

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”
CENTRO DE INVESTIGACIONES, DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA
DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA-MICOLOGÍA**



**DETECCIÓN, CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y RESISTENCIA
A ANTIMICROBIANOS DE *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*
EN CUBA. 2012-2017**

**Tesis presentada en opción al Grado Científico de
Doctor en Ciencias de la Salud**

ANGEL ALBERTO NODA RAMOS

La Habana, 2019

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”
CENTRO DE INVESTIGACIONES, DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA
DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA-MICOLOGÍA**

**DETECCIÓN, CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y RESISTENCIA A
ANTIMICROBIANOS DE *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*
EN CUBA. 2012-2017**

**Tesis presentada en opción al Grado Científico de
Doctor en Ciencias de la Salud**

Autor: Lic. ANGEL ALBERTO NODA RAMOS, MC

**Tutor: Prof. Tit., Lic. Islay Rodríguez González, Dr.C
Asesora: Prof. Tit., Dra. Vivian Kourí Cardellá, Dr.Cs**

La Habana, 2019

Los rincones más oscuros del infierno están reservados para aquellos quienes mantienen la neutralidad en tiempos de crisis moral.

Dan Brown

A mi Familia

Agradezco a todo el equipo multidisciplinario que hizo posible la realización de este trabajo: especialistas, técnicos, personal de enfermería y pacientes. Muchas gracias a todos mis colegas y profesores, en especial a mi tutor.

ABREVIATURAS EMPLEADAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	ADN ribosomal
ADNr 16S	Gen que codifica la subunidad 16S del ARN ribosomal
ADNr 23S	Gen que codifica la subunidad 23S del ARN ribosomal
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosomal
ARNr 16S	Subunidad 16S del ARN ribosomal
ARNr 23S	Subunidad 23S del ARN ribosomal
<i>arp</i>	Gen que codifica la proteína Arp
ATCC	Colección americana de cultivos tipo
ATP	Trifosfato de adenosina
CDC	Centro para el control y prevención de enfermedades
Ct	Ciclo umbral
dNTP	Deoxinucleótidos trifosfato
EDCO	Examen directo de campo oscuro
EUA	Estados Unidos de América
ELISA	Ensayos inmunoenzimáticos sobre fase sólida
g	Gramo
x g	Gravedades
geq	Genomas equivalentes
HSH	Hombres que tienen sexo con otros hombres
IC	Intervalo de confianza
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IPK	Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”
ITS	Infección de transmisión sexual
kDa	Kilodaltons
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
LNRTPE-IPK	Laboratorio Nacional de Referencia de Treponemas y Patógenos Especiales del IPK
LPS	Lipopolisacáridos

M	Molar
mA	Miliamperes
Mb	Megabases
MEM	Medio esencial mínimo
mg	Miligramo
MgCl₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
MINSAP	Ministerio de salud pública
mL	Militros
MLSA	Análisis de secuencias de <i>loci</i> múltiples
mM	Milimolar
nm	Nanómetros
°C	Grados Celsius
OR	Razón de ventaja
ORF	Marco abierto de lectura
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PIS	Sitios informativos de parsimonia
<i>polA</i>	Gen que codifica la enzima ARN polimerasa A
RFLP	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
RP	Razón de prevalencia
RPR	Detección rápida de reaginas plasmáticas
RT-PCR	PCR en tiempo real
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Polimorfismo de simple nucleótido
TEN	<i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>endemicum</i>
Th1	Células de la inmunidad adquirida (del inglés, “ <u>T helper 1</u> ”)
TPA	<i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i>
TPE	<i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pertenue</i>
TPHA	Hemaglutinación de <i>Treponema pallidum</i>
<i>tpp47</i>	Gen que codifica la proteína de membrana externa TP47

<i>tpr</i>	Gen que codifica la proteína Tpr
V	Volts
VDRL	Del inglés “ <u>Venereal diseases research laboratory</u> ” (prueba de pesquisa para sífilis)
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
β-glob	β-globina humana
μL	Microlitros
μM	Micromolar
μm	Micrómetros

SÍNTESIS

Se presenta la frecuencia de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* (TPA) en lesiones ulceradas de pacientes cubanos (2012-2017), su relación con variables clínico-epidemiológicas, así como la identificación de los subtipos/genotipos y determinantes genéticos asociados a resistencia a antimicrobianos en la bacteria. La implementación de herramientas moleculares en el Laboratorio Nacional de Referencia del IPK determinó que 53,8 % de los pacientes estaban infectados con TPA y que individuos jóvenes, la seropositividad al VIH, las relaciones sexuales entre hombres y el no uso del condón constituyeron predictores de riesgo para el desarrollo de úlceras sifilíticas. Se constató diversidad genética en los treponemas identificados, sustentada en la variedad de subtipos (8)/genotipos (7) circulantes, la presencia de eventos de recombinación genética y la detección de *T. pallidum* subsp. *endemicum* (agente causal de bejel). Además se identificó la presencia de mutaciones de resistencia a los macrólidos en 90,3 % de los aislados de TPA, lo que sugiere el no uso de este antimicrobiano como tratamiento alternativo de la sífilis venérea. Esta es la primera investigación de su tipo en Cuba, y sus resultados constituyen elementos esenciales para los programas de prevención y control de las infecciones de transmisión sexual en Cuba y el mundo.

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Introducción.....	2
1.2 Hipótesis.....	6
1.3 Objetivos.....	6
1.4 Novedad científica.....	6
1.5 Valor teórico.....	7
1.6 Valor práctico.....	8
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i>	10
2.2 Taxonomía.....	11
2.3 Características genómicas y capacidad de sobrevivencia.....	12
2.4 Patogenia.....	13
2.5 Características generales de la sífilis.....	15
2.5.1 Sífilis primaria.....	15
2.5.2 Sífilis secundaria.....	16
2.5.3 Sífilis latente.....	17
2.5.4 Sífilis tardía (terciaria).....	17
2.6 Diagnóstico de laboratorio.....	17
2.6.1 Diagnóstico indirecto.....	18
2.6.2 Diagnóstico directo.....	20
2.7 Caracterización molecular de <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i>	22
2.7.1 Identificación de subtipos de <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i> mediante el método propuesto por los CDC.....	22
2.7.2 Identificación de genotipos de <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i> mediante el método de análisis de secuencias multi-locus.....	23
2.8 Tratamiento antimicrobiano.....	24
2.8.1 Resistencia de <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i> a los macrólidos.....	24
2.8.2 Desarrollo potencial de resistencia a las tetraciclinas.....	26
2.9 Epidemiología.....	26

2.10 Situación de la sífilis venérea en Cuba	28
2.11 Treponematosis endémicas	29
2.11.1 Pian	30
2.11.2 Bejel o sífilis endémica.....	30
2.11.3 Pinta	31
III. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1 Diseño epidemiológico	33
3.2 Material de referencia	33
3.3 Determinación de la frecuencia de infección por <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i> y su asociación con variables clínico-epidemiológicas de interés (Objetivo 1)	34
3.3.1 Toma de las muestras.....	34
3.3.2 Detección molecular de <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i> y de otros agentes infecciosos causantes de lesiones ulceradas en las muestras clínicas.....	35
3.3.3 Relación de los pacientes infectados con <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i> y variables clínico-epidemiológicas de interés	39
3.4 Identificación de los subtipos/genotipos de <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i> que infectan a la población de estudio (Objetivo 2)	40
3.4.1 Identificación de los subtipos de <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i>	40
3.4.2 Identificación de los genotipos de <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i>	44
3.5 Detección de determinantes genéticos de resistencia a macrólidos y tetraciclinas en aislados cubanos de <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i> (Objetivo 3)	48
3.5.1 Detección de las mutaciones A2058G y A2059G que confieren resistencia a macrólidos en <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i>	48
3.5.2 Detección de mutaciones puntuales en el ADNr 16S de <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i> potencialmente relacionadas con resistencia a tetraciclinas	49
3.6 Aspectos éticos	49
3.7 Limitaciones de la investigación.....	51
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
4.1 Frecuencia de infección por <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i> en pacientes cubanos	53
4.1.1 Calidad de la extracción del ADN y frecuencia de inhibición de la PCR	53

4.1.2 Límite de detección y especificidad analítica de los protocolos de PCR para la detección de <i>Treponema pallidum</i>	54
4.1.3 Aplicación de las PCR a las muestras clínicas	55
4.2 Predictores de riesgo para la adquisición de la infección por <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i>	63
4.3 Caracterización molecular de los aislados de <i>Treponema pallidum</i> identificadas en los pacientes estudiados	66
4.3.1 Caracterización molecular de los aislados de <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i> identificados mediante el método propuesto por los CDC	67
4.3.2 Caracterización molecular de los aislados de <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i> identificados mediante MLSA.....	72
4.4 Detección molecular de mecanismos de resistencia a macrólidos y a tetraciclinas ...	87
4.4.1 Detección molecular de las mutaciones A2058G y A2059G en el ADNr 23S que confieren resistencia a macrólidos en <i>Treponema pallidum</i>	87
4.4.2 Detección molecular de mutaciones en el ADNr 16S que potencialmente confieren resistencia a tetraciclinas en <i>Treponema pallidum</i>	92
4.5 Consideraciones generales	93
CONCLUSIONES	98
RECOMENDACIONES.....	100
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
ANEXOS	130
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA DE LA TESIS	145
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DEL AUTOR NO RELACIONADAS CON TEMA DE LA TESIS	149

I.INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

La sífilis venérea (sífilis) es una enfermedad multisistémica y crónica con un curso clínico variable, caracterizado por los estadios primario (chancro sifilítico y linfadenopatía regional), secundario (lesiones máculo-papulares en piel, linfadenopatía y meningitis), latente (asintomático) y terciario (lesiones destructivas en órganos). La transmisión es fundamentalmente por vía sexual, contacto directo con piel y mucosas o transmisión vertical como resultado del pase transplacentario del agente causal, *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* (TPA), durante el embarazo (1). La sífilis es además, una infección curable; sin embargo, se estima una aparición mundial anual de 5,6 millones de casos nuevos en adultos con un notable incremento en el número de casos en los últimos años (2), lo que apunta a la necesidad del fortalecimiento de los programas mundiales de vigilancia y control de esta infección.

TPA es una bacteria patógena estricta al humano, con una apariencia espirilar delgada (dimensiones de 0,1 - 0,2 μm de ancho y de 6 a 20 μm de longitud) y una elevada movilidad, lo que le confiere una capacidad extraordinaria de penetración a través de tejido tegumentario y diseminación en ambientes de alta viscosidad en el hospedero (3). Desde el punto de vista genético, son bacterias que carecen de numerosos genes que confieren funciones biológicas indispensables para la sobrevivencia y adaptación a medios extra-hospederos; consecuentemente esta “simplicidad” genética es la responsable de la gran dependencia de este patógeno al humano, así como de los constantes fallos en los intentos de su cultivo *in vitro*. El genoma de TPA está contenido en un cromosoma circular de aproximadamente 1,14 megabases (Mb) y posee 1041 marcos abiertos de lectura (ORF, del inglés “Open Reading Frames”) lo que representa 92,9 % del ADN genómico total, del cual 55 % codifica proteínas

conocidas. Es uno de los genomas más pequeños conocidos en bacterias y como regla general carece de secuencias de profagos, transposones o genes de modificación-restricción, aunque recientemente se evidenciaron genes recombinantes (4).

El diagnóstico de la sífilis varía de acuerdo a la etapa clínica de la enfermedad y recae fundamentalmente en hallazgos clínico-epidemiológicos unido a los resultados de laboratorio para confirmación. Aunque las pruebas serológicas (no treponémicas y treponémicas) son las más utilizadas para la confirmación de caso, las mismas carecen de sensibilidad sobre todo en estadios tempranos de la infección (5). En este punto, las herramientas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés “Polymerase Chain Reaction”) juegan un papel fundamental en el diagnóstico al aportar valores excelentes de sensibilidad y especificidad analíticas (6, 7). Sin embargo, la sensibilidad diagnóstica depende del estadio clínico de la infección y del número de treponemas presentes en la muestra clínica utilizada. A nivel internacional se reportan diversos protocolos de PCR basados en diferentes genes dianas, destacándose los genes que codifican la polimerasa A (*polA*) y la proteína de membrana externa de 47kDa (*tpp47*) (8); pero no existe consenso sobre qué protocolo deberá ser utilizado con mayor robustez diagnóstica.

El conocimiento sobre la epidemiología mundial de TPA es aún incipiente comparado con otros patógenos humanos. Esto puede deberse al carácter no cultivable de TPA y a la falta de apoyo de organizaciones financieras a las investigaciones relacionadas con el tema. Solo países desarrollados (Estados Unidos de América [EUA], Canadá, Inglaterra, Francia, entre otros) y unos pocos en vías de desarrollo (China, Argentina, República Checa, etc.) han llevado a cabo estudios de subtipificación o genotipificación molecular. Para estos fines existen dos protocolos reconocidos; el propuesto por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, del inglés “Centres for Diseases Control and Prevention”) de EUA y mejorado por Marra y colaboradores (9) que está basado en la amplificación de fragmentos génicos variables del gen *arp* (del inglés, “acidic repeat protein”, en el estudio por restricción del gen *tpr* (del inglés, “Treponema pallidum repeat”) y en la secuenciación de un fragmento del *locus* TP0548. Además, investigadores de la República Checa propusieron un nuevo protocolo de genotipaje basado en el análisis de secuencias multi-*locus* (MLSA, del inglés

“Multi-Locus Sequence Analysis”) que contempla la secuenciación de tres *loci* y la identificación en ellos de polimorfismos de simple nucleótido (SNP, del inglés “Single Nucleotide Polymorphisms”) (10). El criterio de los CDC está mayormente expandido con una considerable prevalencia mundial del subtipo 14d/f; sin embargo, el mismo ha sido recientemente cuestionado por la posible variabilidad intraespecie de los genes *arp* y *tpr* (11). Lo anterior, unido a que este sistema no explota la diversidad genética contemporánea de TPA, ha facilitado el uso del MLSA para rastrear redes de transmisión, describir comportamientos epidemiológicos determinados y asociarlos con variables de interés, aportar a estudios de taxonomía, elucidar patrones de resistencia a antimicrobianos, entre otras disímiles cuestiones de interés.

El tratamiento antimicrobiano efectivo de la sífilis, dada la ausencia de vacunas disponibles, constituye un elemento clave en los programas de control de la enfermedad. De acuerdo a las Guías de Tratamiento para Enfermedades de Transmisión Sexual de los CDC (12), el tratamiento de primera línea para la sífilis temprana y no complicada en adultos es la penicilina benzatínica G administrada intramuscularmente en dosis única de 2,4 millones de unidades. Este antimicrobiano ha resultado seguro para el tratamiento de la sífilis desde su primera utilización, y en consecuencia no se reportan casos clínicos de fallas terapéuticas al tratamiento con penicilina (13-15).

Existen tratamientos alternativos o de segunda línea para pacientes alérgicos a la penicilina (exceptuando embarazadas a las que se debe desensibilizar), que dado su carácter oral resultan cada vez más atractivos; estos son los macrólidos (fundamentalmente eritromicina y azitromicina) y las tetraciclinas (tetraciclina y doxiciclina). En el contexto mundial, se reporta cada vez con mayor frecuencia la circulación de aislados de TPA resistentes a los macrólidos (13), este fenómeno está sustentado en una transición de adenina a guanina en las posiciones conocidas como A2058 y A2059 del gen ADN ribosomal (ADNr) 23S en el genoma de *Escherichia coli* (16). La justificación más plausible de la circulación incrementada de aislados resistentes en determinados países, descansa en el abuso indiscriminado de macrólidos (fundamentalmente azitromicina) para el tratamiento de la sífilis y otras

infecciones no relacionadas. Este aspecto incide sobre la selección de aquellos aislados mutantes (resistentes) lo que permite su posterior diseminación y establecimiento (13).

Con relación a la respuesta de TPA a las tetraciclinas, no existen estudios concluyentes que aborden el tema. Sin embargo, consta ya un reporte en la literatura científica de fallas serológicas al tratamiento con doxiciclina (derivado de la tetraciclina con mejor biodisponibilidad) en pacientes daneses (17). También se describe asociación entre la presencia de mutaciones puntuales en el gen que codifica la subunidad ribosomal 16S (ARNr 16S) y la resistencia a tetraciclinas en bacterias como *Helicobacter pylori* y *Propionibacterium* spp. (18, 19), pero no existen evidencias de estas mutaciones en TPA. Dada la carencia de hallazgos sobre mecanismos de transferencia horizontal de genes en TPA, se cree que de aparecer resistencia a tetraciclinas, pudiera ser debido a este tipo de mutaciones puntuales (20).

En Cuba se ha informado un incremento notable de la incidencia de la sífilis (por 100 000 habitantes) en los últimos 10 años con cifras que se elevan desde 14,1 en 2008 hasta 45,2 en 2017 (21), lo que demuestra la problemática nacional que actualmente representa esta infección de transmisión sexual (ITS). Se ha constatado además que, en Cuba:

- i.) Para el diagnóstico de la sífilis se carece de herramientas moleculares bien establecidas que posibiliten la detección temprana de la infección en pacientes con lesiones ulceradas, y que permitan el conocimiento de la frecuencia de esta ITS.
- ii.) Como archipiélago caribeño, posee un gran atractivo desde el punto de vista turístico, lo que unido a las colaboraciones internacionales y a las prácticas de sexo transaccional, implican diversidad de relaciones sexuales y diversidad de patógenos transmisibles por esta vía, por lo que el desconocimiento de la circulación genética de TPA mediante la caracterización molecular del agente impide un mejor entendimiento de su epidemiología con la consecuente dificultad en la toma de medidas para su control en el país.
- iii.) Existe en la actualidad abuso en el uso de macrólidos (fundamentalmente azitromicina) para el tratamiento no solo de la sífilis sino para una gama amplia de infecciones (comunicación personal de dermatólogos y médicos de asistencia), por lo que la selección y

circulación de aislados de TPA resistentes a macrólidos en el país es un fenómeno probable y su conocimiento es de trascendental interés para las autoridades de Salud Pública.

Por ello, surge la necesidad de implementar el diagnóstico molecular, la caracterización genética y la detección de mecanismos de resistencia microbiana en TPA en muestras de pacientes cubanos con sospechas clínicas de sífilis.

1.2 Hipótesis

Treponema pallidum subsp. *pallidum* se presenta con frecuencia elevada como agente infeccioso causante de lesiones ulceradas en individuos cubanos con conductas sexuales de riesgo y posee una diversidad genética elevada con marcadores de resistencia a los macrólidos y las tetraciclinas.

1.3 Objetivos

1. Determinar la frecuencia de infección por *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* en individuos cubanos con lesiones ulceradas sugerentes de una infección de transmisión sexual, y su asociación con variables clínico-epidemiológicas de interés.
2. Identificar los subtipos/genotipos de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* y sus relaciones filogenéticas en los pacientes estudiados.
3. Identificar determinantes genéticos de resistencia a macrólidos y tetraciclinas en aislados cubanos de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*.

1.4 Novedad científica

La novedad científica de la presente investigación descansa en que la misma:

- Muestra las primeras evidencias moleculares de la circulación de *T. pallidum* en pacientes con lesiones ulceradas en Cuba.

- Describe por primera vez la distribución de subtipos/genotipos de TPA en Cuba y sus relaciones filogenéticas, lo que ofrece aportes importantes a la epidemiología molecular y a la genómica de los treponemas patógenos.
- Aporta al conocimiento de las treponematosis endémicas, especialmente a la distribución geográfica, modo de transmisión y presentación clínica de bejel o sífilis endémica.
- Da a conocer la presencia de mutaciones en TPA que confieren resistencia a los macrólidos y la ausencia de otras asociadas previamente con resistencia a las tetraciclinas en bacterias patógenas.

1.5 Valor teórico

Este documento posee la información relacionada con los primeros estudios moleculares de la infección por *T. pallidum* en Cuba, que incluye:

- Los resultados de la aplicación de herramientas moleculares novedosas para la detección, caracterización molecular y determinación de mutaciones de resistencia a antimicrobianos de *T. pallidum* en muestras de pacientes con sospecha clínica y epidemiológica de sífilis temprana.
- Las evidencias moleculares de la circulación de *T. pallidum* en pacientes cubanos con lesiones ulceradas sugerentes de sífilis.
- El diseño, evaluación y aplicación de métodos de caracterización molecular para la diferenciación de las subespecies de *T. pallidum* y entre aislados de TPA.
- Las primeras evidencias de los genotipos de TPA que circulan en Cuba y de la circulación del agente causal de bejel en pacientes con sospechas clínicas y epidemiológicas de sífilis venérea.
- Los resultados de los primeros estudios moleculares sobre la presencia de marcadores de resistencia a los antimicrobianos de segunda línea en *T. pallidum* que infecta pacientes cubanos.

Las publicaciones sobre el tema de tesis en revistas internacionales de impacto [5] y nacionales [1], la participación en eventos científicos [6], la impartición sistemática de cursos de postgrado (residencia médica en Microbiología y maestría en Bacteriología-Micología), la presentación y aprobación de dos Resultados Relevantes Institucionales, un Premio Anual de Salud a nivel central y mención a nivel nacional (2017) así como la realización de tesis [2] han permitido dar divulgación a los resultados de esta investigación. Lo anterior ha propiciado un incremento del pensamiento clínico sobre la sífilis en médicos de asistencia con el consiguiente acrecentamiento en el flujo de muestras al Laboratorio Nacional de Referencia de Treponemas y Patógenos Especiales del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (LNRTPE-IPK) para estudios moleculares de treponemas patógenos. Además, estas investigaciones han ofrecido información basada en evidencias científicas a las autoridades de Salud Pública de Cuba para la modificación de las guías nacionales de tratamiento de la sífilis y ha aportado nuevos conocimientos en la genómica de los treponemas patógenos que proveen a la comunidad científica internacional de elementos útiles para futuras investigaciones en este campo.

