30];32(4):333–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25231043>
32. Wahab AA, Ali UK, Mohammad M, Md Monoto EM, Rahman MM. Syphilis in pregnancy. *Pakistan J Med Sci* [Internet]. 2015 [cited 2018 May 30];31(1):217–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25878647>
33. Singh AE, Levett PN, Fonseca K, Jayaraman GC, Lee BE. Canadian Public Health Laboratory Network laboratory guidelines for congenital syphilis and syphilis screening in pregnant women in Canada. *Can J Infect Dis Med Microbiol* [Internet]. 2015 [cited 2018 May 30];26(A):23A--28A. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25798162>
34. Rivera M. *Sífilis Congénita*. *Honduras Pedriatica* [Internet]. 2003 [cited 2018 May 30];23(2):1–4. Available from: <http://www.bvs.hn/RHP/pdf/2003/pdf/Vol23-2-2003-5.pdf>
35. Radolf Justin D. *Medical Microbiology* [Internet]. 4°. Samuel Barón, editor. *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996 [cited 2018 May 30]. capítulo 36 *Treponema*. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413263>
36. Corrales Ramírez L., Ávila de Navia S. *ETS. Bacteriología Teoría Y Práctica*. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, editor. Bogotá- Colombia; 2013. 271-284 p.
37. Campos Leguizamón L DRA. *Detección de Treponema pallidum subsp pallidum para el diagnóstico de sífilis congénita mediante reacción en cadena de la polimerasa anidada*. In: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá- Colombia; 2016.
38. Weinstock G., Hardham J., McLeod M., Sodergren E. NS. *The genome of*

- Treponema pallidum: new light on the agent of syphilis. FEM Microbiol Rev [Internet]. 1998;22(4):323–32. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00373.x>
39. Meléndez-Herrada E., Ramírez M., Sanchez-Dorantes G. CA. Estrategias de investigación para el desarrollo de una vacuna contra la sífilis [Internet]. Vol. 51, Rev Fac Med UNAM. Mexico D.F; 2008 [cited 2018 May 30]. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2008/un081e.pdf>
 40. Pětrošová H, Pospíšilová P, Strouhal M, Čejková D, Zabaníková M, Mikalová L, et al. Resequencing of *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* Strains Nichols and SS14: Correction of Sequencing Errors Resulted in Increased Separation of Syphilis Treponeme Subclusters. PLoS One [Internet]. 2013 [cited 2018 May 30];8(9):e74319. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24058545>
 41. 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 Microbiol [Internet]. 2001 May 1 [cited 2018 May 30];39(5):1941–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11326018>
 42. Bouis, D. A. PTG, Takashima A. NMV. Dendritic cells phagocytose and are activated by *Treponema pallidum*. Infect Immun [Internet]. 2001 Jan 1 [cited 2018 May 30];69(1):518–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11119545>
 43. Haake DA. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. Microbiology [Internet]. 2000 Jul [cited 2018 May 30];146 (Pt 7(Pt 7):1491–504. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10878114>
 44. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature [Internet]. 1998 Mar 19 [cited 2018 May 30];392(6673):245–52. Available from: <http://www.nature.com/articles/32588>
 45. Arroll TW, Centurion-Lara A, Lukehart SA, Van Voorhis WC. T-Cell responses to *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* antigens during the course of experimental syphilis infection. Infect Immun [Internet]. 1999 Sep [cited 2018 May 30];67(9):4757–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10456928>
 46. Lewinski MA, Miller JN, Lovett MA, Blanco DR. Correlation of immunity in experimental syphilis with serum-mediated aggregation of *Treponema pallidum* rare outer membrane proteins. Infect Immun [Internet]. 1999 Jul 1 [cited 2018 May 30];67(7):3631–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10377149>
 47. Radolf JD. *Treponema pallidum* and the quest for outer membrane proteins. Mol Microbiol [Internet]. 1995;16(6):1067–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8577243>

48. Chamorro A. Sífilis y otras Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) [Internet]. Cideim.org.co. 2018 [cited 2018 May 30]. Available from: <http://www.cideim.org.co/cideim/investigacion/enfoquesdeinvestigacion/sifilis.html>
49. Organización Panamericana de la Salud. Guía clínica para la eliminación de la transmisión materno-infantil del VIH y de la sífilis congénita en América Latina y el Caribe [Internet]. Raúl González Montero SJS, editor. Organización Panamericana de la salud. Washington D.C; 2010 [cited 2018 May 30]. Available from: https://www.paho.org/clap/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=publicaciones-sifilis&alias=78-guia-clinica-para-la-eliminacion-de-la-transmision-materno-infantil-del-vih-y-de-la-sifilis-congenita&Itemid=219&lang=es
50. Quijada Bonilla M. et al DLHFM-DMP-GO. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública SIFILIS GESTACIONAL Y SIFILIS CONGENITA. Protoc Vigil en Salud Pública [Internet]. 2015 [cited 2018 May 30];3–40. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/protocolo-vigilancia-sifilis-gestacional.pdf>
51. Cruz Aconcha A.R. Situación de la Sífilis gestacional y congénita en Colombia, un desafío al Sistema general de Seguridad Social en Salud. Rev Col Obstet y Ginecol [Internet]. 2012 [cited 2018 May 30];63(4):304–7. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcog/v63n4/v63n4a01.pdf>
52. Díaz Cruz L.A. Sífilis Gestacional: Un problema de Salud Pública [Internet]. Departamento Obstetricia y Ginecología, Universidad Nacional de Colombia. 2011 [cited 2018 May 30]. Available from: <http://www.bdigital.unal.edu.co/28681/2/26439-156392-1-PB.html>
53. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis [Internet]. Vol. 8, Clinical Microbiology Reviews. 1995 [cited 2018 May 31]. p. 1–21. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC172846/pdf/080001.pdf>
54. López-Hontangas J.L. A-FJ. Sífilis: Una Revisión Actual [Internet]. Servicio de Microbiología Hospital La Fe. Valencia. [cited 2018 May 31]. Available from: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/serologia/sifilis.pdf>
55. García C P, Grassi C B, Fich S F, Salvo L A, Araya C L, Abarzúa C F, 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 infectología [Internet]. 2011 Aug [cited 2018 May 31];28(4):310–5. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182011000500002&lng=en&nrm=iso&tlng=en
56. Carrada-Bravo T. El diagnóstico de laboratorio de la sífilis. MG Rev Mex Patol Clin [Internet]. 2002 [cited 2018 May 31];50(2):82–96. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2003/pt032e.pdf>