1.6 Valor práctico

La tesis posee además importantes aportes prácticos que se mencionan a continuación:

- Se implementa por primera vez en Cuba, a nivel de LNRTPE-IPK el diagnóstico molecular de la sífilis en pacientes con lesiones ulceradas.
- El LNRTPE-IPK cuenta además con sistemas moleculares para la caracterización y clasificación exhaustiva de los treponemas patógenos y con herramientas moleculares para la detección de mutaciones de resistencia en *T. pallidum* a los antimicrobianos de segunda línea.
- La elevada circulación de aislados de TPA resistentes a los macrólidos representa una alerta para las autoridades nacionales de Salud Pública.
- Los resultados de la presente investigación constituyen la base para investigaciones moleculares más profundas en el campo de las treponematosis.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Treponema pallidum subsp. pallidum

La sífilis es una ITS causada por TPA, una espiroqueta que responde como negativa a la tinción de Gram, tiene una apariencia espirilar delgada y es observable solo por microscopía de campo oscuro debido a sus pequeñas dimensiones de 0,5 μm de ancho y de 10 a 15 μm de longitud. Presenta entre cuatro a 14 vueltas de espiras de igual tamaño, espaciadas por una distancia de 1 μm , que aumentan en periodicidad y disminuyen en amplitud hacia los extremos, dando a la célula una forma afilada (como un sacacorchos invertido). Por lo regular, el eje largo de la espiral es recto, pero a veces puede estar inclinado, dándole en algunos momentos la forma de un círculo completo y después retorna a su posición recta normal (22). El citoplasma está rodeado por una membrana trilaminar, una capa de peptidoglucano, una capa interna delicada de mucopéptido conocida como periplasto, una membrana lipoproteica externa que contiene lipopolisacáridos y una membrana externa rica en fosfolípidos que contiene relativamente pocas proteínas de superficie expuestas. En los extremos se insertan flagelos periplásmicos que les permite un movimiento rotatorio y ondulado sobre el eje central de la bacteria (23).

Comparado con otras bacterias Gram-negativas, la membrana externa de los treponemas carece de lipopolisacáridos (LPS) lo que confiere fragilidad celular y dificulta el manejo de estas bacterias en el ambiente extrahospedero. Además, las lipoproteínas debajo de la superficie de la membrana externa son abundantes y activan macrófagos y células dendríticas a través de vías de señalización dependientes de receptores Toll-like, esto ayuda a TPA a escapar de la respuesta inmune del hospedero y a persistir en el mismo por varios años (22).

Es considerado un microorganismo microaerófilo con un tiempo de generación demorado (30-33 horas), capaz de sobrevivir en una atmósfera de oxígeno de tres a 5 %, por largos periodos. TPA, hasta el momento no es cultivable *in vitro* a pesar de los disímiles ensayos para su cultivo (24-28). Recientemente se reportó un primer intento parcialmente exitoso de cultivo *in vitro* por investigadores de la Universidad de Texas (29) que marca el comienzo de una larga carrera en busca de la mantención de este patógeno en el laboratorio fuera de los testículos de conejo, siendo este último método de propagación de treponemas en animales de laboratorio laborioso y con una frecuencia limitada de recuperación bacteriana (30).

La viabilidad de TPA varía de acuerdo a las condiciones del ambiente a las que se expone; por ejemplo, en sangre total o plasma almacenado a 4°C mantiene su viabilidad al menos por 24 horas, en presencia de sustancias reductoras y en una suspensión líquida apropiada manifiesta movilidad en un periodo de tres a seis días a 25°C. Si se mantiene fuera del hospedero en un lugar oscuro y húmedo, no sobrevive más de dos horas. Además, debido a sus características de bacteria fastidiosa se considera un patógeno obligado altamente invasivo, persistente y con una limitada actividad toxigénica (22).

2.2 Taxonomía

El género *Treponema* (Phylum Spirochaetes, Clase Spirochaetes, Orden Spirochetales y Familia Spirochaetaceae) está compuesto por bacterias patógenas y no patógenas distribuidas en un amplio rango de hospederos humanos y animales o de vida libre en ambientes extrahospederos (31).

Los treponemas patógenos a su vez se componen por miembros cultivables y no cultivables. Los treponemas cultivables están involucrados en varias enfermedades como las infecciones periodontales humanas (ej. *T. denticola*, *T. vincentii*, *T. amylovorum*, *T. medium*, *T. socranskii*) o las dermatitis digitales en bovinos (ej. *T. brennaborensis*, *T. pedis*). Por su parte, los treponemas no cultivables representan especies y subespecies bacterianas con carácter de patógenos obligados que causan enfermedades definidas en humanos, ellos son TPA, *T. pallidum* subsp. *pertenue* (TPE) que causa el pian o frambesia,

T. pallidum subsp. *endemicum* (TEN) agente etiológico de bejel o sífilis endémica y *T. carateum* que provoca la pinta o mal del pinto (32).

2.3 Características genómicas y capacidad de sobrevivencia

El genoma de TPA está contenido en un único cromosoma circular que comprende 1,14 Mb y contiene 1041 ORF que representan 92,9 % del ADN genómico total, de los cuales 55 % codifica proteínas conocidas (4).

TPA está considerada como una bacteria monomórfica (33) en la que no hay evidencias de islas de patogenicidad, plásmidos, fagos u otros vectores de transferencia horizontal de genes. Sin embargo, los estudios de genómica comparativa en cepas de *T. pallidum* revelaron la presencia de genes mosaicos (4, 34-36), los que resultaron de eventos de recombinación en el ADN treponémico. Además, se han determinado subpoblaciones genéticamente distintas de TPA (heterogeneidad intra-aislado) infectando un mismo hospedero (37-39).

Las subespecies de *T. pallidum* tienen un alto grado de similitud de secuencias nucleotídicas (99,8 %); sin embargo, los estudios de genómica comparativa justifican que las diferencias existentes confieren a estos microorganismos la capacidad de producir enfermedades distintas (33).

TPA contiene uno de los genomas más pequeños en procariontes lo que, entre otros aspectos, limita a este patógeno de actividad metabólica. Por ejemplo, el genoma de TPA carece de genes que codifican las enzimas involucradas en el ciclo de Krebs, las vías de fosforilación oxidativa y la beta-oxidación; por tanto su única vía de obtención de energía en forma de trifosfato de adenosina (ATP, del inglés “Adenosine triphosphate”) es a través de la fosforilación a nivel de sustrato y como resultado, solo se pueden producir dos ATP a partir de una molécula de glucosa (en comparación con 38 ATP para *E. coli*) (40). Lo anterior explica en parte el tiempo de generación lento de TPA (41). El genoma de TPA también carece de genes que codifican proteínas requeridas para la síntesis *de novo* de cofactores, nucleótidos y ácidos grasos, elementos que son esenciales para el crecimiento microbiano y que deben ser incorporados del hospedero (42).

Otro factor limitante para el crecimiento de TPA es su relación inestable con el oxígeno. Esto se explica por la ausencia de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa de depuración de radicales libres de oxígeno, lo que incapacita a TPA para hacer frente al estrés oxidativo (43).

2.4 Patogenia

En contraste a la capacidad metabólica reducida de TPA, este microorganismo es exitoso como patógeno humano lo que se denota por la dosis infectiva mínima (10 células o incluso menos) (44).

TPA es capaz de atravesar rápidamente las mucosas íntegras o las erosiones microscópicas de la piel y en pocas horas penetra en los vasos linfáticos y en la sangre produciendo una infección generalizada con focos metastásicos alejados antes de que aparezca la lesión primaria en el sitio de entrada de la bacteria (2).

El examen histológico de la lesión primaria o chancro sifilítico muestra una infiltración perivascular formada fundamentalmente por linfocitos (incluidas las células CD4⁺ y CD8⁺), células plasmáticas y macrófagos, junto a una proliferación del endotelio capilar que va seguida de oclusión de los vasos sanguíneos pequeños. La infiltración celular ofrece un perfil de citocinas del tipo Th1 (del inglés, “T helper 1”), congruente con la activación de los macrófagos (45). En este momento, se puede demostrar en el chancro la presencia de TPA en los espacios intercelulares de los elementos epiteliales, en las invaginaciones o fagosomas de las células epiteliales, los fibroblastos, las células plasmáticas y las células endoteliales de los capilares pequeños, en el interior de los conductos linfáticos y en los ganglios linfáticos regionales. Pasadas varias semanas desde la aparición del chancro, los microorganismos son fagocitados y destruidos por los macrófagos activados, lo que produce la desaparición espontánea de la lesión ulcerada (46).

La diseminación de TPA por vía sanguínea y linfática hace que aparezcan, de seis a ocho semanas después de desaparecer el chancro, manifestaciones generales parenquimatosas y mucocutáneas. Los signos histopatológicos de las lesiones cutáneas maculopapulosas son: hiperqueratosis de la epidermis, proliferación capilar con tumefacción endotelial en el

corion superficial y afluencia de leucocitos polimorfonucleares en las papilas dérmicas. En el corion profundo, los treponemas se encuentran en disímiles tejidos, incluidos el humor acuoso y el líquido cefalorraquídeo (LCR) (47). La invasión del sistema nervioso central (SNC) por TPA se produce en las primeras semanas o meses de la infección, y hasta 40 % de los pacientes muestran alteraciones de la composición del LCR (48). Las manifestaciones clínicas de hepatitis y de glomerulonefritis membranosa inducida por inmunocomplejos son bastante raras pero bien conocidas en este momento de la infección (49).

Después de algunos años de la infección inicial por TPA, este comienza a invadir órganos y a causar distintas lesiones en los mismos. Dicho estadio se caracteriza por manifestaciones cutáneas o viscerales, sobre todo cardiovasculares y nerviosas, dado por una alteración del equilibrio entre el patógeno y los mecanismos de defensa establecidos, o por la alteración de la inmunidad celular asociada con la edad (50).

TPA se considera como un patógeno bien adaptado al organismo humano y la incapacidad para la supervivencia libre del hospedero, lo compensa en virulencia. A diferencia de muchas infecciones bacterianas, su éxito se define mejor por la invasión y la evasión inmune que por un fuerte efecto citotóxico (51).

En ensayos de infección con TPA a varios cultivos o tejidos celulares, incluidos capilares de conejo y células musculares, se demostró que los treponemas tienen efecto citopático solo cuando están presentes en concentraciones elevadas. Por el contrario, en un número bajo, causan pocos o ningún cambio, por lo que el daño tisular observado durante la infección clínica parece estar mediado predominantemente por la respuesta inflamatoria del hospedero (1).

En un experimento en conejos, se detectó el ADN de TPA en el plasma dentro de las 24 horas posteriores a la inyección intra-testicular de 10^6 organismos, y luego se observó un aumento constante en la concentración bacteriana hasta los 10 días (41). Cuando se extrajeron órganos de los mismos animales entre 10 y 14 días después de la infección, se detectó ADN en cerebro, riñones, hígado y bazo. Una vez diseminados, los treponemas

están sujetos a un aclaramiento inmunológico; sin embargo, se ha demostrado la persistencia en una variedad de nichos (haces de colágeno, músculos erectores, nervios) y se cree que este fenómeno contribuye a la evasión y la latencia inmunes (52).

2.5 Características generales de la sífilis

La evolución natural de la sífilis se divide clásicamente en las siguientes fases: i.) un periodo de incubación que dura aproximadamente tres semanas aunque puede variar de tres a 90 días (2); ii.) un estadio primario caracterizado por una lesión cutánea no dolorosa conocida como chancro que se suele asociar a una adenopatía regional y bacteriemia temprana; iii.) un estadio secundario o periodo florido, diseminado o bacteriémico acompañado por un exantema cutáneo generalizado, lesiones mucocutáneas, adenopatías y hallazgos clínicos variables; iv.) un periodo de infección subclínica (sífilis latente) detectado exclusivamente por pruebas serológicas y v.) un estadio terciario o tardío caracterizado por la progresión de la enfermedad que afecta principalmente a la aorta ascendente, al SNC o a ambos, incluyendo anormalidades oftálmicas o auditivas. En ocasiones se desarrolla una lesión de tipo granulomatosa conocida como goma, que puede afectar prácticamente a cualquier órgano (53).

2.5.1 Sífilis primaria

Tras el periodo de incubación aparece la lesión primaria o chancro inicial que se desarrolla en el lugar de inoculación de TPA. Estas lesiones usualmente aparecen en forma de pápula única, después se erosionan para convertirse en una úlcera de base lisa, indurada, no exudativa y poco o nada dolorosa (aunque algo sensible al tacto), con bordes sobre elevados. Un aspecto característico de la lesión clínica es que apenas presenta sangrado cuando se raspa la úlcera. Los genitales externos son los lugares más frecuentes donde aparece la lesión indurada, seguidos del cuello uterino, boca, área perianal, conducto anal, entre otros. En los pacientes inmunodeprimidos pueden aparecer lesiones múltiples, especialmente en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (2).

Las variaciones en la presentación clínica dependen del número de treponemas infectantes, del estado inmune del paciente, del tratamiento con antimicrobianos y de si la lesión sufre una infección secundaria (54). En la mayoría de los pacientes se desarrollan linfadenopatías regionales entre una y dos semanas después de la aparición del chancro, consistente en un aumento moderado de un ganglio linfático, que no es supurativo, y que representa un foco local para la proliferación de las espiroquetas. El hecho de que la úlcera se cure de manera espontánea, sin lesión residual, a lo largo de los dos meses siguientes proporciona al paciente una sensación de falso alivio (53).

2.5.2 Sífilis secundaria

Esta es la etapa donde confluye el mayor número de manifestaciones clínicas. Se caracteriza por la presencia de lesiones cutáneo mucosas, circunscritas o difusas no ulceradas, que aparecen de seis a ocho semanas después de iniciado el chancro y tienen una distribución simétrica en tronco y extremidades. La localización en palmas de las manos y plantas de los pies sugiere el diagnóstico de la infección. Es válido señalar que en 15 % de los enfermos persiste el chancro primario en fase de cicatrización, y a menudo hay superposición de fases, fundamentalmente en individuos coinfectados con VIH (55).

En esta fase de la enfermedad puede aparecer alopecia, fundamentalmente en cuero cabelludo y cola de las cejas. En las zonas calientes, húmedas e intertrigosas del cuerpo, como la región perianal, vulva, escroto, parte interna de los muslos, axila y la piel situada bajo las mamas, las pápulas pueden aumentar de tamaño y sufrir erosiones que dan lugar a lesiones exantemáticas, húmedas, rosadas o blanco grisáceas y muy contagiosas llamadas condilomas planos (56).

Sugieren sífilis secundaria también signos oculares tales como alteraciones pupilares no atribuibles a otra causa, nefritis óptica, retinitis pigmentaria, así como la clásica iritis o uveítis (57).

2.5.3 Sífilis latente

La sífilis latente se divide en dos etapas: la sífilis latente precoz y la sífilis latente tardía; la línea divisoria entre ambas se fija en el año posterior a la fecha en que se contrajo la enfermedad. No obstante, hay que tener en cuenta que a menudo es imposible determinar la duración exacta de la infección sin tratar y que tales casos deben clasificarse en principio como sífilis latente tardía. Durante los periodos de latencia de la enfermedad, no hay ninguna lesión cutánea o mucosa de la que se puedan obtener muestras, por lo que el diagnóstico debe basarse en los resultados de las pruebas serológicas y en la ausencia de signos y síntomas de sífilis terciaria (58).

2.5.4 Sífilis tardía (terciaria)

Más de un tercio de los pacientes no tratados pueden evolucionar a una fase tardía o terciaria de la sífilis, en la que se pueden afectar prácticamente todos los tejidos. Esta ocurre trascurridos varios años (seis a ocho como promedio) de la enfermedad. Cursa con manifestaciones clínicas aparentes o inaparentes y su base patológica son las alteraciones en los vasos sanguíneos (específicamente los *vasa vasorum*) y las lesiones características denominadas gomas. La inflamación difusa y crónica que caracteriza a la sífilis terciaria puede producir una gran destrucción de casi cualquier órgano o tejido, pudiendo ocasionar: arteritis, demencia, ceguera y lesiones granulomatosas que se pueden encontrar en huesos, piel y otros tejidos (2).

2.6 Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de la sífilis es un tópico controversial a nivel mundial ya que las manifestaciones clínicas de esta ITS son muy diversas y pueden confundirse con otras enfermedades infecciosas y no infecciosas, lo que hace su reconocimiento clínico un reto para los médicos de asistencia. Además, el diagnóstico de laboratorio que constituye un elemento determinante para la confirmación de la enfermedad, está sujeto en la actualidad a continuos debates debido a la falta de sensibilidad diagnóstica de determinadas pruebas en las distintas fases de la infección (59).

Para la realización de un diagnóstico certero de esta ITS deben cumplirse dos de los tres criterios siguientes: i.) manifestaciones clínicas sugerentes de la enfermedad, ii.) el riesgo epidemiológico y iii.) la confirmación por el laboratorio. De estos tres criterios la confirmación por el laboratorio es obligatoria para ofrecer el diagnóstico final (60).

Debido al carácter multietapa de la sífilis, un aspecto importante para el diagnóstico de laboratorio es el tipo de muestra a estudiar según los diferentes estadios clínicos de la infección. Dentro de las muestras clínicas útiles se reportan la linfa de lesiones primarias, suero, LCR, líquido amniótico, así como las biopsias de las lesiones secundarias. Se pueden tomar otras muestras como sangre periférica, los granulocitos purificados y el semen de los pacientes con sífilis (7).

Las pruebas de laboratorio se dividen en dos categorías, las pruebas de diagnóstico indirectas y pruebas de diagnóstico directas.

2.6.1 Diagnóstico indirecto

Debido a que no se ha logrado el cultivo *in vitro* de TPA y a que las herramientas moleculares no están accesibles a todos los laboratorios, el diagnóstico indirecto o serológico continúa teniendo gran importancia en la actualidad. Este tipo de diagnóstico agrupa a pruebas serológicas que se clasifican en treponémicas y no treponémicas, diferenciadas así a partir del tipo de antígeno que utilizan y los anticuerpos a detectar (59).

2.6.1.1 Pruebas no treponémicas

Estas pruebas detectan anticuerpos reagínicos y no son exclusivas para la sífilis por lo que en ocasiones pueden producirse reacciones falsas positivas (61). En ellas se utiliza como antígeno la cardiolipina purificada, extraída del corazón de buey. La cardiolipina es un fosfatidilglicerol que reacciona con la reagina que a su vez está constituida por una mezcla de anticuerpos IgM e IgG capaces de reaccionar contra antígenos distribuidos en los tejidos. Las reaginas se encuentran en el suero del paciente a partir de la segunda o la tercera semana del inicio de la enfermedad no tratada y en el LCR entre la cuarta y la octava semana (62).

Entre las pruebas no treponémicas se encuentran: la VDRL (del inglés, “Venereal Disease Research Laboratory”) y la RPR (del inglés, “Rapid Plasma Reagin”).

Las pruebas VDRL y RPR se caracterizan por su fácil realización y control, permiten la cuantificación de los anticuerpos séricos, se caracterizan por una adecuada sensibilidad y una moderada especificidad por lo que siempre es necesario la confirmación por otro método de mayor especificidad que detecte anticuerpos treponémicos. El título sérico refleja el grado de evolución de la enfermedad y en la sífilis inicial puede observarse un incremento al cuádruple o mayor del título. Una disminución de dos diluciones o más, tras el tratamiento de la sífilis es indicativo de una respuesta adecuada al mismo (63).

2.6.1.2 Pruebas treponémicas

Estas pruebas a diferencia de las anteriores se mantienen reactivas durante años o de por vida, incluso si el paciente fue tratado adecuadamente. Se basan en la utilización de la bacteria TPA como antígeno para detectar anticuerpos contra componentes celulares. Las pruebas treponémicas incluyen a la prueba de absorción de anticuerpos fluorescentes contra TPA, la hemaglutinación y microhemaglutinación para anticuerpos contra TPA, las pruebas inmunoenzimáticas y las pruebas rápidas basadas en tiras inmunocromatográficas con proteínas treponémicas fijadas (64).

Las pruebas rápidas, aunque carecen del carácter de confirmación, se han destacado en los últimos años por la buena correlación con las pruebas confirmatorias, su sencillez, su versatilidad ya que pueden llevarse a cabo fuera del entorno del laboratorio con una mínima capacitación del personal, sin un equipo especializado y por la fácil interpretación de los resultados. En cambio tienen la desventaja, como prueba treponémica, de no poder distinguir entre una infección activa y una anterior por lo que requieren de la confirmación mediante las pruebas no treponémicas (65).

2.6.2 Diagnóstico directo

2.6.2.1 Examen microscópico en campo oscuro

El examen microscópico en campo oscuro es fundamental para evaluar las lesiones ulceradas que aparecen durante la sífilis primaria o los condilomas planos de la sífilis secundaria. Para la toma de la muestra se exprime la lesión hasta la expulsión de un exudado seroso (linfa) que se coloca en la superficie de un portaobjetos y se observa la presencia de TPA con microscopio de campo oscuro o de contraste de fases. No se recomienda el diagnóstico de lesiones orales y úlceras anales con este método porque es difícil diferenciar TPA de otros treponemas que pueden estar presentes en estas cavidades (59, 66).

Una prueba negativa no excluye la posibilidad de sífilis debido a la sensibilidad limitada de esta técnica. Para lograr la visualización del patógeno es necesario que en la muestra haya al menos 10^4 treponemas. Además, el uso previo de antisépticos tópicos o del lavado realizado por el paciente puede alterar los resultados (67).

2.6.2.2 Inmunofluorescencia directa

La prueba de anticuerpos fluorescentes directos a TPA, puede llevarse a cabo utilizando un anticuerpo policlonal antitreponémico conjugado con fluoresceína para la detección de TPA en frotis desecados obtenidos de lesiones orales, rectales o intestinales. Esta técnica altamente sensible detecta y diferencia a los treponemas patógenos de los no patógenos mediante una reacción antígeno-anticuerpo, no requiriendo de la presencia del microorganismo móvil para su realización (68).

2.6.2.3 Inoculación en animales de laboratorio

Ante la ausencia de métodos de cultivo bacteriano, la inoculación intratesticular de TPA en conejos está considerada como la prueba de referencia para el diagnóstico de la sífilis. Es el único método que en la actualidad permite la recuperación de la bacteria y su mantención en las condiciones del laboratorio mediante subcultivos sucesivos en el animal. No se utiliza de rutina por su costo elevado, la necesidad de personal altamente entrenado para

estas funciones y la limitada capacidad de recuperación de los treponemas a partir de muestras clínicas (30).

2.6.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa

Dadas las limitaciones de los métodos serológicos disponibles, el diagnóstico de la sífilis en ocasiones suele carecer de sensibilidad y especificidad. En este contexto, se ha planteado el uso de las técnicas de amplificación de los ácidos nucleicos (basadas en la PCR para la detección de ADN de TPA), sobre todo en etapas tempranas de la infección donde la bacteria se encuentra concentrada en las lesiones ulceradas (69, 70).

La técnica de PCR amplifica o replica varias veces secuencias específicas de ADN de un patógeno a partir de la muestra clínica. Se utilizan dos secuencias cortas de ADN denominadas cebadores o “primers”, que son oligonucleótidos sintéticos de ADN de secuencia nucleotídica conocida. Los cebadores se fusionan a un ADN complementario y actúan como una plantilla para sintetizar ADN nuevo, proceso enzimático que se repite en varios ciclos térmicos (71).

En la literatura se reportan dos genes dianas como los de mayor utilización para la confirmación de la sífilis: el gen *tpp47* que codifica la proteína de membrana externa de 47 kDa y el gen *polA* que codifica la ADN polimerasa I (72). La PCR (*polA*) ha sido evaluada en la práctica clínica con muy buenos resultados para la confirmación de sífilis temprana cuando se comparó con otros genes dianas (73-75). Sin embargo, según un meta-análisis reciente donde se compararon las PCR (*polA*) y PCR (*tpp47*), se verificó que podían ser utilizadas indistintamente para la confirmación de la infección (76).

Se han descrito distintas variantes de la técnica de PCR, tales como la PCR en tiempo real (RT-PCR, del inglés “Real-time PCR”) y la PCR anidada para muestras de lesiones ulceradas, sangre, suero, LCR, entre otras (77, 78); así como la PCR múltiple que permite detectar y diferenciar en lesiones ulceradas *Haemophilus ducrey*, TPA, *Chlamydia trachomatis* y el virus Herpes Simple tipo 1 y 2 (79).

Las técnicas de biología molecular se muestran cada vez más atractivas en el diagnóstico directo de la infección temprana por TPA y tal es así, que en la reciente definición de caso de sífilis propuesta por los CDC solo la positividad por PCR define un caso confirmado de esta ITS mientras que los resultados serológicos marcan el caso como probable (80). Por el momento, son limitadas las casas comerciales que proponen metodologías de PCR evaluadas para su inserción directa en los laboratorios, y la tendencia ha sido el desarrollo y validación de pruebas de PCR en cada laboratorio para su posterior uso bajo las condiciones preestablecidas durante la validación (8, 74, 75, 81, 82).

2.7 Caracterización molecular de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*

En la actualidad, se reconocen dos sistemas de caracterización molecular de TPA, el propuesto por investigadores de los CDC (83) y posteriormente modificado por Marra y colaboradores (9), que constituye el de mayor utilización mundial con más de 3000 muestras clínicas estudiadas, y el método propuesto recientemente por investigadores europeos basado en la utilización de MLSA (10).

2.7.1 Identificación de subtipos de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* mediante el método propuesto por los CDC

En 1998, investigadores de los CDC publicaron el primer método molecular para diferenciar entre subtipos de TPA (83). El método está basado en la determinación del número de repeticiones de un fragmento de 60 pb en el gen *arp* y las diferencias en las secuencias de los genes *tpr* de TPA (*tprE*, *tprG* y *tprJ*), determinado por polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP del inglés, “Restriction Fragment Length Polymorphisms”). Este método permite la clasificación de TPA mediante la combinación de un número (según el *locus arp*) y una letra (de acuerdo al *locus tpr*).

En el año 2010, Marra y su grupo, propusieron el análisis adicional de un fragmento de 80 pb de la secuencia génica TP0548 (9). A cada secuencia TP0548 identificada se le asignó una letra que se colocó al final del subtipo previamente definido, por tanto en este punto se definió el subtipo como la combinación de un número con dos letras (ej. 14d/g).

Mediante la utilización de este método de subtipificación con o sin el análisis de la secuencia TP0548, se han descrito varias epidemias de sífilis en los EUA (9), Escocia (84), Sudáfrica (85), China (86), Taiwán (87), Australia (88), Canadá (89), Dinamarca (90), entre otras.

Si bien predominan ciertos subtipos, en particular 14d/g y 14f/g, en ninguna de las epidemias caracterizadas se detectó una única cepa circulando. De esta manera, se ha podido asociar la presencia de subtipos de TPA con determinadas variables clínico-epidemiológicas en los pacientes estudiados. Por ejemplo, en EUA se identificó la asociación de pacientes infectados con el subtipo 14f/g con la presencia de neurosífilis (9) y con mutaciones en el patógeno que confieren resistencia a los macrólidos (88). Además, se ha asociado este subtipo con pacientes seropositivos al VIH (91) y con un riesgo incrementado de la condición de sero-resistencia en pacientes con sífilis tratada (92).

2.7.2 Identificación de genotipos de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* mediante el método de análisis de secuencias multi-locus

Recientemente, investigadores de la Universidad Masaryk (República Checa) publicaron un sistema de caracterización molecular de TPA basado en la amplificación por PCR anidada, seguido de secuenciación nucleotídica por el método de Sanger de los *loci* TP0136, TP0548 y TP0705 (10). A diferencia del protocolo de caracterización propuesto por los CDC, el diseño del protocolo MLSA se sustentó en el análisis de genomas provenientes de aislados clínicos de TPA contemporáneos, lo que denota una mejor aproximación del sistema de caracterización a la epidemiología actual de la sífilis.

Este sistema ha demostrado preliminarmente un elevado grado de robustez y poder de discriminación. Solamente en Francia y Suiza se ha aplicado el sistema a 120 muestras clínicas humanas y en 90 de ellas en las que se logró la caracterización completa, se determinaron 27 genotipos (10).

El MLSA ofrece también la posibilidad de construcción de árboles o redes filogenéticas utilizando las secuencias génicas de los genotipos circulantes, lo que ayuda a una mejor elucidación de los patrones de circulación y redes de transmisión de TPA. Además, el

MLSA permite la agrupación de TPA en dos grupos genéticos, SS14-like (parecidos a SS14) y Nichols-like (parecidos a Nichols), de acuerdo al grado de similitud de los *loci* analizados con relación a los de las cepas de referencia TPA SS14 (Código de acceso en GenBank: CP004011.2) y TPA Nichols (Código de acceso en GenBank: CP004010.2).

De 1989 aislados contemporáneos de TPA a partir de muestras clínicas, solo 117 (5,9 %) pertenecieron al grupo Nichols-like mientras 94,1 % restante correspondió al grupo SS14-like (93). Lo anterior es sorprendente ya que la mayoría de las cepas de TPA aisladas y mantenidas en conejos de laboratorio son del grupo Nichols-like (94); sin embargo, la mayor parte de estas cepas que se mantienen en el laboratorio fueron aisladas el siglo pasado.

El MLSA permite además la clasificación entre subespecies de *T. pallidum*, lo que resulta de interés sobre todo en aquellas zonas geográficas donde co-circulan TPA, TPE y TEN (10). Un ejemplo interesante lo constituye un estudio reciente donde se determinó la presencia de TEN en un paciente francés que regresaba de Pakistán (zona donde se reconoce a bejel como infección endémica) y que refirió tener relaciones sexuales desprotegidas con una trabajadora comercial del sexo (95).

2.8 Tratamiento antimicrobiano

Desde el año 1940 con el advenimiento de la penicilina, esta se ha usado para el tratamiento de la sífilis, persistiendo como antimicrobiano de elección en todos sus estadios clínicos sin reportes de casos de fallas clínicas al tratamiento (15). Sin embargo, debido a que existen pacientes alérgicos a la penicilina o que no eligen su administración por vía parenteral, se ha estimulado la búsqueda de terapias alternativas. Actualmente, se reconocen a las tetraciclinas y los macrólidos, dado su carácter oral, como antimicrobianos alternativos atractivos para el tratamiento de la sífilis (13).

2.8.1 Resistencia de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* a los macrólidos

La facilidad de administración y la larga vida media de la azitromicina (macrólido), sugirió que una sola dosis del antimicrobiano podría ser una alternativa adecuada para el

tratamiento de la sífilis (96). Sin embargo, en los últimos años se han reportado cada vez con mayor frecuencia fracasos al tratamiento con macrólidos asociados a la presencia en TPA de las mutaciones A2058G y A2059G en el ADNr 23S, que alteran el sitio diana (región peptidiltransferasa en el dominio V del ARNr 23S) de este grupo de antimicrobianos, resultando en la imposibilidad de unión del antibiótico al ribosoma (88, 97-101).

Las tasas en la frecuencia de aislados de TPA resistentes a macrólidos son variables, con cifras que pueden alcanzar hasta 100 % en algunas localidades de China (102), y esencialmente están determinadas por las políticas de tratamiento con antimicrobianos establecidas por cada país. De esta manera, el uso y abuso de los macrólidos ha impuesto una presión selectiva del antimicrobiano a las bacterias con las mutaciones en determinadas zonas geográficas, lo que ha permitido su establecimiento y diseminación (13).

Por todo ello, como alternativa terapéutica, las guías actuales recomiendan: ante un contagio inferior a un año (sífilis primaria, secundaria y estadios precoces de sífilis latente) el tratamiento con doxiciclina 100 mg cada 12 horas, vía oral durante 14 días (prolongando el tratamiento hasta 28 días en caso de sífilis latente en fases precoces), ceftriaxona 1 g intramuscular 10-14 días o azitromicina 2 g en dosis única, pero teniendo en cuenta, como se mencionó anteriormente, que se han descrito cepas resistentes a macrólidos y fracasos de tratamiento (15).

Ante un contagio de más de un año (sífilis latente tardía o terciaria) o contagio de duración desconocida se recomienda doxiciclina 100 mg cada 12 horas, vía oral durante 28 días o ceftriaxona 1 g intramuscular o intravenosa durante 14 días. En casos de neurosífilis, sífilis oftálmica u óptica en pacientes alérgicos a penicilina intentar la desensibilización en el hospital, y si no fuese posible, emplear ceftriaxona 2 g por vía intravenosa durante 14 días, o doxiciclina 200 mg cada 12 horas por vía oral durante 21 días (15).

2.8.2 Desarrollo potencial de resistencia a las tetraciclinas

En la actualidad, no hay reportes de resistencia a tetraciclinas en TPA. Sin embargo, debido a la creciente aparición de resistencia a macrólidos, es importante considerar cómo esta espiroqueta podría desarrollar resistencia a las tetraciclinas.

Las tetraciclinas son antibióticos bacteriostáticos que inhiben la síntesis de proteínas mediante la unión reversible al ARNr 16S (103). Estudios a pequeña escala demostraron que la doxiciclina, tiene una tasa de éxito similar a la de la penicilina para el tratamiento de la sífilis (104-107). Sin embargo, un estudio reciente en pacientes daneses no evidenció una disminución adecuada de los títulos de las pruebas no treponémicas después del tratamiento con doxiciclina (17). Aunque se desconoce la causa real de esta falla serológica, una posible explicación pudiera ser que la cepa infectante de TPA posea resistencia a la doxiciclina.

La resistencia a la tetraciclina, que confiere resistencia cruzada a doxiciclina, puede deberse a sistemas de eflujo, proteínas de protección ribosomal, mutación de ciertas proteínas ribosómicas, o a la inactivación enzimática del antimicrobiano (108). Además, se ha evidenciado la presencia de mutaciones puntuales en el ADNr 16S de *H. pylori* y *Propionibacterium* en las posiciones 965-967 o 1058 (de acuerdo a este gen en *E. coli* que sirve de referencia), que confieren resistencia a las tetraciclinas en estas bacterias (18, 109). Así, las mutaciones puntuales en una o ambas copias del ADNr 16S de TPA constituyen un mecanismo potencial para el desarrollo de la resistencia a tetraciclinas (13). Debido a la emergencia de la circulación de TPA resistentes a macrólidos, es probable que se incremente el uso de las tetraciclinas como tratamiento alternativo, lo que incrementaría la presión selectiva del mismo a aislados de TPA con la consecuente aparición de la resistencia. Si se produjese un fracaso del tratamiento con tetraciclinas en pacientes con sífilis, debe ser prioritario el análisis del gen ADNr 16S de TPA.

2.9 Epidemiología

Según la estimación más reciente de la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente 17,7 millones de personas de 15 a 49 años de edad tenían sífilis en el año

2012 a nivel mundial, con un estimado de 5,6 millones de casos nuevos cada año (110) (Figura 1).

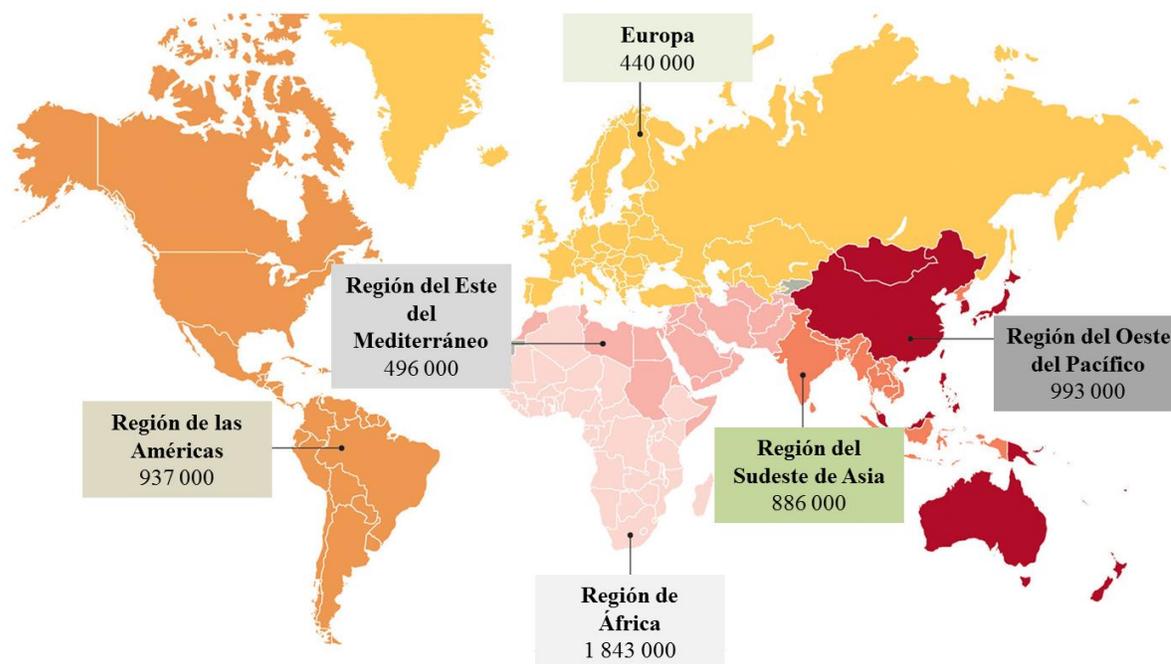


Figura 1. Frecuencia absoluta de casos nuevos de sífilis a nivel mundial por región geográfica según datos de la Organización Mundial de la Salud en el año 2012. Figura tomada de Peeling y colaboradores, 2017 (2).

La prevalencia e incidencia estimadas de la sífilis variaron sustancialmente según la región o el país, con la prevalencia más alta en África y con más de 60 % de los casos nuevos ocurridos en los países subdesarrollados. La mayor prevalencia de la sífilis materna se reporta en África, lo que representa más de 60 % de la estimación mundial (110, 111).

En los países subdesarrollados, la transmisión de la sífilis entre heterosexuales ha disminuido en la población general, pero sigue siendo problemática en algunas subpoblaciones de alto riesgo, como las trabajadoras comerciales del sexo y sus clientes masculinos. Un estudio reciente en trabajadoras comerciales del sexo en Johannesburgo, Sudáfrica, mostró que 21 % de las mujeres participantes tenían anticuerpos que sugerían una infección pasada o actual y 3 % tenía una infección activa (112). Otra investigación en este grupo de mujeres, en 14 zonas en Sudán, mostró una alta seroprevalencia (mediana

4,1 %), con el valor más alto de 8,9 % en la zona este del país (113). Otro gran estudio realizado en Uganda con más de 1000 mujeres evidenció una seropositividad para la sífilis de 21 % y 10 % de las mujeres tenía infección activa (114).

En contraste, los países desarrollados han tenido una disminución en la prevalencia de la sífilis entre hombres y mujeres heterosexuales. Sin embargo, se ha observado un resurgimiento de la sífilis que afecta desproporcionadamente a los hombres que tienen sexo con otros hombres (HSH). La sífilis está asociada con determinadas conductas sexuales de riesgo y con un aumento sustancial en la transmisión y adquisición del VIH. De hecho, las tasas de casos notificados de sífilis entre los HSH en EUA y Europa Occidental han aumentado desde 1998 (115). En 2015, las tasas de casos de sífilis primaria y secundaria entre los HSH (309 por 100 000) en EUA fueron 221 veces superior a la tasa para mujeres (1,4 por 100 000) y 106 veces superior a la tasa para hombres heterosexuales (2,9 por 100 000) (116). En Canadá, en comparación con los casos informados en la población masculina en general, la incidencia de sífilis fue 300 veces mayor entre los HSH seropositivos al VIH (117).

La infección por sífilis se ha asociado con ciertos factores conductuales y de otras índoles; por ejemplo el encarcelamiento, parejas sexuales múltiples o anónimas, actividad sexual relacionada con el uso de drogas ilícitas, la búsqueda de parejas sexuales a través de internet y otras dinámicas de redes sexuales de alto riesgo (118-120). Los informes de presentaciones inusuales y la rápida progresión de la sífilis en pacientes con infección concurrente por VIH han llevado a la hipótesis de que la infección o el tratamiento para el VIH altera la historia natural de la sífilis (121).

2.10 Situación de la sífilis venérea en Cuba

Durante los últimos 10 años, se ha visto un aumento significativo en las tasas de incidencia (por 100 000 habitantes) de casos de sífilis en Cuba, con cifras que van desde 14,1 en 2008 a 45,2 en 2017 (21).

Este incremento en el país de la sífilis se debe fundamentalmente a la liberación de las relaciones sexuales con cambios frecuentes de pareja sin protección, al comienzo temprano

de las relaciones sexuales y la coinfección con otras ITS, lo que eleva el riesgo de adquisición de la sífilis en la población, sobre todo entre los más jóvenes (15, 122).

La sífilis es además una ITS de declaración obligatoria en Cuba que está reconocida como un problema latente de salud (21). Sin embargo, el diagnóstico microbiológico nacional está sustentado en la aplicación de pruebas serológicas que en ocasiones carecen de sensibilidad (122), mientras que no se cuenta en la red nacional de laboratorios con pruebas moleculares validadas para ofrecer un diagnóstico temprano y confirmatorio de pacientes con sospechas de la enfermedad. Además, se desconocen los patrones de circulación epidemiológico-moleculares de TPA, así como la respuesta a los antimicrobianos de segunda línea.

2.11 Treponematosis endémicas

Las treponematosis endémicas, al igual que la sífilis venérea, son infecciones crónicas y se caracterizan por etapas clínicas bien definidas, con una lesión primaria localizada, lesiones secundarias diseminadas, periodos de latencia y posibles lesiones tardías (123).

Los agentes etiológicos de las treponematosis endémicas previamente mencionados, constituyen bacterias poco estudiadas con morfología idéntica a TPA (123).

El diagnóstico de estas infecciones se basa fundamentalmente en el reconocimiento de las manifestaciones clínicas unido al enfoque epidemiológico de los posibles casos. Las técnicas de laboratorio que se utilizan en la rutina no son capaces de diferenciar las treponematosis (124).

Desde el punto de vista epidemiológico, estas treponematosis se presentan como focos endémicos en determinadas regiones geográficas. Por ejemplo, se ha reportado un incremento de la morbilidad por pian en zonas que incluyen el oeste de África (Costa de Marfil, Ghana, Togo, Benín), Nigeria y las zonas rurales de la República Democrática del Congo. Se estima que la prevalencia de bejel es de más de 10 % en algunas regiones del norte de Ghana, Mali, Níger, Burkina Faso y Senegal. Sin embargo, la pinta se limita a Centroamérica y el norte de Sudamérica (125).

2.11.1 Pian

El pian se caracteriza por el desarrollo de una o varias lesiones primarias seguidas de múltiples lesiones cutáneas diseminadas. Todas las lesiones cutáneas tempranas son infecciosas y pueden persistir por muchos meses. Las manifestaciones tardías, que afectan a aproximadamente 10 % de las personas infectadas, son destructivas y comprometen la piel, huesos y articulaciones (126).

La infección se transmite por contacto directo con las lesiones infecciosas. Después de tres a cuatro semanas como promedio, la primera lesión comienza como una pápula, casi siempre en una extremidad, y luego crece (sobre todo en clima cálido y húmedo) hasta convertirse en una lesión papilomatosa. Se desarrolla linfadenopatía regional y la lesión casi siempre cura en seis meses (127).

Al mismo tiempo o después de la lesión primaria aparece una erupción secundaria generalizada, acompañada de linfadenopatía general (128).

El pian tardío se manifiesta por gomas en la piel y huesos largos, hiperqueratosis de palmas y plantas, osteítis y periostitis, e hidrartrosis. La destrucción de la nariz, maxilar, paladar y faringe se denomina gangosa y es similar a las lesiones destructivas de la lepra y la leishmaniosis (129).

2.11.2 Bejel o sífilis endémica

Las lesiones tempranas de bejel se localizan sobre todo en las superficies mucocutáneas y mucosas orales. Se cree que la infección se transmite por contacto directo, mediante besos, por masticación previa del alimento o al compartir utensilios para comer o beber (130).

La lesión inicial, por lo general es una pápula intraoral, a menudo pasa inadvertida y va seguida de parches en la mucosa oral y lesiones mucocutáneas parecidas a los condilomas planos de la sífilis secundaria. Esta erupción puede durar meses, incluso años. Son frecuentes la periostitis y linfadenopatía regional. Después de un periodo de latencia variable, pueden aparecer las manifestaciones tardías, que incluyen gomas óseas y cutáneas (123).

2.11.3 Pinta

La pinta es la más benigna de las infecciones treponémicas. Esta enfermedad tiene tres etapas que se caracterizan por cambios marcados en el color de la piel, pero no parece causar lesiones destructivas ni afectar otros tejidos. Por lo general, la pápula inicial se localiza en las extremidades o en la cara y es pruriginosa (131).