57. Peeling RW, Ye H. Diagnostic tools for preventing and managing maternal and congenital syphilis: an overview. *Bull World Health Organ* [Internet]. 2004 [cited 2018 May 31];82(03):439–46. Available from: <http://www.who.int/bulletin/volumes/82/6/439.pdf>
58. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2013 [cited 2018 May 31];2(5):70–8. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>
59. Mas E., Poza J., Ciriza J., Zaragoza P., Osta R. RC. Fundamentos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. *Rev Aquat Univ Zaragoza España* [Internet]. 2001 [cited 2018 May 31];15(1). Available from: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/html/art1501/basespcr.htm>
60. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2004 Jan [cited 2018 May 31];22(5):299–305. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X0473092X>
61. Palmer HM, Higgins SP, Herring AJ, Kingston MA, Palmer HM. Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. *Sex Transm Infect* [Internet]. 2003 [cited 2018 May 31];79:479–83. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1744778/pdf/v079p00479.pdf>
62. Yamamoto M., Lizama L., Valenzuela P., Carrillo J., Insunza A. PP. Diagnóstico Antenatal de Sífilis Congénita por PCR en Líquido Amniótico y sus Posibles Aplicaciones. *Rev Chil Obstet Ginecol* [Internet]. 2005 [cited 2018 May 31];70(2):87–90. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75262005000200005&lng=en&nrm=iso&tlng=en
63. Samalvides-Cuba F. B-FC. Sífilis en la Gestación. *Rev Peru Ginecol y Obstet* [Internet]. 2010 [cited 2018 May 31];56(1):202–8. Available from: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ginecologia/vol56_n3/pdf/a06v56n3.pdf
64. Caserta M. Sífilis Congénita [Internet]. *Manual MSD*. 2018 [cited 2018 May 31]. Available from: <https://www.msdmanuals.com/es/professional/pediatría/infecciones-en-recién-nacidos/sífilis-congénita>
65. Tipple C, Hanna MOF, Hill S, Daniel J, Goldmeier D, McClure MO, et al. Getting the measure of syphilis: qPCR to better understand early infection. *Sex Transm Infect* [Internet]. 2011 Oct [cited 2018 Jul 29];87(6):479–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21752804>
66. Leslie DE, Azzato F, Karapanagiotidis T, Leydon J, Fyfe J. 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. *J*

- Clin Microbiol [Internet]. 2007 Jan [cited 2018 Jul 29];45(1):93–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17065262>
67. Cecilia Sanguinetti Diaz. Pruebas de Laboratorio en el diagnóstico de la sífilis. Dermatología Peru [Internet]. 2000 [cited 2018 Jul 29];10(1):1–6. Available from: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/dermatologia/v10_sup1/pruebas_lab.htm
 68. Gayet-Ageron A, Ninet B, Toutous-Trellu L, Lautenschlager S, Furrer H, Piguet V, et al. Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse biological samples. Sex Transm Infect [Internet]. 2009 Aug 1 [cited 2018 Jul 29];85(4):264–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19155240>
 69. Sánchez-Jara Sánchez A. Nuevas aportaciones a la correlación clínico molecular de la catarata senil [Internet]. Ediciones Universidad de Salamanca; 2011 [cited 2018 Jul 29]. Available from: <https://books.google.com.co/books?id=5NL28L7iJpIC&pg=PA104&lpg=PA104&dq=garantizan+la+especificidad+de+la+detección,+permiten+identificar+polimorfismos+o+mutaciones+puntuales&source=bl&ots=UsD5Cevrx7&sig=84VDzfkW6T2uFRet-MiBjyPFBo&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj>
 70. Chi K-H, Danavall D, Taleo F, Pillay A, Ye T, Nachamkin E, et al. Molecular differentiation of *Treponema pallidum* subspecies in skin ulceration clinically suspected as yaws in Vanuatu using real-time multiplex PCR and serological methods. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2015 Jan [cited 2018 Jul 29];92(1):134–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25404075>
 71. Heymans R, van der Helm JJ, de Vries HJC, Fennema HSA, Coutinho RA, Bruisten SM. Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. J Clin Microbiol [Internet]. 2010 Feb [cited 2018 Jul 29];48(2):497–502. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007388>