Después de uno a muchos meses de infección aparecen numerosas lesiones secundarias diseminadas (píntides). Al principio, estas lesiones son rojas, pero adquieren una pigmentación profunda y finalmente toman un color azul oscuro. Las lesiones secundarias son infecciosas y muy pruriginosas, y pueden persistir por años. Las lesiones pigmentadas tardías se conocen como máculas discrómicas (125).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 *Diseño epidemiológico*

Durante los años 2012 al 2018 se ejecutaron los siguientes estudios en el LNRTPE-IPK, para dar cumplimiento a los objetivos planificados:

- i.) Estudio analítico de corte transversal prospectivo conducido en pacientes cubanos, atendidos en la consulta de ITS del IPK en el periodo 2012-2017, para determinar la frecuencia de infección por TPA, así como su asociación con variables clínico-epidemiológicas de interés (Objetivo 1).
- ii.) Estudio exploratorio para la identificación y relación filogenética de los subtipos/genotipos de TPA en los pacientes estudiados (Objetivo 2).
- iii.) Estudio exploratorio para la detección de determinantes genéticos de resistencia a macrólidos y tetraciclinas en aislados cubanos de TPA (Objetivo 3).

3.2 *Material de referencia*

ADN: se utilizaron ADN de referencia de las cepas Nichols y Street 14 de TPA donadas gentilmente por el Dr. Jørgen Skov Jensen del Instituto del Suero en Dinamarca.

Microorganismos: se utilizaron las cepas de referencia de *Mycoplasma genitalium* ATCC 33530, *C. trachomatis* ATCC VR-902B, *Haemophilus influenzae* tipo b ATCC 49629, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *S. agalactiae* ATCC 13813, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 35218, *E. coli* ATCC 25922, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto B31, *B. garinii*

NE83, *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni M20, *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae RGA y *L. interrogans* serovar Pomona Pomona; de las colecciones de cultivos microbianos del departamento de Bacteriología-Micología del IPK.

3.3 Determinación de la frecuencia de infección por Treponema pallidum subsp. pallidum y su asociación con variables clínico-epidemiológicas de interés (Objetivo 1)

Durante el periodo comprendido entre mayo de 2012 a diciembre de 2017 se estudiaron 225 pacientes masculinos que presentaban lesiones genitales/anales/orales ulceradas sugerentes de sífilis, que asistieron a la consulta de ITS del servicio de Dermatología del Hospital del IPK. No asistieron pacientes femeninos con lesiones ulceradas a la consulta en el período de estudio.

A cada paciente, previo consentimiento informado (Anexo 1), se le recogió información clínico-epidemiológica mediante la aplicación de un cuestionario (Anexo 2) de forma individual; a las parejas o familiares acompañantes se les solicitó abandonar la consulta durante el llenado de la encuesta.

Criterios de inclusión: pacientes cubanos que estuvieron de acuerdo en que se les realizara la toma de muestra y en responder verbalmente la encuesta clínico-epidemiológica.

Criterio de exclusión: pacientes que no estuvieron de acuerdo en participar en la investigación.

3.3.1 Toma de las muestras

A cada paciente se le colectó una muestra de exudado genital, anal u oral dependiendo del sitio anatómico donde tuviese la lesión ulcerada. En los pacientes con lesiones en más de un sitio anatómico, se tomó muestra de la lesión más característica de sífilis desde el punto de vista clínico. Con la ayuda de una torunda seca se limpió cuidadosamente el área de la lesión para la eliminación de secreciones, se comprimió la lesión desde los bordes hacia el centro hasta observar la aparición de la linfa (solo en el caso de lesiones genitales y anales) y seguidamente se aplicó con fuerza el hisopo (Nuova Aptaca, Italia) sobre la lesión. El hisopo con la muestra biológica se introdujo en un tubo con 1 mL de medio de transporte

comercial MEM Alpha (Invitrogen, EUA). Los tubos de medio con los especímenes clínicos se transportaron a 4°C en un contenedor de seguridad biológica al LNRTPE-IPK, donde se conservaron a -80°C hasta su procesamiento.

3.3.2 Detección molecular de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* y de otros agentes infecciosos causantes de lesiones ulceradas en las muestras clínicas

En el anexo 3 se muestran las secuencias de todos los cebadores y sondas utilizadas en la investigación.

3.3.2.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando el estuche comercial QIAamp DNA Mini and Blood Mini Kit (Qiagen, Alemania) y para ello se adicionaron 0,5 mL del medio de transporte MEM Alpha con la muestra biológica a un vial de 1,5 mL, el que se centrifugó a 20 000 x g durante 15 min. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 600 µL de tampón AL (contenido en el estuche) con ayuda de un vórtex (Cenco, Holanda). Una vez resuspendido el precipitado, se procedió con el protocolo recomendado por el fabricante. Los extractos de ADN se conservaron a -80°C hasta su utilización.

3.3.2.2 Evaluación de la extracción de ADN

El proceso de extracción de ADN se evaluó mediante la aplicación de una RT-PCR para la amplificación de un fragmento de ADN de 110 pb del gen que codifica la β-globina humana (PCR β-glob) (132), que sirvió a su vez como control de inhibición de la PCR específica de patógeno. La PCR anterior se realizó a partir de una mezcla de reacción para volúmenes finales de 25 µL (20 µL de la mezcla de reacción y 5 µL de ADN), que contenía una unidad de enzima HotStarTaq Plus DNA Polymerase (Qiagen, Alemania), 1X de tampón de PCR (1,5 mM de MgCl₂), 500 nM de cada cebador (Anexo 3, cebadores para gen de la β-globina humana), 200 nM de la sonda Taqman (Anexo 3, sonda para gen de la β-globina humana), 200 nM de cada deoxinucléotido tri-fosfato (dNTP) (Qiagen, Alemania) y suficiente agua ultrapura estéril hasta alcanzar el volumen final. Se utilizó para

cada ensayo, un control positivo que consistió en un extracto de ADN a partir de células HeLa (ATCC) que se obtuvo del Laboratorio de Cultivo de Células del IPK, y un control negativo donde la mezcla de reacción contenía agua ultrapura estéril en lugar del extracto de ácidos nucleicos.

La amplificación y el análisis de los resultados se realizó en un equipo Rotor Gene Q 5-Plex-HRM (Qiagen, Alemania), utilizando un programa de un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 45 ciclos de 94°C durante 15 seg, 60°C durante 1 min, con lectura de fluorescencia en el canal verde (longitud de onda de excitación máxima 492 nm y de emisión 518 nm). Se consideró la muestra no inhibida si el valor de ciclo umbral (Ct del inglés, “Cycle treshold”) fue inferior a 40.

3.3.2.3 Detección molecular de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*

Se evaluó la utilidad de cuatro protocolos de PCR (un protocolo de PCR a punto final y tres protocolos de RT-PCR), seleccionados de acuerdo a su frecuencia de aparición en la literatura internacional y resultados obtenidos. Se eligieron las estrategias de RT-PCR que utilizan los genes dianas *polA* y *tpp47* pues han sido mayormente utilizadas en el diagnóstico temprano de la sífilis según se reporta en un meta-análisis realizado por Gayet-Ageron y colaboradores (76); y un protocolo que amplifica un fragmento del gen ADNr 16S (143) obtenido en el marco de una colaboración previa de trabajo con la Universidad de Zurich, a la que pertenece el autor principal del mencionado protocolo. Además, se evaluó un protocolo de PCR a punto final que amplifica un fragmento de 377 pb del gen *polA* dado su amplio uso en la práctica clínica (144) en países con recursos financieros.

Las mezclas de reacción utilizadas para las tres reacciones de RT-PCR fueron iguales a la descrita en el acápite anterior para la RT-PCR β -glob pero con los cebadores y sondas específicas para cada diana (Anexo 3, cebadores y sondas para RT-PCR de los genes *polA*, *tpp47* y ADNr 16S). Como control positivo se utilizó ADN de la cepa Nichols de TPA y agua ultrapura como control negativo. Los protocolos de amplificación fueron idénticos para cada reacción respetando lo establecido por las publicaciones originales como sigue,

un ciclo de 94°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 94°C durante 30 seg y 60°C durante 1 min, y una amplificación final a 72°C de 5 min. Las reacciones se desarrollaron en un termociclador Rotor Gene Q 5-Plex-HRM (Qiagen, Alemania), con lectura en el canal de fluorescencia correspondiente al marcaje de cada sonda utilizada (RT-PCR *polA* y ADNr 16S en el canal verde, RT-PCR *tpp47* en el canal naranja [longitud de onda de excitación máxima 574 nm y de emisión 602 nm]).

Por su parte, la amplificación del ADN en la PCR a punto final se realizó en un termociclador "Mastercycler personal". (Eppendorf, Alemania), a partir de una mezcla preparada para un volumen final de 25 µL (20 µL de mezcla más 5 µL de ADN de la muestra) conteniendo una unidad de enzima HotStarTaq Plus DNA Polymerase (Qiagen, Alemania), 1X de tampón de PCR (1,5 mM de MgCl₂), 500 nM de cada cebador (Anexo 3, cebadores para PCR a punto final del gen *polA*), 200 nM de cada dNTP (Qiagen, Alemania) y suficiente agua ultrapura estéril hasta alcanzar el volumen final. Como control positivo se utilizó ADN de la cepa Nichols de TPA y agua ultrapura como control negativo. Se utilizó el siguiente programa de amplificación: 94°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de 94°C durante 30 seg, 60°C durante 1 min y 72°C por 1 min, y una extensión final a 72°C de 5 min.

Los productos amplificados se visualizaron en electroforesis submarina en gel de agarosa al 2 % utilizando como tampón de corrida Tris-Borato-EDTA 0,5 X. La cámara electroforética GNA 100 (Pharmacia Biotech, Suecia) acoplada a la fuente de electroforesis EPS 301 (Amersham Biosciences, Suecia), se ajustó a una diferencia de potencial de 110 V con una intensidad de corriente de 90 mA durante 45 min. Se empleó como patrón de peso molecular la escalera de 100 pb (Promega, Madison, EUA), como colorante de corrida electroforética 5X Green GoTaq Flexi Buffer (Promega, Madison, EUA) y Bromuro de Etidio (1µg/mL) como agente intercalante del ADN.

3.3.2.3.1 Ensayos de límite de detección y especificidad analítica

Para el estudio del límite de detección de las RT-PCR de TPA, se realizaron diluciones decimales y seriadas del ADN de referencia de la cepa Nichols desde 10⁷ geq/mL hasta

1 geq/mL. El ensayo se llevó a cabo cinco veces consecutivas y se definió como límite de detección, la menor concentración de ADN a partir de la cual se logró amplificación en al menos cuatro de las cinco réplicas del ensayo.

Además se realizó el ensayo de especificidad analítica de las RT-PCR donde se empleó ADN extraído con el estuche comercial QIAamp DNA Mini and Blood Mini Kit (Qiagen, Alemania), de las cepas bacterianas relacionadas y no relacionadas filogenéticamente con TPA mencionadas en el acápite 3.2.

3.3.2.3.2 Aplicación a las muestras clínicas

Los protocolos de RT-PCR antes descritos se aplicaron a los extractos de ADN obtenidos de las muestras de lesiones provenientes de los 225 pacientes. De estos, 191 muestras provenían de lesiones genitales, 13 muestras de lesiones orales y 21 de lesiones anales. La reacción se consideró positiva si existió amplificación específica del control positivo, no se observó amplificación en el control negativo y el valor de Ct en las RT-PCR de las muestras clínicas fue inferior a 40 ciclos. Los resultados se compararon con el fin de seleccionar el protocolo con mayor sensibilidad diagnóstica en las condiciones del LNRTPE-IPK.

Además, se compararon los resultados por PCR y por las pruebas serológicas de rutina en el laboratorio; o sea, los títulos por RPR o VDRL como pesquisa y la positividad por TPHA como prueba serológica confirmatoria. Los resultados de las pruebas serológicas se tomaron de los registros de diagnóstico del LNRTPE-IPK correspondientes a los años en estudio.

3.3.2.4 Definición de caso de sífilis

En el marco de la presente investigación, para la definición de caso de sífilis, se adoptaron los criterios establecidos en el Plan Estratégico Nacional (2014-2018) (basados en información clínica, epidemiológica y resultados serológicos) (122) y se añadieron los de los CDC (que incluyen la PCR) (80).

Se consideraron como casos de sífilis a aquellos pacientes con lesiones ulceradas genitales/anales/orales sugerentes de chancro sifilítico y que como resultado de laboratorio manifestaron ambas pruebas serológicas reactivas (RPR/VDRL reactiva y TPHA positiva) y/o PCR positiva en al menos uno de los *loci* evaluados.

3.3.2.5 Detección molecular de herpes simple tipo 1 y tipo 2, *Chlamydia trachomatis* y *Haemophilus ducreyi*

En aras de justificar la negatividad de la PCR de TPA en presencia de la lesión ulcerada, se realizó la búsqueda por PCR de otros agentes importantes causantes de úlceras genitales como es el caso de herpes simple tipo 1 y tipo 2, *C. trachomatis* y *H. ducreyi*.

La detección molecular de estos agentes se llevó a cabo siguiendo protocolos reportados para estos fines, como brevemente se describe a continuación:

Herpes simple tipo 1 y 2: la RT-PCR se llevó a cabo utilizando el estuche comercial LightMix KIT HSV-1/2 (TIBMOLBIOL, Alemania) que mediante sondas de hibridación permite la diferenciación entre los virus herpes.

Haemophilus ducreyi: se utilizó una PCR que amplifica un fragmento del gen ADN_r 16S de acuerdo a lo reportado por Orle y colaboradores (133).

C. trachomatis: se aplicó una PCR anidada que detecta el gen *omp1* (134) de este patógeno.

3.3.3 Relación de los pacientes infectados con *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* y variables clínico-epidemiológicas de interés

La aplicación de un estudio de regresión logística univariado posibilitó el cálculo de la razón de prevalencia (RP) con 95 % de confianza (IC 95 %) de las variables clínicas y de riesgo recolectadas en el cuestionario (Anexo 2) para la evaluación de posibles asociaciones de estas con la presencia de TPA. Además se llevó a cabo un análisis multivariado con aquellas variables que mostraron asociación en el análisis univariado; con el objetivo de predecir, mediante el cálculo de la razón de ventaja (OR del inglés, “Odds ratio”, IC 95 %) si alguna de las variables estudiadas constituyeron predictores de riesgo

para la adquisición de TPA en los pacientes incluidos en el estudio. La operacionalización de las variables a estudiar se representa en el anexo 4.

3.4 Identificación de los subtipos/genotipos de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* que infectan a la población de estudio (Objetivo 2)

Se incluyeron, para la caracterización molecular, las muestras clínicas que resultaron positivas por las tres RT-PCR para diagnóstico.

3.4.1 Identificación de los subtipos de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*

3.4.1.1 Determinación del número de repeticiones del gen *arp*

Para ello se aplicó una PCR utilizando una mezcla de reacción como la que se describe en el acápite 3.3.2.3 para la PCR de TPA a punto final, cambiando los cebadores (Anexo 3, cebadores para gen *arp*). La amplificación se realizó según lo informado por los autores con una desnaturalización inicial a 94°C por 4 min, seguido de 45 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 62°C por 1 min, extensión 72°C por 1 min y la extensión final consistió en un ciclo de 72°C por 7 min.

Para la visualización de los productos de amplificación se realizó una electroforesis submarina en gel de agarosa según se describió en el acápite 3.3.2.3.

Según la talla del producto amplificado se estimó el número de repeticiones del fragmento de 60 pb presentes en el gen *arp*, tomando como referencia que el producto de la PCR obtenido para la cepa de referencia (Nichols) de 1155 pb equivale a 14 repeticiones. En la tabla 1 se muestran las tallas conocidas y el número de repeticiones estimadas para ellas.

Tabla 1. Determinación del subtipo de acuerdo al número de repeticiones en el gen *arp*.

Talla del amplicón (pb)	Número de repeticiones del fragmento en el gen <i>arp</i>
735	7
915	10
1099	13
1155	14
1220	15
1274	16
1495	20
1553	21

3.4.1.2 Análisis por PCR-RFLP de los genes *tpr*

A cada extracto de ADN se le aplicó una primera PCR para amplificar un fragmento de 2186 pb del gen *tpr* (83). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25 μ L con una constitución idéntica a la preparada en el acápite 3.3.2.3, con los cebadores específicos (Anexo 3, cebadores para gen *tpr*).

El programa de amplificación se llevó a cabo siguiendo lo propuesto por Flasarová y colaboradores (135): desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación 64°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min; y luego una etapa de extensión final a 72°C por 5 min.

Al producto de amplificación obtenido (2186 pb) se le realizó una segunda PCR para lograr un fragmento interno de 1836 pb, manteniendo la composición de la mezcla de reacción con los cebadores específicos (Anexo 3, cebadores para gen *tpr*). La amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguido de 45 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 64°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min; y luego una etapa de extensión final a 72°C por 5 min.

Los productos de PCR de esta segunda etapa se digirieron con la endonucleasa de restricción *MseI* (ThermoScientific, EUA) a 65°C durante 4 horas, en una mezcla que tuvo como volumen final 31 μ L. Se utilizaron 2 μ L del tampón R (10X), 1 μ L de la enzima

MseI, 10 µL de los productos de PCR y suficiente cantidad de agua ultrapura para completar el volumen final.

La tabla 2 muestra los criterios de interpretación para la asignación de la primera letra al subtipo determinado de acuerdo a la talla obtenida de cada banda electroforética obtenida.

Tabla 2. Subtipos de *T. pallidum* subsp. *pallidum* atendiendo a las tallas de los fragmentos obtenidos por PCR-RFLP del gen *tpr* (donado gentilmente por el Dr. Etienne Mueller del Centro para VIH e ITS, del Instituto Nacional de Enfermedades Transmisibles en Johannesburgo, Sudáfrica).

Patrón RFLP ^a	Cepa de referencia	Talla de los fragmentos (pb)							
		915/912/905	806	726	522	423	Desconocida	383	Desconocida
a	Nichols	X		X	X	X			X
b	SUL61	X	X	X					X
c	U230	X	X	X		X			X
d	Street 14	X	X	X	X				X
e	SF14	X		X	X				X
f	TR96	X	X	X	X	X			X
g	TR120	X				X			X
h	Dbn50	X		X			X		X
i	SUL115	X		X					X
j	RCU8	X	X		X				X
k	SUL164			X					X
l	SUL144	X	X						
m	SUL54	X							
n	TR93	X			X	X			X
o	TR101	X		X		X			X
p	SF92/96	X			X				X

Leyenda: ^aPolimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción

3.4.1.3 Análisis por secuenciación del fragmento del *locus* TP0548

Se amplificó por PCR un fragmento polimórfico de 80 pb del *locus* TP0548. La mezcla de reacción fue idéntica a la utilizada en el acápite 3.3.2.3 con sus cebadores específicos (Anexo 3, cebadores para el *locus* TP0548 según criterio de los CDC) y las condiciones de amplificación se muestran a continuación: 94°C por 5 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, hibridación a 60°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min; y luego una etapa de extensión final a 72°C por 5 min.

Los productos de PCR se purificaron mediante el estuche QIAEX II (Qiagen, Alemania) de forma automática, utilizando el equipo QIAcube (Qiagen, Alemania), y siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Una vez purificados los productos de PCR, estos se sometieron a secuenciación nucleotídica por el método de Sanger. Las reacciones de secuencia (una con cada cebador de la PCR anterior) se prepararon en viales de 0,2 mL y los reactivos se mantuvieron en hielo mientras se preparó la reacción. Para la misma, se añadieron 3,5 μ L de agua ultrapura, 0,5 μ L del cebador en cuestión, 8 μ L de la mezcla maestra (DTCS Quick Start Master Mix) y 8 μ L del producto de PCR purificado hasta completar 20 μ L de volumen final.

El programa de amplificación se llevó a cabo con 50 ciclos de 96°C por 30 segundos, 50°C por 20 segundos y 60°C por 4 min.

Posteriormente, se procedió a la precipitación con etanol, para la cual se preparó una mezcla de glucógeno/solución de parada que para cada reacción de secuencia contenía 2 μ L de acetato de sodio al 3 M (pH 5,2), 2 μ L Sodio-EDTA a 100 mM (pH 8) y 1 μ L de glucógeno a una concentración de 20 mg/mL. Se añadieron 5 μ L de la mezcla de glucógeno/solución de parada a cada tubo de reacción. Se transfirió la reacción de secuencia a un tubo de microcentrífuga etiquetado y se mezcló mediante vórtex, después se añadieron 60 μ L de etanol absoluto 95 % frío y se agitó utilizando vórtex, a continuación se centrifugó a 4°C durante 15 min a 20 000 x g para descartar el sobrenadante de forma cuidadosa después de este paso. El precipitado se lavó dos veces con 200 μ L de etanol al 70 % y se agitó usando el vórtex, después de cada lavado se centrifugó a 20 000 x g a 4°C por 15 min. El sobrenadante se eliminó con precaución, el precipitado se dejó secar por 10 minutos, y la muestra se resuspendió en 40 μ L de la solución para la muestra (Sample Loading Solution).

Para la preparación de las muestras para el equipo, las mismas ya resuspendidas se transfirieron a pocillos de una misma placa (GATC-Biotech, Alemania) y se cubrieron con una gota de aceite mineral. La placa con las muestras se colocó en el secuenciador automático (GATC-Biotech, Alemania) para la puesta en marcha del método corto de

secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron editadas mediante el programa Sequencher 4.10.1 (Genes Code Corporation, EUA) y se compararon con las secuencias de cepas de TPA descritas hasta el 23 de abril de 2019 en la literatura, según la tabla 3.

Tabla 3. Descripción de los polimorfismos de simple nucleótido en el locus TP0548 de *T. pallidum* subsp. *pallidum* asociados a la segunda letra de cada subtipo según el criterio mejorado de los CDC.

Posición nucleotídica de los polimorfismos de simple nucleótido en los subtipos de <i>T. pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i>	
Subtipo	140 145 148 149 151 154 155 157 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 172 173 175 179 182 183 208
a	T A G C G G G T A G T G G T T C C G G A G G G A G C
b	T A G C G G G T G G T A G T G G T T C C G A A G G G A G C
c	T A G C G G G T A G T G G T T C C G A A G G G A G C
d	T A G C G G G T A G T G G T T C C G A A G G G A G A
e	T A G C G T G G G G T A G T G G T T G C A G G A A G A C C
f	T A G C G T G G G G G T A G T G G T T G C A G G A A G A C C
g	T A G C G T A G G A T A G T G G T T G C A G G A A G A C C
h	T A G C G G G T A G T G G T T C C G A A G G G C G C
i	T A G C G T G G A G T A G T G G T T G C A G G A A G A C C
j	T G C G G T G G G G G T A G T G G T T G C A G G G A A C C
k	T A G C G T G A G G T A G T G G T T G C A G G A A G A C C
l	T A G C A T G G G G G T A G T G G T T G C A G G A A G A C C
m	C A G C A T A G G A T A G T G G T T G C A G G A A G A C C
n	T A G C G T G G G G G C A G T G G T T G C A G G A A G A C C

Leyenda: Los polimorfismos de simple nucleótido (con relación a la cepa de referencia Nichols de *T. pallidum* subsp. *pallidum* con código de acceso en el [GenBank](#), CP004010.2) se muestran como letras blancas con fondo gris.

3.4.2 Identificación de los genotipos de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*

El esquema de tipificación MLSA está basado en la amplificación por PCR anidada y secuenciación de los *loci* TP0136, TP0548 y TP0705 (10). Cada *locus*, de acuerdo a su polimorfismo de secuencia, aporta un número al genotipo o perfil alélico que se conforma por la combinación de los tres números (Figura 2).

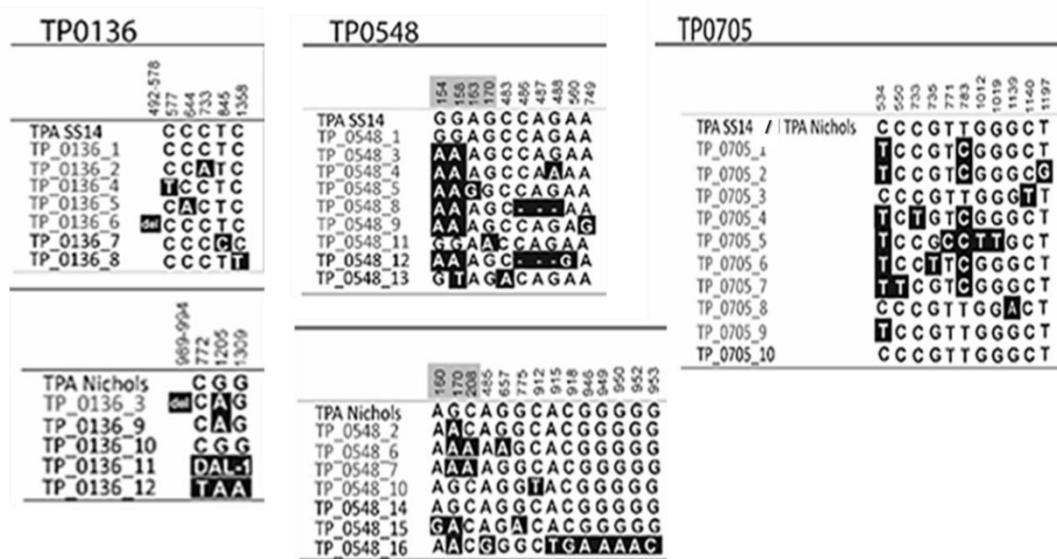


Figura 2. Criterio de interpretación del sistema de caracterización de *T. pallidum* subsp. *pallidum* basado en análisis de secuencia de *loci* múltiples utilizando los *loci* TP0136, TP0548 y TP0705. Los polimorfismos de simple nucleótido (SNP, del inglés “Single Nucleotide Polimorphisms”) con relación a las cepas de referencia Nichols y SS14 se muestran como letras blancas con fondo negro.

La mezcla de PCR para los tres *loci* consistió en 25 µL (20 µL de mezcla más 5 µL de ADN de la muestra) de volumen final que contenía una unidad de enzima HotStarTaq Plus DNA Polymerase (Qiagen, Alemania), 1X de tampón de PCR (1,5 mM de MgCl₂), 500 nM de cada cebador (Anexo 3, cebadores para los *loci* TP0136, TP0548 y TP0705), 200 nM de cada dNTP (Qiagen, Alemania) y suficiente agua ultrapura estéril.

La amplificación de todos los *loci* se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 94°C por 1 min; 40 ciclos de 94°C por 30 seg, 50°C durante 30 seg y 72°C por 1 min y 45 seg; seguido de una extensión final a 72°C durante 7 min. La segunda reacción de la PCR anidada se desarrolló bajo las mismas condiciones, excepto por un incremento en la temperatura de hibridación a 55°C por 30 seg y por el volumen final de reacción que se duplicó a 50 µL (49 µL de la mezcla de reacción y 1 µL de producto de PCR de la primera reacción).

Los nuevos productos de PCR se purificaron y secuenciaron según el protocolo descrito previamente en el acápite 3.4.1.3.

3.4.2.1 Diseño del método de análisis de secuencias de *loci* múltiples para la clasificación de las subespecies de *Treponema pallidum*

En aras de contar con una caracterización más completa de *T. pallidum* que posibilitara una diferenciación certera entre las tres subespecies, se diseñó y aplicó un nuevo MLSA basado en la amplificación por PCR y secuenciación por el método de Sanger de *loci* adicionales a los preestablecidos en el sistema de caracterización tradicional.

Las secuencias génicas de las cepas de TPA/TEN/TPE utilizadas para el análisis filogenético consistieron en cuatro secuencias de la subespecie TPE (CDC-2, Fribourg-Blanc, Gauthier y Samoa D), cuatro secuencias de la subespecie TPA (Nichols, SS14, Mexico A y DAL-1) y tres secuencias de la subespecie TEN (Bosnia A, Iraq B y el aislado clínico 11q/j) (Anexo 5). La selección de los *loci* se realizó mediante alineamientos múltiples de los genomas antes mencionados usando el programa Mega 6 (136) e identificando aquellos sitios informativos de parsimonia (PIS, del inglés “Parsimony Informative Sites”) que permitiesen una separación correcta de las tres subespecies. Dicha selección fue dependiente de la disponibilidad de datos de secuencias, particularmente en los casos de Iraq B y 11q/j (representativos de TEN) para los que solo se han publicado secuencias parciales de genoma (36).

Los *loci* seleccionados se amplificaron por PCR anidada en aquellas muestras clínicas dudosas con relación a la subespecie infectante. Cada mezcla de PCR contenía una unidad de enzima HotStarTaq Plus DNA Polymerase (Qiagen, Alemania), 1X de tampón de PCR (1,5 mM de MgCl₂), 500 nM de cada cebador, 200 nM de cada dNTP (Qiagen, Alemania) y suficiente agua ultrapura estéril para alcanzar un volumen de 20 µL de mezcla, más 5 µL del extracto de ADN en la primera reacción y 24 µL de la mezcla más 1 µL de producto de PCR, en la segunda reacción. La amplificación de todos los *loci* se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 94°C por 1 min; 40 ciclos de 94°C durante 30 seg, 50°C durante 30 seg, 72°C por 1,5 min; y 72°C durante 7 min.

Los productos de PCR se purificaron y secuenciaron según el protocolo descrito previamente en el acápite 3.4.1.3.

3.4.2.2 Diseño del método de análisis de secuencias de loci múltiples para la mejor distinción de los grupos genéticos Nichols-like y SS14-like de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*

Para la identificación de los genes con PIS que posibiliten una mejor identificación de los miembros de TPA pertenecientes a ambos grupos genéticos, inicialmente se identificaron aquellos genes con acumulación de SNP, o sea se seleccionaron los genes que tuviesen igual o más de cinco SNP entre genomas de referencia de SS14 (Código de acceso en GenBank, CP004011.2) y Nichols (Código de acceso en GenBank, CP004010.1), según el criterio establecido de acuerdo a la experiencia del grupo de investigación del Dr. David Šmajš, Universidad Masaryk, Brno, República Checa.

Después se identificaron los SNP verdaderamente informativos en la distinción de los grupos SS14-like y Nichols-like. Esto se realizó utilizando datos reportados a nivel internacional, que contenían secuencias de genoma completo (62 genomas totales; Anexo 6) de cepas de referencia de TPA, obtenidas a partir de pases sucesivos en conejos o de cepas obtenidas de muestras clínicas, mediante el método de enriquecimiento independiente de cultivo (10). Los genomas analizados comprendieron todos los genomas de TPA publicados (de ocho países) entre 1912-2015 y además contenían miembros de TPA pertenecientes a ambos grupos genéticos. Se excluyeron los datos ambiguos, las regiones del ADN no cubiertas, regiones parálogas, regiones intergénicas y genes con repetición.

Los *loci* seleccionados se amplificaron por PCR anidada siguiendo las condiciones de amplificación y mezcla de reacción descritas en el acápite 3.4.2.1.

Los productos de PCR se purificaron y secuenciaron según el protocolo descrito en el acápite 3.4.1.3.

3.4.2.3 Análisis filogenético

Se generaron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud mediante el programa Mega 6 (136) y utilizando el modelo de Tamura-Nei con valores de bootstraps para 1000 réplicas. Además, se construyeron redes filogenéticas utilizando el método Median-Joining con el programa Network 4 (137). Se contaron las deleciones e inserciones como eventos simples. Para la concatenación de las secuencias se usó el programa Sequence Matrix 1.8 (138).

3.5 *Detección de determinantes genéticos de resistencia a macrólidos y tetraciclinas en aislados cubanos de Treponema pallidum subsp. pallidum (Objetivo 3)*

Las muestras clínicas positivas por las tres RT-PCR de diagnóstico, incluidas en el acápite anterior, también se incluyeron en el estudio de los determinantes genéticos de resistencia a antimicrobianos de segunda línea.

3.5.1 *Detección de las mutaciones A2058G y A2059G que confieren resistencia a macrólidos en Treponema pallidum subsp. pallidum*

Se amplificó, por PCR anidada, el gen ADNr 23S según lo reportado por Lukehart y colaboradores (139). La mezcla de la primera reacción se realizó para 25 µL como volumen final (20 µL de la mezcla de reacción y 5 µL de ADN), la cual contenía una unidad de enzima HotStarTaq Plus DNA Polymerase (Qiagen, Alemania), 1X de tampón de PCR (1,5 mM de MgCl₂) (Qiagen, Alemania), 500 nM de cada cebador (Anexo 3, cebadores para gen ADNr 23S) y suficiente agua ultrapura. Para la segunda reacción, se duplicó el volumen de la mezcla maestra y de los cebadores hasta alcanzar 50 µL de volumen final de reacción (49 µL de la mezcla de reacción y 1 µL de producto de PCR de la primera reacción).

Las condiciones de amplificación se muestran a continuación: 94°C por 5 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, hibridación a 60°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min; y luego una etapa de extensión final a 72°C por 5 min.

Los productos de PCR se purificaron y secuenciaron de acuerdo a como se describió previamente en el acápite 3.4.1.3. Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el

programa Sequencher 4.10.1 (Genes Code Corporation, EUA) y la identidad de secuencias se comparó con las secuencias de este fragmento génico publicadas en el Banco de genes (GenBank) para TPA.

3.5.2 Detección de mutaciones puntuales en el ADNr 16S de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* potencialmente relacionadas con resistencia a tetraciclinas

A las muestras positivas por RT-PCR a TPA se les analizó además la presencia de las mutaciones AGA965 - 967TTC y G1058C en el gen ADNr 16S que confieren resistencia a las tetraciclinas en *E. coli*, *H. pylori*, *Propionibacterium* spp. (140). Para ello se amplificó, por PCR anidada, un fragmento de 531 pb del mencionado gen. La primera reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL que contenía una unidad de enzima HotStarTaq Plus DNA Polymerase (Qiagen, Alemania), 1X de tampón de PCR (1,5 mM de MgCl₂), 0,2 µM de dNTP, 0,3 µM de cada cebador (Anexo 3, cebadores para gen ADNr 16S) y suficiente cantidad de agua ultrapura hasta alcanzar 20 µL de mezcla de reacción, más 5 µL del ADN extraído. La segunda etapa de la PCR anidada mantuvo idéntica mezcla de amplificación, solo se sustituyeron los cebadores externos por los internos, según se muestra en el anexo 3. Las condiciones de amplificación para ambas reacciones fueron: 94°C por 5 min seguido de 40 ciclos de 94°C durante 1 min, 61°C por 1 min y 72°C por 1 min; se programó además una extensión final a 72°C por 1 min.

Los productos de PCR se purificaron y secuenciaron de acuerdo a los protocolos descritos anteriormente en el acápite 3.4.1.3. Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el programa libre Sequencher 4.10.1 (Genes Code Corporation, EUA).

3.6 Aspectos éticos

La presente investigación se concibió de acuerdo a lo establecido en la Declaración de Helsinki (141) y las Regulaciones Nacionales Cubanas (142) a fin de preservar la dignidad, los derechos, la seguridad y la salud de los participantes.

Cumpliendo con uno de los principales requisitos establecidos en las mencionadas guías, se anexa el Consentimiento Informado, que garantizó que los participantes en el estudio

estuvieran informados acerca de los fundamentos y razones que justificaron la presente investigación.

El protocolo de tesis se aprobó por la Comisión Científica Especializada de Microbiología y por el Comité de Ética Institucional del IPK (Código CEI IPK 44-18).

Se cumplieron las medidas de bioseguridad establecidas para el trabajo, la manipulación de las muestras según los niveles de riesgo establecidos por la Comisión Nacional de Seguridad Biológica en la Resolución 38/2006.

Aquellos participantes que accedieron a formar parte del presente estudio se sometieron a un riesgo mínimo relacionado con el pequeño sangrado que pudo resultar de la toma de los exudados de las lesiones ulceradas. Por los resultados serológicos de rutina el paciente recibió oportunamente su diagnóstico y tratamiento antimicrobiano, en caso requerido. El dermatólogo de atención especializada se responsabilizó por ofrecer al paciente su seguimiento del estado de salud de acuerdo al tratamiento indicado. El paciente estuvo todo el tiempo consciente de los beneficios científico-sociales de la investigación. Los pacientes tuvieron total libertad de retirarse de la investigación en cualquier momento sin que esto generase perjuicio de algún tipo.

El laboratorio contó con los reactivos necesarios, la infraestructura y el personal capacitado para llevar a cabo la presente investigación. Por tanto, no se previeron criterios para la suspensión o terminación de la investigación.

El responsable de la investigación veló porque el tutor de aquellos pacientes que no se encontraban en plenas capacidades para dar su consentimiento o que eran menores de 18 años, ofreciera autorización para ello, previa información detallada sobre el objeto de estudio.

Los resultados obtenidos fueron estrictamente confidenciales, por lo que solo fueron de dominio de los autores del estudio y de los sujetos participantes. La confidencialidad de los datos de los participantes se mantuvo a través de todo el estudio.

Todos los datos personales, clínicos, epidemiológicos y de laboratorio de cada caso fueron almacenados en una base de datos en Excel, creada al efecto y utilizando un único número de identificación. Todas las planillas del consentimiento informado se almacenaron en el LNRTPE-IPK y además en la historia clínica de cada paciente.

Los resultados finales del estudio se divulgaron mediante informes al MINSAP, al Programa Nacional de Control de ITS/VIH/SIDA, además se presentaron en eventos científicos nacionales e internacionales y se realizaron publicaciones con autoría compartida entre los participantes del estudio, siempre manteniendo la confidencialidad de los datos de los pacientes.

3.7 Limitaciones de la investigación

El autor de la tesis reconoce la existencia de determinadas limitaciones en los estudios realizados:

- i.) La mayoría de los pacientes que asisten a la consulta de Dermatología del IPK proceden de La Habana y generalmente están infectados con VIH, por lo que las inferencias de la investigación se limitan a esta provincia y de forma particular a este grupo de pacientes.
- ii.) Solo se colectó una muestra de suero de cada paciente. Esto limita la interpretación de las pruebas serológicas sobre todo en estadios tempranos de la enfermedad.
- iii.) En el análisis de resultados discrepantes por PCR y serología, se incluyeron pacientes que habían tomado tratamientos con antimicrobianos en los 15 días antes de la toma de muestra. Aunque la administración de los antimicrobianos por los pacientes usualmente fue de manera empírica y no aseguraba un tratamiento correcto, esto pudiera introducir sesgos en la negatividad de la PCR. Además, la exclusión de los pacientes tratados impediría la oportunidad del diagnóstico ya que la úlcera desaparece y progresa la enfermedad.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Frecuencia de infección por Treponema pallidum subsp. pallidum en pacientes cubanos

4.1.1 Calidad de la extracción del ADN y frecuencia de inhibición de la PCR

La amplificación de un fragmento del gen que codifica la β -globina humana constituye una estrategia atractiva como control interno no competitivo y de la calidad de la extracción de ácidos nucleicos, y en consecuencia dicha estrategia ha sido ampliamente utilizada en ensayos de PCR con fines diagnósticos a diferencia de los controles internos de tipo competitivos, que suponen una competencia entre el control interno y la diana por los cebadores, provocando una disminución en el límite de detección del ensayo y por tanto en la eficiencia de amplificación (143).

La aplicación de la RT-PCR β -glob descrita por Schmitz y colaboradores (132) a los extractos de las muestras de exudados de lesiones ulceradas no evidenció inhibición alguna, ya que se amplificó el fragmento de ADN esperado en 100 % de las mismas, lo que ratifica además la eficiencia del método de extracción de ADN utilizado.

El uso de los controles internos de amplificación constituye una premisa esencial para el control de la calidad de los procesos de extracción y amplificación del ADN durante el desarrollo y aplicación de las herramientas moleculares basadas en PCR, ya sea para la detección de microorganismos en muestras clínicas, así como para otros fines de carácter investigativo. Esto es debido a que la PCR como reacción multietapa puede verse inhibida por disímiles razones como son el mal funcionamiento del termociclador, mezclas de PCR incorrectas, actividad pobre de la ADN polimerasa, presencia de sustancias inhibitorias en

la matriz de la muestra clínica, entre otras (144). Los inhibidores de la PCR no solo pueden encontrarse en las muestras originales, sino que pueden ser añadidos a la mezcla de reacción durante el procesamiento de la muestra, previo a la amplificación del ADN. Entre estos inhibidores se incluyen los reactivos usados durante el paso de extracción y purificación del ADN, ejemplos conocidos son el etanol, fenol, isopropanol, detergentes iónicos como el desoxicolato de sodio, sarcosil y duodecil sulfato de sodio. Además, algunas sales cuando se encuentran en exceso en la mezcla de reacción pueden tener acción inhibitoria sobre la amplificación de los ácidos nucleicos, como el cloruro de potasio, cloruro de sodio, entre otras, (145). Las sustancias que se liberan del poliestireno, después de la exposición de las pipetas a la luz ultravioleta durante su descontaminación, también pueden inhibir la amplificación del ADN (146).

Aunque no se conocen bien los mecanismos específicos de acción de los inhibidores, se sabe que de manera general estos pueden actuar mediante la inactivación de la ADN polimerasa termoestable, ya sea por degradación o captura de los ácidos nucleicos, o por interferencia con el paso de lisis celular durante el proceso de extracción del ADN. La unión directa de algunos agentes al ADN de simple y doble cadena permite la purificación simultánea del inhibidor con el ADN, interfiriendo con la amplificación posterior del mismo (147).

4.1.2 Límite de detección y especificidad analítica de los protocolos de PCR para la detección de *Treponema pallidum*

Dado que los protocolos de PCR evaluados en la presente investigación ya habían sido reportados en la literatura científica internacional con resultados válidos para el diagnóstico temprano de la sífilis, se decidió su extrapolación a las condiciones del LNRTPE-IPK sin modificaciones en los parámetros de amplificación (mezcla de reacción y programa de ciclado); sin embargo, se llevaron a cabo estudios de límite de detección y especificidad analítica dada su importancia en estudios con muestras clínicas.

La PCR a punto final mostró 10^3 geq/reacción como límite de detección mientras que las tres RT-PCR evaluadas permitieron la amplificación de 3 geq/reacción. Por otro lado, en

los protocolos evaluados no se evidenció amplificación inespecífica con ADN de cepas de otros géneros bacterianos ajenos a *Treponema*.

Contar con PCR altamente sensibles y específicas constituye las bases del establecimiento de pruebas diagnósticas confiables y robustas. Los protocolos de RT-PCR se caracterizan por su rapidez; ya que no necesitan de procesos adicionales de detección, los riesgos de contaminación se reducen al mínimo; porque funcionan en sistemas cerrados (amplificación y detección simultáneas). En estas técnicas, las vías de detección por fluorescencia ofrecen una elevada capacidad de reconocimiento del ADN problema incluso cuando las concentraciones de partida son bajas; lo que denota la sensibilidad elevada de estos protocolos. Además, la utilización de las sondas de hidrólisis incrementan la especificidad analítica puesto que la sonda constituye un segundo elemento (además de los cebadores) que debe unirse de forma específica a la secuencia diana (148). Lo anterior sumado a los resultados de sensibilidad y especificidad analíticas obtenidos en la presente investigación, favorece la utilización futura de las estrategias de RT-PCR sobre la PCR a punto final, en las investigaciones y el diagnóstico de la sífilis.

4.1.3 Aplicación de las PCR a las muestras clínicas

4.1.3.1 Comparación de las estrategias de PCR y análisis de los resultados discrepantes entre PCR y serología

La frecuencia de positividad a TPA en las muestras de exudados de lesiones ulceradas en los pacientes estudiados mediante la utilización de la PCR a punto final fue de 23,5 % (53/225), significativamente inferior a la frecuencia de positividad encontrada cuando se utilizaron las RT-PCR, con valores de 51,1 % (115/225, $p < 0,001$) para la que utiliza el gen diana *polA* y 42,2 % (95/225, $p < 0,001$) para los protocolos que tienen como dianas los genes *tpp47* y ADNr 16S. El marcado incremento en la positividad mediante la utilización de las RT-PCR con relación a la PCR a punto final denota la ventaja de utilización de los protocolos de RT-PCR. En el caso particular de la RT-PCR (*polA*) fue posible detectar 9,3 % (21/225) de los casos que escaparon a los protocolos de RT-PCR (*tpp47* y ADNr 16S) (Figura 3). Lo anterior demuestra que en las condiciones del LNRTPE-IPK, la

RT-PCR (*polA*) resultó ser la más sensible; lo que sugiere su utilización para el diagnóstico temprano de la sífilis en muestras clínicas de lesiones ulceradas.

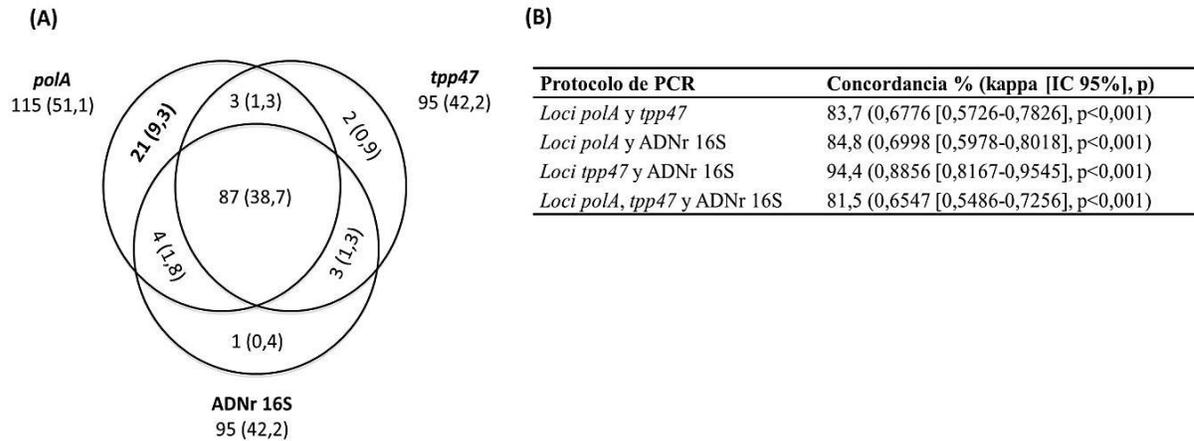


Figura 3. (A) Representación de la positividad a *T. pallidum* subsp. *pallidum* por cada protocolo de RT-PCR evaluado así como la interrelación entre los mismos. Los números fuera de paréntesis representan la frecuencia absoluta o número de muestras positivas por cada RT-PCR y los números entre paréntesis representan el porcentaje o frecuencia relativa de las muestras positivas en relación al total de muestras (n=225). (B) Concordancia entre los protocolos de RT-PCR de acuerdo a los valores obtenidos en la presente investigación. IC: Intervalo de confianza.

Los resultados obtenidos evidencian que el protocolo de PCR a punto final utilizado tiene un límite de detección mucho más bajo que los métodos de RT-PCR, los que, además, permitieron identificar de manera significativa, aproximadamente el doble de los casos infectados con TPA. Estos hallazgos descartan la PCR a punto final como una prueba útil en el diagnóstico temprano de la sífilis, en las condiciones del presente estudio. Sin embargo, se han publicado otros protocolos de PCR a punto final anidadas, con buenos resultados (149) y que pudieran ser utilizados en aquellos laboratorios con recursos limitados.

En relación a los protocolos de RT-PCR, las diferencias encontradas en la positividad pudieran ser resueltas mediante la optimización de los protocolos para los genes dianas *tpp47* y ADNr16S en muestras clínicas (ensayos de límite de detección donde se verifique la influencia de la matriz o componentes de la muestra clínica en la extracción del ADN y

modificación en los parámetros de amplificación y/o mezcla de reacción de la RT-PCR), a pesar de que los tres protocolos de RT-PCR manifestaron igual valor de límite de detección en el ensayo utilizando ADN puro de TPA. En este sentido, se sugiere un incremento de las concentraciones de cebadores y del número de ciclos de amplificación; parámetros que resultan esenciales en la obtención de PCR más sensibles (148). En este punto es necesario considerar la influencia que pudieran tener determinados factores adicionales en las diferencias en la positividad de protocolos de PCR:

i.) La aparición de mutaciones en los sitios de unión de cebadores/sonda a la secuencia diana en los genes *tpp47* y ADNr 16S en determinados aislados de TPA; sin embargo, dado el carácter conservado de las secuencias de dichos genes de acuerdo a los resultados de varios estudios publicados (4, 150, 151), se esperaría una baja probabilidad de aparición de este fenómeno.

ii.) En condiciones en las que puede ocurrir fragmentación del ADN a amplificar se esperaría una menor probabilidad de amplificación en aquellos ADN dañados; sin embargo, el tratamiento a las muestras clínicas desde su toma hasta la extracción del ADN se realizó tomando todas las precauciones para evitar daños del material genético. Además, las tallas de los productos de las PCR utilizadas en este estudio son pequeñas y similares, con 115, 178 y 129 pb para los protocolos RT-PCR (*polA*), RT-PCR (*tpp47*) y RT-PCR (ADNr 16S), respectivamente; lo que sugiere también una baja ocurrencia de reacciones sin amplificación debido a fragmentación del material genético.

Es importante señalar que solo hay un estudio reportado con enfoque de meta-análisis que compara el desempeño de las estrategias de RT-PCR que usan como dianas de amplificación los genes *polA* y *tpp47* para el diagnóstico temprano de la sífilis. Dicho estudio sugiere que no existen diferencias en los parámetros de desempeño de ambas pruebas (76). Los resultados de la presente investigación difieren en este sentido, pues se evidenció que la RT-PCR (*polA*) fue el ensayo que mostró una mayor sensibilidad diagnóstica.

Teniendo en cuenta el resultado de la serología positiva (título por VDRL/RPR y TPHA positiva) y/o la positividad por PCR, en al menos uno de los protocolos evaluados como criterio de laboratorio confirmatorio; de los 225 pacientes estudiados, 53,8 % (121/225) se detectó como positivo por PCR y 45,3 % (102/225) por serología. Los valores de los resultados discrepantes fueron 26,7 % (60/225) de casos con PCR positiva/serología negativa y 18,2 % (41/225) de casos con PCR negativa/serología positiva. Lo anterior determinó un valor bajo de concordancia entre ambas pruebas, de 55,1 % [Kappa=0,1085; IC 0,0194 - 0,2364], p=0,0987]. El cálculo de los parámetros de desempeño de las estrategias de PCR y las pruebas serológicas mostró valores discretos de sensibilidad y valor predictivo negativo como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Parámetros cualitativos de cada prueba evaluada comparados con la definición de caso de sífilis establecida por laboratorio como referencia.

Pruebas	Sensibilidad, % (IC)	Especificidad, % (IC)	VPP, % (IC)	VPN, % (IC)
PCR (<i>poIA</i>)	72,6 (64,6 – 79,4)	100 (98,9 – 100)	100 (99,5 – 100)	53,4 (42,3 – 65,1)
PCR (<i>tpp47</i>)	58,5 (48,7 – 65,2)	100 (98,9 – 100)	100 (99,4 – 100)	43,6 (33,4 – 53,7)
PCR (ADNr 16S)	58,5 (49,7 – 65,2)	100 (98,9 – 100)	100 (99,4 – 100)	43,6 (33,4 – 53,7)
PCR (al menos un <i>locus</i>)	77,1 (69,4 – 83,7)	100 (98,9 – 100)	100 (99,5 – 100)	58,9 (47,4 – 69,7)
VDRL/RPR	68,2 (59,7 – 75,5)	87,4 (76,5 – 97,6)	93,6 (88,4 – 99,1)	46,3 (34,9 – 57,7)
TPHA	68,9 (59,8 – 76,2)	87,4 (76,5 – 97,6)	93,7 (88,5 – 99,1)	46,9 (35,4 – 58,4)
VDRL/RPR + TPHA	63,5 (55 – 71)	100 (98,8 – 100)	100 (99,4 – 100)	46,4 (35,5 – 55,8)

Legenda: La confiabilidad utilizada para el cálculo de los parámetros fue de 95 %. IC: intervalo de confianza. VPP: Valor predictivo positivo. VPN: Valor predictivo negativo.

La baja concordancia encontrada entre ambos métodos (serológico y molecular) exige un análisis crítico que posibilite un mejor entendimiento de los valores discordantes.

PCR positiva y serología negativa:

i.) *PCR positiva y ambas pruebas serológicas (VDRL/RPR y TPHA) negativas.* Esta situación puede aparecer cuando los pacientes se encuentran en la etapa pre-serológica de la infección con una duración descrita de hasta 15 días después de la aparición del chancro. Durante este período las pruebas serológicas aún no ofrecen reactividad ya que los niveles

de anticuerpos detectables no alcanzan los valores de corte de estos ensayos (152). En los pacientes de este grupo, la mediana de los tiempos entre la aparición de las lesiones y el momento de la toma del exudado de la lesión fue de 12 días, lo que podría justificar la etapa pre-serológica en dichos pacientes. Por otro lado, los protocolos de PCR, por lo general son altamente sensibles en las etapas tempranas de la sífilis (69), y los protocolos evaluados en la presente investigación mostraron un límite inferior de detección de 3 geq/reacción, lo que supone una alta sensibilidad del ensayo, teniendo en cuenta que las úlceras sifilíticas usualmente contienen entre $2,2 \times 10^4$ - $5,7 \times 10^6$ treponemas/mL (153).

ii.) *PCR positiva y una de las pruebas serológicas (no treponémica o treponémica) negativa con la otra positiva.* En este estudio, las discrepancias entre los resultados por las pruebas no treponémicas y las treponémicas se consideraron como resultados serológicos negativos, consecuentemente no confirman el episodio activo de sífilis. De los pacientes estudiados en este grupo, siete de ellos tenían resultados positivos por VDRL y negativos por TPHA. Además, los mismos presentaban lesiones con una mediana de 10 días desde su aparición hasta la toma de la muestra y no refirieron una historia de sífilis previa, lo que sugiere una fase bien temprana de la enfermedad en la que los anticuerpos pudieran aún no ser detectables por TPHA. Además, se identificaron ocho pacientes con resultados negativos por VDRL y TPHA positiva que presentaban lesiones con mayor tiempo de evolución (mediana 18 días), cuatro de ellos (50 %) refirieron haber tenido sífilis en el pasado. Todos estos pacientes eran positivos a VIH con un conteo de linfocitos T CD4⁺ ≤ 500 células/mL (comunicación personal del Dr. Orestes Blanco obtenida de la historia clínica de los pacientes), lo que podría explicar la respuesta serológica negativa medida por VDRL.

El porcentaje de pacientes con PCR positiva y serología negativa que se encontró en el presente estudio (26,7 %) es superior a los encontrados en otras investigaciones realizadas en República Checa (2,6 %), Perú (7,7 %) y Argentina (3,7 %) (99, 100, 154). Esto pudiera justificarse por el carácter gratuito y la amplia distribución de los servicios de atención al paciente en Cuba, donde los mismos pueden acceder de manera fácil a las consultas de atención médica cuando hayan sido expuestos a la infección por TPA, debido a un contacto

sexual reciente. Esto justificaría su detección por PCR en las etapas más tempranas de la enfermedad, incluido el periodo pre-serológico.

PCR negativa y serología positiva:

i.) *Úlceras en resolución.* A pesar de la elevada sensibilidad de la PCR, esta prueba puede resultar negativa cuando los pacientes poseen lesiones durante un periodo extendido y la lesión ya se encuentra en fase de resolución, por lo que el patógeno pudiese estar ausente en la úlcera y en fase de diseminación al torrente sanguíneo. En estos casos, se recomienda utilizar además, la sangre para ser examinada por PCR como se describe para los casos de sífilis secundaria (155). Los pacientes incluidos en este grupo tenían lesiones con un tiempo mayor de evolución (mediana 36 días, $p < 0,001$) con relación al grupo con PCR positiva y serología negativa.

ii.) *Tratamiento previo con antimicrobianos:* El tratamiento adecuado con antimicrobianos a un paciente con chancro sífilítico induce a una disminución o eliminación de la carga bacteriana en la lesión. En este estudio, 36,6 % (15/41, $p = 0,043$) de los pacientes de este grupo se sometió a tratamiento empírico con antimicrobianos de elección para la sífilis (se desconocen las dosis y esquemas) durante los últimos 15 días previos a la toma de la muestra clínica, según lo establecido en el Plan Estratégico Nacional (2014-2018) (122) y en las Guías de Tratamiento para Enfermedades de Transmisión Sexual de los CDC (12).

iii.) *Pruebas serológicas falsas positivas y reacción de sero-resistencia.* Los resultados falsos positivos en las pruebas serológicas no treponémicas se han asociado con determinadas condiciones médicas como la post-inmunización, infarto reciente del miocardio, enfermedades infecciosas febriles, embarazos, uso de drogas, enfermedades autoinmunes, infección por el VIH, lepra, tumores malignos, entre otras (60); mientras la reactividad en las pruebas treponémicas persiste de manera indefinida después de un episodio inicial de sífilis por lo que no se consideran marcadores de infección activa por sí solas. En este grupo, 22 % (9/41) de los pacientes reportaron una historia previa de sífilis y todos ellos resultaron estar infectados con el VIH; sin embargo, en seis de estos nueve

casos se verificaron títulos de 16 diluciones o mayores por VDRL; lo que sugiere una infección de sífilis activa. Con relación a otros dos de los restantes tres casos, no se pudo asociar la reactividad por VDRL/RPR con la presencia de la úlcera genital sifilítica ya que los pacientes habían sido tratados un mes antes de la toma de la muestra, lo que podría explicar el resultado VDRL reactivo. Además, es conocida la ocurrencia de sero-resistencia en pacientes que tuvieron sífilis en el pasado y que manifiestan títulos bajos de anticuerpos no treponémicos después del tratamiento (156), como se evidencia en los últimos tres casos clínicos mencionados, donde no se pudo descartar la ocurrencia de este fenómeno.

iv.) *Úlceras no sifilíticas en pacientes con sífilis tratada o latente y en pacientes sifilíticos coinfectados con otra etiología.* Disímiles patógenos, además de TPA, constituyen agentes etiológicos importantes causantes de la enfermedad ulcerada anogenital. Los de mayor frecuencia de aparición son VHS-1/2, *H. ducreyi* (chancro blando) y *C. trachomatis* (linfogramuloma venéreo) (157). En la presente investigación, 46,3 % (19/41) de los pacientes con PCR negativa y serología positiva resultaron además positivos por la PCR a VHS-2 y 4,9 % (2/41) a *C. trachomatis*, hallazgo que podría justificar la negatividad de la PCR a TPA en presencia de la lesión ulcerada. De estos pacientes, 28,6 % (6/21) documentaron episodios previos de sífilis, lo que podría explicar la serología positiva, aunque para cuatro de estos pacientes los episodios anteriores de sífilis ocurrieron con más de un año de antelación y los títulos actuales de VDRL fueron ≥ 16 ; por lo que es plausible pensar en un episodio activo de sífilis. De los dos pacientes restantes no se tuvo información disponible sobre sífilis anterior por lo que no se puede descartar que los mismos estuviesen coinfectados con TPA. Basado en las consideraciones anteriores, se puede asumir que en los dos pacientes que tuvieron sífilis reciente y estuvieron bajo un tratamiento adecuado con antimicrobianos, los resultados por PCR constituyen verdaderos negativos. Para los restantes 39 casos con serología positiva y PCR negativa, no se puede excluir que la serología fue un verdadero positivo indicando un episodio de sífilis activa.

Como se mostró en la tabla 4 y de acuerdo a la definición establecida de caso de sífilis, ambas pruebas individualmente mostraron valores relativamente bajos de sensibilidad

diagnóstica y de VPN, mientras que la especificidad y los VPP de los ensayos de PCR fueron buenos. La baja sensibilidad y consecuentemente el bajo VPN podría ser explicado parcialmente por la dificultad en la interpretación de los datos serológicos debido a la carencia de resultados serológicos previos, ya que es poco probable la determinación certera de si los pacientes con resultados positivos por serología y negativos por PCR tenían una sífilis de larga duración (ej. sífilis latente) y por tanto la PCR sería un verdadero negativo o si se está en presencia de una sífilis adquirida nueva, lo que supondría un resultado falso negativo por la PCR.

Los resultados presentados anteriormente ilustran también los obstáculos en la interpretación de pruebas de laboratorio por sí solas durante las evaluaciones clínicas de rutina.

Después de realizado este análisis de los resultados discrepantes, los datos de la investigación sugieren que una combinación de ambas estrategias, PCR y serología, ofrece una información más certera al diagnóstico final de laboratorio aunque no se debe olvidar la integración de la información clínica y epidemiológica como elementos fundamentales en el cierre del caso clínico. Lo anterior contrasta con lo recientemente reportado por Brischetto y colaboradores (158) quienes plantean que la PCR de TPA añade poco valor clínico sobre la serología en el diagnóstico de la sífilis, al encontrar que la mayor parte de los pacientes con PCR positiva (61/323, 19 %) también tenían la serología positiva (59/61, 97 %) (sensibilidad 68 %, especificidad 99 %, VPP 97 % y VPN 89 %) y de los pacientes (91/223, 28 %) con serología positiva 66 % (61) tenían además la PCR positiva (sensibilidad 97 %, especificidad 88 %, VPP 60 % y VPN 99 %).

4.1.3.2 Frecuencia de *Treponema pallidum* mediante RT-PCR en los pacientes estudiados

Si se asume la positividad por la RT-PCR en al menos un *locus* de los evaluados, para el establecimiento de la frecuencia de sífilis por PCR en los pacientes estudiados; de los 225 pacientes, 53,8 % (121/225) se detectó como positivo por RT-PCR. Estas cifras son considerablemente elevadas si se toman en cuenta los valores obtenidos a nivel

internacional en estudios similares con pacientes que presentan úlceras. En una investigación prospectiva en una clínica de ITS en París, se determinó una frecuencia de infección por TPA de 40 % (159), mientras que otro estudio realizado en HSH en ocho clínicas de India refirió 23 % de los pacientes con TPA (160) utilizando RT-PCR. En Malawi solo el 6 % de los pacientes estudiados con lesiones genitales resultaron positivos a TPA por PCR (161). En Tanzania, Uganda y Senegal se reportaron valores de frecuencia de TPA en pacientes con lesiones ulceradas con cifras que oscilaron entre 2 y 25 % (162-164).

Sin embargo, si se explora en los pocos estudios realizados en América Latina y el Caribe se encuentra un reporte realizado en Brasil, donde se reportó una baja frecuencia de infección por TPA de 8 % en pacientes con enfermedad genital ulcerada, residentes en Manaus (165). Otro estudio en Perú, realizado en 26 pacientes con lesiones genitales sugerentes de chancro sifilítico mostró una frecuencia de positividad a TPA de 54 % (14/26) mediante PCR (154); resultados similares a los encontrados en la presente investigación. En Argentina, sin embargo, se reportaron cifras elevadas de positividad a TPA en un estudio con 54 muestras clínicas (exudados de lesiones genitales, sangre y LCR), donde 79,6 % (43/54) de las muestras resultaron positivas por PCR (100).

Lo anterior demuestra que la realización de estudios similares al presentado en esta investigación, pudiera demostrar la problemática que supone esta ITS para las Américas. Además, contar con herramientas confiables y rápidas para un diagnóstico oportuno de la enfermedad impactará de forma positiva en los programas de control de la sífilis en Cuba y en el mundo.

4.2 Predictores de riesgo para la adquisición de la infección por *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*

La tabla 5 resume las características clínico-epidemiológicas de los pacientes incluidos en el estudio. En dicha tabla, se evidencia que 85 % de los pacientes estudiados proviene de la provincia de La Habana; este aspecto limita el alcance de las inferencias del estudio a aquellos pacientes (en su mayoría de esta provincia) que asistieron a la consulta de dermatología del IPK en el periodo de la investigación. El porcentaje de pacientes

identificados como HSH fue significativamente superior al porcentaje de heterosexuales (71,6 % vs. 28,4 %; $p < 0,001$). De los pacientes estudiados, 77,8 % no refirió el uso del condón y 60,4 % era seropositivo al VIH.

Tabla 5. Características clínico-epidemiológicas de la población estudiada.

Características N=225	Pacientes n (%)	Características N=225	Pacientes n (%)
<i>Residencia</i>		Mediana de la edad (IQR), años	31 (24-43)
Pinar del Río	1 (0,4)	<i>Orientación sexual</i>	
La Habana	191 (85)	Homosexual (HSH)	161 (71,6)
Artemisa	12 (5,3)	Heterosexual	64 (28,4)
Mayabeque	7 (3,1)	Parejas sexuales múltiples *	138 (61,3)
Matanzas	4 (1,8)	No uso del condón	175 (77,8)
Villa Clara	4 (1,8)	Seropositividad al VIH	136 (60,4)
Ciego de Ávila	1 (0,4)	<i>ITS previas</i>	87 (38,7)
Holguín	2 (0,9)	Sífilis	34 (15,1)
Granma	1 (0,4)	Condiloma	21 (9,3)
Santiago de Cuba	2 (0,9)	Herpes simple	7 (3,2)
<i>Año de toma de la muestra</i>		Blenorragia	33 (14,7)
2012	15 (6,7)	Hepatitis B	3 (1,3)
2013	23 (10,2)	<i>Localización de las lesiones</i>	
2014	45 (20)	Genital	191 (84,9)
2015	51 (22,7)	Oral	13 (5,8)
2016	54 (24)	Anal	21 (9,3)
2017	37 (16,4)	<i>Número de lesiones</i>	
<i>Relaciones sexuales con extranjeros*</i>	14 (6)	Múltiples	140 (62,2)
EUA	5 (2,2)	Única	85 (37,8)
Rusia	2 (0,9)	<i>Tiempo con la lesión (días)</i>	
Ecuador	3 (1,3)	0-15	132 (58,7)
Canadá	1 (0,4)	>15	93 (41,3)
España	1 (0,4)	Lesión indolora	161 (71,6)
Alemania	1 (0,4)	Lesión exudativa	57 (25,3)
Italia	1 (0,4)		

Leyenda: * durante los últimos 6 meses. IQR, intercuartil.

El análisis de regresión logística univariada mostró asociación entre determinadas variables y la infección con TPA. En este sentido, la infección fue más frecuente en los pacientes con edades por debajo de 40 años ($p=0,006$; RP: 6,98 [95 % IC: 3,44 - 14,83]), en los HSH ($p=0,004$; RP: 4,9 [95 % IC: 2,34 - 10,45]), en los que refirieron no usar condón ($p=0,009$; RP: 3,35 [95 % IC: 1,34 - 12,85]), en los individuos seropositivos al VIH ($p=0,012$; RP: 2,19 [95 % IC: 1,02 - 5,01]) y en pacientes en los que se confirmó la presencia de lesiones múltiples ($p=0,031$; RP: 2,24 [95 % IC: 1,19 - 4,69]).

Por otra parte, la estimación de variables de riesgo en el análisis multivariado donde se excluyó la variable relacionada con la presencia de lesiones múltiples por constituir una variable de tipo clínica y no conductual; mostró, al igual que en el análisis univariado, que las edades entre 15 y 40 años ($p=0,001$; OR: 12,42 [95 % IC: 2,85 - 48,85]), la seropositividad al VIH ($p=0,007$; OR: 3,44 [95 % IC: 1,37 - 8,64]), las relaciones sexuales entre hombres (HSH) ($p=0,005$; OR: 4,01 [95 % IC: 1,98 - 9,34]) y el no uso del condón ($p=0,042$; OR: 3,62 [95 % IC: 1,07 - 10,85]) constituyeron predictores de riesgo para el desarrollo de lesiones por TPA en la población estudiada.

Es conocido que en edades jóvenes de la vida aumenta la probabilidad de adquisición de ITS debido a la actividad sexual incrementada, la sífilis no escapa de esta situación con énfasis en la última década donde ha existido un alza de esta ITS en el país (21). Diversos autores reportan la aparición de sífilis con mayor frecuencia en personas jóvenes (166-168) sexualmente activas y refieren como posibles causas de este fenómeno la inexperiencia, la falta de educación sexual unido a la poca percepción de riesgo que usualmente se presenta en edades tempranas.

De los pacientes incluidos en la presente investigación, 71,6 % refirieron tener sexo con otros hombres y particularmente estos pacientes tuvieron una mayor probabilidad de infección por TPA. Existen condiciones fisiológicas que favorecen la aparición de ITS en este grupo como son: la mayor vascularización de la región anal en relación a la vaginal y la considerable superficie expuesta (el recto) a las secreciones en los HSH anorreceptivos, donde también pueden permanecer por más tiempo las secreciones de su pareja, lo que exagera el riesgo de infección por TPA (54).

En múltiples estudios se ha corroborado que el uso del condón protege con una efectividad considerable contra las ITS (169, 170); sin embargo, solo 22,2 % de la población estudiada refirió su uso de forma habitual. Estas cifras entran en contradicción con las políticas de educación sexual y de prevención que se desarrollan en Cuba, dirigidas fundamentalmente a grupos claves para evitar la adquisición de ITS. Aunque se desconoce el nivel de escolaridad y socio-cultural de los pacientes estudiados, es válido destacar que en su

mayoría reflejan conductas sexuales de riesgo; lo que podría explicar el no uso del condón y consecuentemente, la adquisición de sífilis y potencialmente de otras ITS.

Con relación a la seropositividad al VIH, es conocido que este virus ataca el sistema inmune (linfocitos T CD4⁺, monocitos, macrófagos, células de la microglia y células dendríticas) y debilita los sistemas de defensa contra las infecciones, por lo que modifica el desarrollo clínico de la infección sifilítica y la respuesta terapéutica (171). Por su parte, la presencia de lesiones sifilíticas en las mucosas puede permitir el fácil acceso del VIH a la circulación sanguínea del hospedero, y a su vez la infección por TPA aumenta la actividad inmunológica y la secreción de citoquinas, lo que favorece la replicación viral (5, 172). Lo anterior sugiere a los investigadores plantear un mecanismo de sinergismo entre las infecciones por VIH y TPA (173). Este sinergismo justifica lo evidenciado en el presente estudio donde fue dos veces más probable encontrar sífilis en pacientes infectados con VIH que en los seronegativos.

Como hallazgo inusual en el presente estudio, se demostró la probabilidad casi dos veces mayor de encontrar infección con TPA en pacientes con úlceras múltiples con respecto a los que tenían solo una lesión. La sífilis primaria usualmente se manifiesta como una úlcera indolora y solitaria que se desarrolla en el sitio de infección en un tiempo promedio de tres semanas después de la exposición a TPA. Sin embargo, pueden ocurrir diversas presentaciones clínicas de la enfermedad como chancros múltiples, pápulas dolorosas o ausencia de la lesión (54). Además, 70 % de los pacientes infectados con TPA estaban coinfectados con el VIH, por tanto la condición de inmunosupresión de estos pacientes podría constituir un factor importante para el desarrollo de úlceras múltiples.

4.3 Caracterización molecular de los aislados de Treponema pallidum identificadas en los pacientes estudiados

El estudio de la sífilis en pacientes que acuden a las consultas especializadas no solo depende de su detección temprana a partir de herramientas moleculares sensibles, sino también de un monitoreo epidemiológico molecular; que permita distinguir entre las variantes genéticas de TPA más frecuentes según la región en estudio, su asociación con

determinados cuadros clínicos y la resistencia a los antimicrobianos; logrando de esta manera una caracterización molecular adecuada del agente causal de esta ITS.

En la actualidad, existen dos sistemas de caracterización molecular de TPA: el propuesto por los CDC (9); que constituye el método de mayor utilización mundial con más de 3000 muestras clínicas estudiadas y el método recientemente propuesto por investigadores europeos basado en la utilización de MLSA (10). El sistema propuesto por los CDC, a pesar de su amplia utilización y distribución mundial, ha sido cuestionado recientemente debido a la posible variabilidad intra-aislado de los *loci arp* y *tpr* (11). Además, este sistema no explota la diversidad genética contemporánea recientemente descrita por Arora y colaboradores (4). En la presente investigación, se decidió la utilización de los resultados del subtipaje propuesto por los CDC solo para la determinación de la frecuencia y distribución de los subtipos de TPA en Cuba y su comparación con los reportados a nivel internacional. Dicha información se complementó con el método de caracterización por MLSA que permitió además la realización de análisis filogenéticos y genómica comparativa de los aislados cubanos identificados en el presente estudio.

4.3.1 Caracterización molecular de los aislados de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* identificados mediante el método propuesto por los CDC

Actualmente, se sugiere que algunos genes pertenecientes a dos de las familias génicas insertadas en este protocolo de caracterización (*arp* y *tpr*), pueden estar involucrados en los mecanismos de evasión del reconocimiento del sistema inmune en la sífilis latente y en la ocurrencia de la persistencia bacteriana, mediante mecanismos de variabilidad genética (1). Por tanto, la caracterización molecular de TPA, constituye sin dudas, una herramienta efectiva para el control epidemiológico de la sífilis.

De las 83 muestras positivas por las tres RT-PCR utilizadas para el diagnóstico molecular (excluidas cuatro muestras por falta de volumen suficiente, 83/87), 76 % (63/83) resultaron caracterizadas completamente (*loci arp*, *tpr* y TP0548), 6 % (5/83) caracterizadas parcialmente y el resto (18 %, 15/83) resultó no amplificable en los tres *loci* estudiados. La frecuencia de aislados caracterizados completamente superó el 75 % de los mismos lo que

denota una eficacia adecuada de amplificación, restricción y análisis de secuencias utilizando los *loci* estudiados.

Los resultados reflejados en el presente estudio, muestran una elevada diversidad de aislados de TPA con ocho subtipos diferentes (7f/c, 10d/f, 10f/f, 12a/d, 12f/g, 14a/g, 14d/g y 14f/g) considerando solo aquellos que fueron completamente caracterizados, con predominio de los subtipos 14f/g y 14d/g, este último es el de mayor distribución mundial (Figura 4).

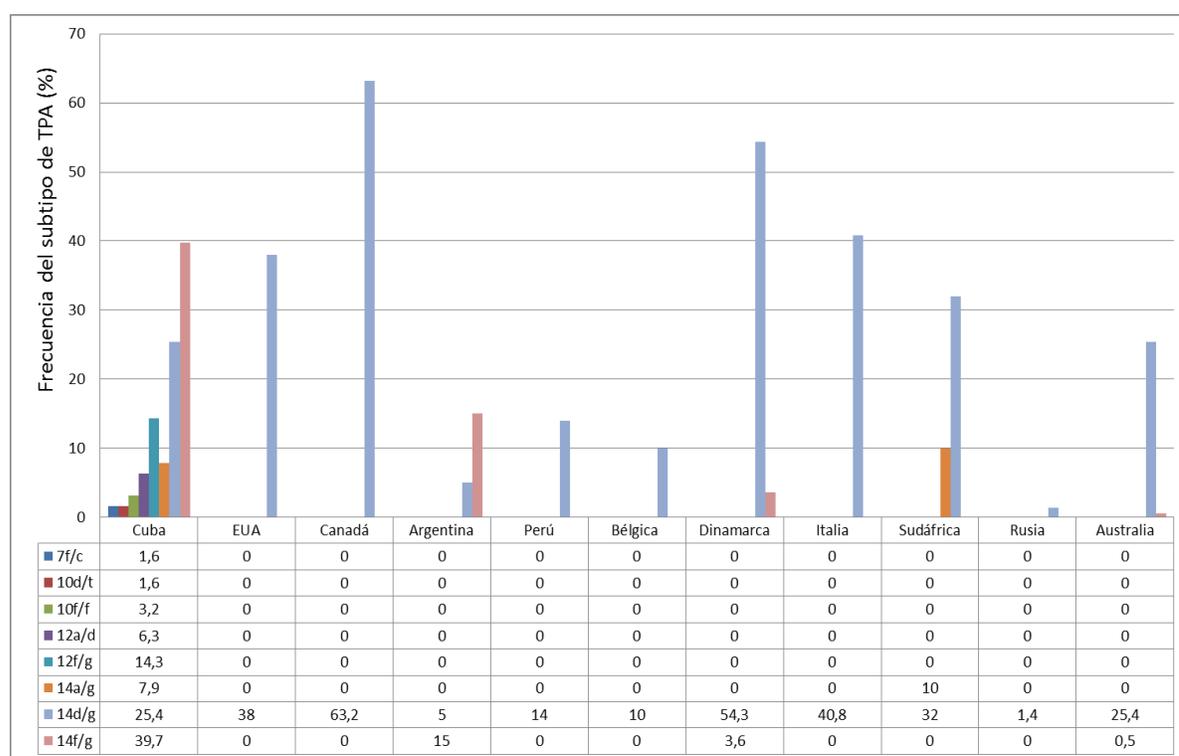


Figura 4. Distribución geográfica y frecuencia de aparición de los subtipos de *T. pallidum* subsp. *pallidum* encontrados en Cuba según el criterio de los CDC mejorado. Este gráfico se construyó basado en las siguientes referencias bibliográficas: EUA (91), Canadá (89), Dinamarca (90), Argentina (100), Perú (154), Bélgica (174), Italia (175), Sudáfrica (85), Rusia (176), Australia (88), Cuba (esta tesis).

El subtipo encontrado con mayor frecuencia fue 14f/g (39,7 %, 25/63), que solo ha sido reportado en Argentina (15 %), Dinamarca (3,6 %) y Australia (0,5 %) (88, 90, 100). Esto demuestra una pobre circulación del mismo a nivel mundial, o al menos en aquellos países

donde se ha llevado a cabo este tipo de estudios. Sin embargo, si no se considera la secuencia del *locus* TP0548 (que aporta la segunda letra del subtipo) recientemente añadido a este sistema de caracterización; el subtipo 14f se ha reportado en países como EUA, Canadá, Dinamarca, Portugal, Taiwán, China y Australia (Figura 5). Sin embargo, la mayor frecuencia de este subtipo se describe en América del Norte (53,3 %) y en Taiwan (50 %). Por ejemplo, en un estudio realizado en el estado de Arizona (EUA) se obtuvo una prevalencia de 53,3 % al analizar 45 muestras (177) y en otro estudio en Carolina del Norte y Carolina del Sur a partir de 28 muestras, la prevalencia fue de 52,2 % (178). Dichos valores de prevalencia son superiores a los encontrados en la presente investigación.

El subtipo 14d/g, o 14d si se obvia el *locus* TP0548, es el subtipo de TPA con mayor distribución a nivel mundial y cuya circulación se da a conocer por primera vez en Cuba a partir de los resultados del presente estudio (Figura 4 y 5). En una investigación llevada a cabo en EUA, se informó una frecuencia de 38 % (91) de este subtipo en pacientes diagnosticados con sífilis en estadios primario y secundario. Es necesario tener en cuenta que la prevalencia de un subtipo u otro constituye un factor intrínseco de cada región, aunque evidentemente entre regiones cercanas debe existir similitud en cuanto a los subtipos que más circulan, sobre todo si existe un constante intercambio entre las poblaciones de ambas zonas geográficas. El subtipo 14d/g también circula en otros países como Sudáfrica, Canadá, Dinamarca, Italia y Australia con frecuencias mayores a 25 % (Figura 4). En cada uno de estos estudios el número de muestras analizadas fue superior al de la presente investigación, por lo que podría existir una mayor probabilidad de encontrar dicho subtipo.

El subtipo 12f/g, con una frecuencia de aparición en Cuba de 14,3 %, no ha sido reportado en otra zona geográfica hasta el momento. Sin embargo, hay reportes del subtipo 12f en EUA (179) con cifras muy similares a las encontradas en el presente estudio (13 %). Hasta la fecha, según la literatura revisada y los resultados que se muestran en este trabajo, parece que el subtipo 12f de TPA es exclusivo de América del Norte y el Caribe.

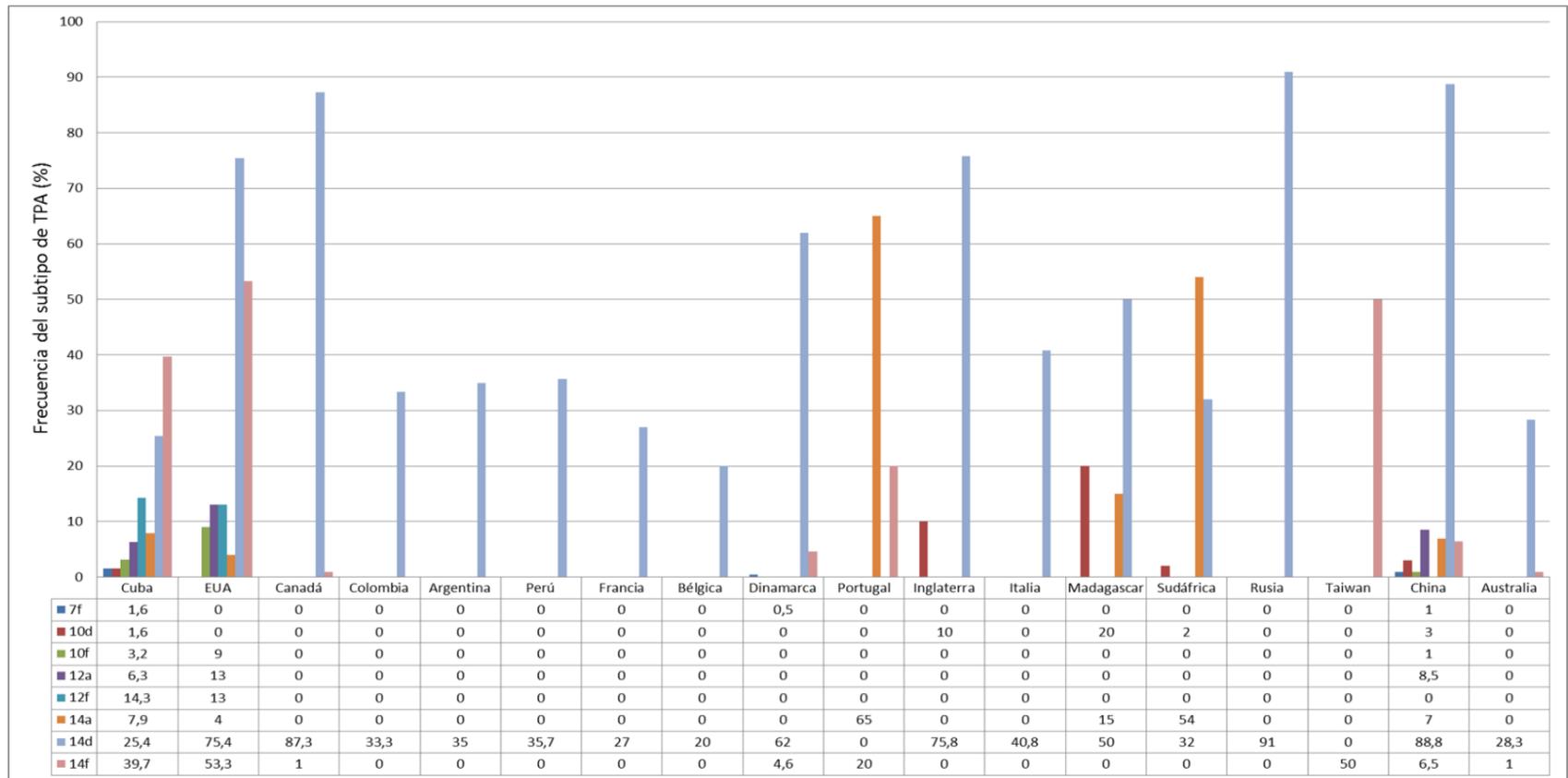


Figura 5. Distribución geográfica y frecuencia de aparición (%) de los subtipos de *T. pallidum* subsp. *pallidum* encontrados en Cuba según el criterio del CDC sin considerar el locus TP0548. Este gráfico se construyó basado en las siguientes referencias bibliográficas: EUA (177-179), Canadá (180), Colombia (155), Argentina (100), Perú (154), Francia (181), Bélgica (174), Dinamarca (90), Portugal (182), Inglaterra (183), Italia (175), Madagascar (184), Sudáfrica (85, 185), Rusia (176), Taiwán (87), China (186-188), Australia (88), Cuba (esta tesis).

Los cinco subtipos restantes encontrados con frecuencias por debajo de 8 % (Figura 4), a excepción del 14a/g (10 %), previamente reportado en Sudáfrica, constituyen subtipos únicos detectados por primera vez en el presente estudio; por lo que se carece de información sobre la circulación geográfica de los mismos. Sin embargo, y siguiendo la línea de pensamiento anterior, si se elimina la segunda letra del subtipo (dado por el *locus* TP0548), el subtipo 14a no es de los más reportados en la región; no obstante, algunos autores lo refieren con una baja prevalencia; por ejemplo, en Arizona (EUA) tuvo una frecuencia de 4 % (179). Las regiones en las que se informa con mayor prevalencia son Pretoria en Sudáfrica (185), Madagascar (184) y Portugal (182) con cifras de 54 %, 15 % y 65 %, respectivamente (Figura 5). Los resultados del presente estudio difieren con los reportes de estos países. Se trata de regiones geográficas distantes de Cuba y con las que existe un limitado intercambio de personas o práctica del turismo, por lo que la probabilidad de su introducción en el país es menor.

En la presente investigación fue posible detectar el subtipo 12a en 6,3 %. Dicho hallazgo es relevante pues no existen reportes previos de la circulación de este subtipo en la región de América Latina y el Caribe. El mismo solo se ha encontrado en China (188) con una frecuencia de 8,5 % y en el estudio realizado en Phoenix, EUA, con una prevalencia de 13 % (184). Los datos obtenidos en este estudio resultan similares a los reportados por los autores chinos.

La prevalencia del subtipo 7f en este estudio es ligeramente superior a la que se informa en investigaciones realizadas en China y Dinamarca (90, 189). Dicho subtipo es muy poco frecuente a escala mundial, con cifras por debajo de 1 % en las zonas geográficas antes mencionadas.

El subtipo 10f se describe fundamentalmente en el Norte y Sur de China con una prevalencia de 1 % (186). En los pacientes cubanos estudiados, se obtuvo una frecuencia mayor a la informada en China y menor a la reportada en un estudio realizado en EUA (9 %) (178).

El subtipo 10d se ha encontrado, además de en Cuba, en Inglaterra, Madagascar, Sudáfrica y China (183-185, 187), con cifras que superan 10 % en Inglaterra y Madagascar. Este subtipo parece circular con mayor frecuencia fuera de las Américas.

En la región de Latinoamérica, hasta la fecha y según la literatura revisada, solo se han realizado tres estudios donde se han identificado los subtipos de TPA circulantes. En Colombia, se informó que los subtipos de mayor distribución son el 14d y 16d, ambos con 33,3 % de prevalencia (155). En Perú, solo se encontraron los subtipos 14d/f (21 %), 14d/g (14 %) y 15d/g (14 %) (154) mientras que en Argentina existió un predominio de los subtipos 14d/d y 14d/f (ambos 15 %) (100).

Un aspecto a tener en cuenta en la variabilidad de subtipos son las recientes migraciones a otros países, así como la entrada de personal extranjero al país. No se puede ignorar tampoco a las personas que ejercen el sexo transaccional, pues esta práctica constituye un factor de riesgo en todos los países donde la sífilis es considerada una enfermedad de alta prevalencia. Estas conductas de riesgo pudieran ser una puerta de entrada que justifique la alta variabilidad genética, debido a la variedad de subtipos identificados en la presente investigación.

4.3.2 Caracterización molecular de los aislados de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* identificados mediante MLSA

De las 83 muestras identificadas previamente como positivas por las tres RT-PCR para diagnóstico, 94 % (78/83) resultaron caracterizadas completamente (positivas por las PCR anidadas y secuenciadas para los tres *loci*: TP0136, TP0548 y TP0705), 3,6 % (3/83) resultaron caracterizadas parcialmente (positivas por las PCR anidadas y secuenciadas para al menos uno de los tres *loci* estudiados) y 2,4 % (2/83) de los aislados no amplificaron por las PCR anidadas.

4.3.2.1 Identificación molecular de *Treponema pallidum* subsp. *endemicum* en los pacientes estudiados

Contrariamente a lo esperado, en nueve de los pacientes estudiados (9/78; 11,5 %) se determinó que los aislados caracterizados tenían una mayor similitud nucleotídica con el genoma de la cepa Bosnia A (Código de acceso en [GenBank](#), CP007548.1) en los *loci* TP0136 y TP0548. Dicha cepa contiene el único genoma completo reportado de TEN, el agente infeccioso causante de bejel o sífilis endémica. Este hallazgo inesperado impuso el diseño de un nuevo sistema de caracterización molecular que permitiese la verificación y una mejor distinción de las subespecies de *T. pallidum* (acápites 3.4.2.1 de Materiales y Métodos). Después de un riguroso análisis de secuencias, se seleccionaron nueve *loci* (dos de los ya utilizados y siete nuevos *loci*) para su inserción en la nueva propuesta de caracterización molecular, cinco de ellos tienen polimorfismos que indican una distinción evidente entre TPA/TEN/TPE (TP0136, TP0367, TP0859, TP0861 y TP0865), otros tres *loci* de reciente identificación como altamente variables y/o recombinantes (TP0326, TP0488 y TP0548) (4, 34) y un *locus* conservado en las tres subespecies (ADNr 16S). Los cebadores para la amplificación de cada uno de estos *loci* se encuentran en Anexo 3.

Las secuencias obtenidas de cada muestra (Códigos de acceso en [GenBank](#), MG002635-MG002643), fueron idénticas entre sí y el esquema MLSA evidenció la clasificación de TEN en cada uno de los nueve *loci* evaluados. Además, de las 328 posiciones variables de nucleótidos encontradas en el alineamiento de las secuencias concatenadas (6831 pb), se identificaron 263 PIS, de los cuales se determinó la presencia de 87 (33 %) PIS que permitieron la distinción entre TEN/TPE y 82 (31,2 %) sitios que podían distinguir entre TEN/TPA.

El árbol filogenético representado en la figura 6, muestra a los aislados identificados en Cuba como parte de un grupo monofilético con otros aislados de TEN correspondientes a secuencias completas o parciales de los genomas Bosnia A, Iraq B y 11q/j.

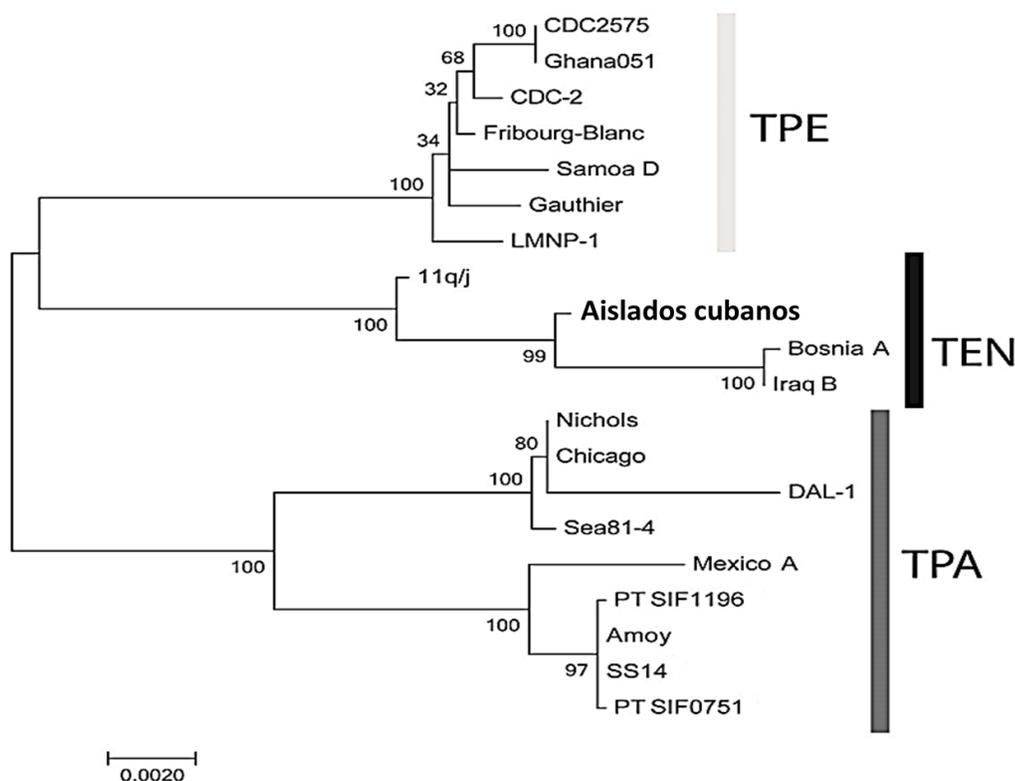


Figura 6. Árbol filogenético de máxima verosimilitud construido con el programa Mega 6 a partir de la concatenación de los *loci* TP0136, TP0326, TP0367, TP0488, TP0548, TP0859, TP0861, TP0865 y ADNr 16S (6831 pb) de aislados reportados internacionalmente de *T. pallidum* subsp. *pallidum*/*T. pallidum* subsp. *pertenue*/*T. pallidum* subsp. *endemicum* y de los aislados cubanos (se representa solo una secuencia concatenada de un aislado cubano de *T. pallidum* subsp. *endemicum* ya que todas las secuencias son idénticas). Para la construcción del árbol se utilizó el modelo de Tamura-Nei. La escala se corresponde con el número de sustituciones por sitio.

Se identificaron cuatro *loci* (TP0326, TP0367, TP0861 y TP0865) completamente idénticos a las secuencias de la cepa TEN Bosnia A, tres *loci* (TP0548, TP0859 y 16S rDNA) que poseían una diferencia de simple nucleótido comparado con TEN Bosnia A, el *locus* TP0136 mostró cinco SNP con respecto a TEN Bosnia A y el *locus* TP0488 fue idéntico al aislado 11q/j de TEN (Tabla 6). La concatenación de las secuencias de los nueve *loci* en los aislados cubanos mostró 35 SNP cuando se comparó con la cepa TEN

Bosnia A, lo que indica que los aislados cubanos no son genéticamente idénticos a la cepa de referencia europea Bosnia A.

Tabla 6. Regiones génicas amplificadas y secuenciadas de los aislados cubanos de TEN.

<i>Locus</i>	Coordenadas ^a /Talla	Diferencias en la secuencia nucleotídica de los aislados cubanos con relación a las cepas/aislados de TEN previamente reportadas (TEN Bosnia A y TEN 11q/j)
TP0136	158255-159291 (1037 pb)	G382A, G587C, C602A, A604G, C605G (comparado con TENDBA ^b _0136)
TP0326	345061-345643 (583 pb)	Idéntica a TENDBA_0326
TP0367	390761-391609 (849 pb)	Idéntica a TENDBA_0367
TP0488	521120-521624 (505 pb)	Idéntica a TEND11qj ^c _0488
TP0548	591302-592198 (897 pb)	G178A (comparado con TENDBA_0548)
TP0859	935711-936473 (763 pb)	Delección 686 (comparado con TENDBA_0859)
TP0861	936861-937404 (544 pb)	Idéntica a TENDBA_0861
TP0865	943209-944113 (905 pb)	Idéntica a TENDBA_0865
ADNr 16S	232067-232684 (618 pb)	Idéntica a TEND11qj_r0001

Leyenda: ^aDe acuerdo al genoma de TEN Bosnia A (Código de acceso en [GenBank](#), CP007548.1).

^b*Treponema pallidum* subsp. *endemicum* cepa Bosnia A.

^c*Treponema pallidum* subsp. *endemicum* aislado 11q/j.

De los 35 SNP, 80 % (28/35) de ellos se encontraron en el *locus* TP0488, que de manera particular se mostró idéntico al aislado TEN 11q/j recientemente caracterizado de una lesión primaria en Francia (95). También se determinó una región de 505 pb de este *locus* con secuencia nucleotídica idéntica a aislados de TPA, lo que sugiere un evento de recombinación ocurrido en el pasado entre TPA y TEN durante su evolución. Los eventos de recombinación entre diferentes subespecies de *T. pallidum* se han descrito con anterioridad por diferentes autores (35, 36, 190) lo que hace de este mecanismo de transferencia de ADN, la principal fuente de variabilidad genética de este patógeno.

Es conocido que la serología no es capaz de distinguir entre la sífilis venérea y las treponemosis endémicas (ej. bejel y pian); por lo que el diagnóstico final se basa en la combinación de los resultados serológicos unido a la sintomatología clínica en un contexto geográfico determinado (5). Ello está dado por el acceso limitado, de los países donde se reconocen estas otras treponemosis, a las tecnologías moleculares basadas en PCR, las cuales permiten la diferenciación de TPA con TPE y TEN (191).

La sintomatología clínica de los pacientes cubanos con bejel no permitió la diferenciación entre sífilis venérea y bejel, las úlceras se manifestaron en el glande o cuerpo del pene y de ellas 89 % (8/9) fueron múltiples. Además, 44 % (4/9) de los pacientes se les detectó linfadenopatía inguinal bilateral, signo característico de la etapa primaria en la sífilis venérea.

Bejel es calificada como una treponematosi extremadamente rara y su prevalencia real permanece desconocida. En general, se considera una enfermedad de tipo no venérea que aparece en climas secos y se clasifica como endémica en la región Sahel de África y en la Península Arábiga (125). Sin embargo, los aislados cubanos de TEN identificados y caracterizados en el presente estudio, sugieren que bejel también puede encontrarse en climas cálidos y húmedos. Otro aspecto relevante es el sitio anatómico de la toma de la muestra clínica, evidenciando la presencia de TEN en lesiones genitales ulceradas de pacientes con elevado riesgo de adquisición de patógenos por vía sexual. De los pacientes con bejel, 89 % (8/9) refirieron tener parejas sexuales múltiples y 100 % (9/9) no usaron condón durante sus relaciones sexuales, 78 % (7/9) son HSH y estaban coinfectados con VIH.

Lo anterior, unido a la reciente e inusual descripción de TEN en una lesión sifilítica genital primaria en un paciente francés que regresaba de Pakistán (95) y que además admitió haber tenido relación sexual con una trabajadora comercial del sexo, sustenta la hipótesis de la transmisión sexual de bejel. En este punto, cabría preguntarse si existe alguna característica especial en TPA que posibilite su transmisión por vía sexual, que no existe en las restantes treponematosi. Sin embargo, es conocido que TPA es también transmitido por vía no venérea y varias décadas atrás, cuando se carecía de información y de determinadas precauciones médicas, los estomatólogos desarrollaban chancros en los dedos de las manos después de la exposición a lesiones orales de pacientes con sífilis. Así mismo, las madres de bebés con sífilis congénita desarrollaban chancros en los pezones cuando amamantaban a sus hijos (192). Más recientemente, en la literatura científica se reportan varios ejemplos de transmisión directa no sexual de TPA (193-195).

Lo anterior unido al hallazgo de esta investigación pudiera sugerir que tanto TPA como TEN son capaces de transmitirse tanto por vía sexual como por vía no sexual mediante contacto directo; lo que es consistente con la predicción realizada por Mulligan y colaboradores (196), quienes plantean que el modo de transmisión de los treponemas parece estar mayormente definido por la oportunidad y no por la biología de los microorganismos.

De acuerdo a los hallazgos obtenidos en la presente investigación y en correspondencia con lo planteado por Lukehart y Giacani, 2014 (192); a pesar de las particularidades descritas en la presentación clínica de las treponematosis que han definido a la sífilis venérea, a bejel y pian como tres enfermedades independientes, las sintomatologías de éstas se pueden solapar. La literatura posee ejemplos de casos clínicos donde se ha demostrado la aparición de síntomas típicos de una determinada treponematosis cuando resulta ser otra, o durante la descripción de un caso en el que se sugiere una determinada treponematosis aparecen manifestaciones clínicas descritas para otra. Es válido mencionar que la mayoría de los estudios anteriores adolecen de la identificación molecular del agente infeccioso, pues la confirmación se realizó a partir de la información clínica, epidemiológica y en algunos casos se apoyó en pruebas de laboratorio que no permiten la diferenciación entre las subespecies de *T. pallidum*.

Lo planteado anteriormente conduce a un nuevo cuestionamiento: ¿Es realmente un dogma la falta de invasividad de las llamadas treponematosis no venéreas? La literatura contiene reportes de afecciones neurológico-cardiovasculares en pacientes diagnosticados con pian (197-200) y de un hallazgo de lesiones genitales en un paciente con bejel (95). También hay reportes de abortos asociados con infección transplacentaria en mujeres con bejel (201). En el modelo de hámster para infección congénita, un estudio demostró que la cepa Nichols de TPA era capaz de desarrollar exitosamente la transmisión de madre a hijo, mientras que la cepa Haití B se mostró incapaz de desarrollar la infección congénita (202). Estos resultados sugieren la incapacidad de infección congénita de TPE; sin embargo, estudios moleculares posteriores demostraron que la cepa Haití B pertenece a TPA y no a TPE. Knauf y colaboradores demostraron

que las lesiones genitales destructivas aparentemente transmitidas por vía sexual en babuinos salvajes de Tanzania, parecieron ser causadas por un aislado de *T. pallidum* más estrechamente relacionado a TPE (203).

Lo antes expuesto demuestra el reto que supone la identificación de una treponematosi u otra con base solo en las manifestaciones clínicas y que la virulencia de las subespecies de *T. pallidum* unido a la aparición de cuadros clínicos disímiles debe ser estudiada con mayor profundidad.

Como se describió previamente, las secuencias de TEN obtenidas de todos los pacientes son idénticas entre sí, lo que de forma preliminar sugiere una distribución clonal de TEN infectando la población cubana. Además, las muestras identificadas como positivas a TEN se colectaron en cada año de estudio (2012-2017) apuntando a un comportamiento endémico de este patógeno en Cuba, apoyado también en que todos de los pacientes con bejel refirieron no tener sexo con extranjeros ni haber salido al exterior. Sin embargo, debido al número bajo de casos identificados es imposible, en este punto, discutir sobre cuán plausible pudiera ser lo antes mencionado. Estos resultados son similares a lo descrito en África, donde se determinó la circulación de aislados de TPE genéticamente estables durante siete años consecutivos (204).

Este trabajo constituye el primer reporte de casos de bejel donde se pudiera sugerir su carácter endémico en el hemisferio occidental, lo cual demuestra una limitación evidente en su diagnóstico basado solamente en pruebas serológicas, manifestaciones clínicas y epidemiología.

Los resultados obtenidos impactan de forma significativa en la epidemiología y presentación clínica de esta treponematosi al romper con dogmas preestablecidos relacionados al carácter no venéreo de esta infección, a la aparición de manifestaciones clínicas en localizaciones extragenitales y a la distribución geográfica localizada de bejel. Este hallazgo incita a una caracterización profunda de los aislados de *T. pallidum* en aquellos países de elevada incidencia de sífilis venérea y constituye un llamado a las autoridades cubanas para la realización de investigaciones relacionadas a nivel nacional.

4.3.2.1 Genotipos de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* identificados y análisis filogenético

TPA se considera una bacteria monomórfica de distribución clonal que posee diferencias mínimas en su genoma (33). Sin embargo, existen determinadas regiones variables entre cepas/aislados de TPA que posibilitan su clasificación en dos grupos genéticos distintos, como se ha reportado en varios estudios anteriores (4, 10, 205-209). Dichos grupos se nombran Nichols-like y SS14-like de acuerdo a su similitud nucleotídica comparado con las cepas de referencia Nichols y SS14 de TPA, respectivamente.

Excluyendo los aislados de TEN identificados, en la presente investigación se determinaron siete perfiles alélicos o genotipos diferentes de TPA en los 69 aislados de pacientes completamente caracterizados por MLSA (Tabla 7).

Tabla 7. Frecuencia de genotipos y descripción de los *loci* TP0136, TP0548 y TP0705 de los aislados de *T. pallidum* subsp. *pallidum* identificados en el estudio (n=69).

Genotipo	Locus TP0136 ^b	Locus TP0548 ^b	Locus TP0705 ^b	Grupo genético	Frecuencia (%)
1.1.1	Idéntico a SS14	Idéntico a SS14	A1973G, G2122A	<u>SS14-like</u>	1/69 (1,4)
1.1.10	Idéntico a SS14	Idéntico a SS14	Idéntico a SS14	<u>SS14-like</u>	1/69 (1,4)
1.3.1	Idéntico a SS14	G154A, G158A	A1973G, G2122A	<u>SS14-like</u>	60/69 (87)
9.24.8^a	G1205A	G170A, G478A	C1517T	<u>Nichols-like</u>	1/69 (1,4)
9.25.8^a	G154A, G170A, G478A	G154A, G170A, G478A	C1517T	<u>Nichols-like</u>	1/69 (1,4)
15.7.3^a	Quimérico (SS14/Nichols)	G170A, C208A	G1516A	<u>Nichols-like</u>	4/69 (6)
16.3.1	Delección de 96 nt (229-324), G667A, G742A, G763C, G815A	G154A, G158A	A1973G, G2122A	<u>SS14-like</u>	1/69 (1,4)

Leyenda: ^aLas nuevas variantes alélicas se describen en letra negrita.

^bLas coordenadas de los polimorfismos de simple nucleótido se corresponden a las posiciones en los genes TPASS_0136, TPASS_0548 y TPASS_0705 (*T. pallidum* subsp. *pallidum* cepa SS14; CP004011.1) si los genotipos pertenecen al grupo SS14-like; o a las posiciones en los genes TPANIC_0136, TPANIC_0548 y TPANIC_0705 (*T. pallidum* subsp. *pallidum* cepa Nichols; CP004010.2), si los genotipos pertenecen al grupo Nichols-like.

El genotipo 1.3.1 perteneciente al grupo filogenético SS14-like, se observó como el más frecuente al comprender 87 % (60/69) de los aislados completamente caracterizados,

siendo además el único genotipo detectado en cada año de estudio (2012-2017). Se determinaron otros tres genotipos pertenecientes al grupo SS14-like (1.1.1, 1.1.10 y 16.3.1) y tres genotipos del grupo filogenético Nichols-like de nomenclatura 9.24.8, 9.25.8 y 15.7.3; lo que demuestra, al igual que la aplicación del protocolo de los CDC mejorado, la elevada diversidad genética de TPA circulante en los pacientes estudiados.

El genotipo 16.3.1 mostró una secuencia particular que consiste en una deleción de 96 nucleótidos y cuatro SNP en el *locus* TP0136, comparado con el de la cepa de referencia TPA SS14 (Código de acceso en GenBank, CP004011.2), lo que resulta en una disminución de secuencias repetidas, fenómeno característico de la estructura modular del gen TP0136 en TPA (210).

Más relevante aún, resultó la identificación del genotipo 15.7.3, obtenido en las muestras de cuatro pacientes, con la secuencia del *locus* TP0136 con mayor similitud nucleotídica al de la cepa SS14-like (953 nucleótidos idénticos de 964 que posee la región analizada) y al mismo tiempo, el *locus* TP0548 exceptuando dos SNP (G170A, C208A) resultó ser idéntico a la cepa Nichols-like (TPANIC_0548, código de acceso en GenBank, CP004010.1). Lo anterior sugiere de manera preliminar que la variante alélica TP_0136_15 parece tener un carácter quimérico (Figura 7), dado probablemente por eventos previos de recombinación.

Como se mencionó anteriormente, la recombinación genética en treponemas ya se ha descrito en varias ocasiones (35, 36, 190); sin embargo, esta es la primera vez que se describe este fenómeno entre miembros de diferentes grupos genéticos de TPA.

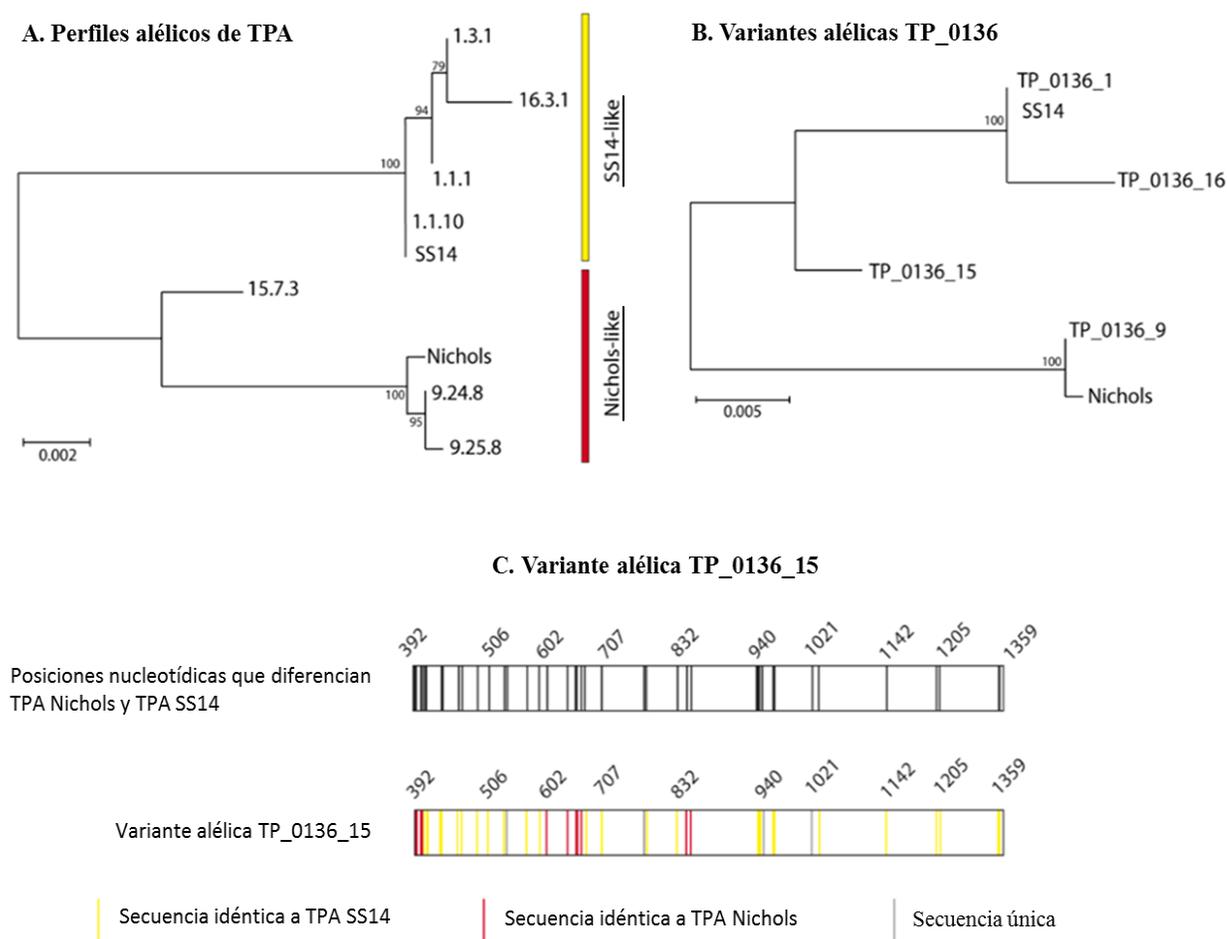


Figura 7. (A) Árbol filogenético de máxima verosimilitud construido en Mega 6 utilizando las secuencias concatenadas de los *loci* utilizados en el MLSA (TP0136, TP0548, TP0705; 2645 pb) en los perfiles alélicos o genotipos encontrados en la investigación (n=69). Como referencia se utilizaron las secuencias CP004010.1 y CP004011.2 (según código de acceso en [GenBank](#)) de TPA Nichols y TPA SS14, respectivamente. (B) Árbol filogenético de máxima verosimilitud de las variantes alélicas TP0136 (964 pb) obtenidas de los aislados de TPA cubanos. (C) Esquema representativo de la proporción general de polimorfismos de simple nucleótido de la variante alélica TP_0136_15 con relación a las cepas de referencia descritas en el apéndice B de la presente figura.

Para la identificación correcta del grupo genético al que pertenece el genotipo 15.7.3 se hizo necesario la selección de dos *loci* adicionales que fueran capaces de distinguir con mayor agudeza entre los grupos genéticos SS14-like y Nichols-like (acápite 3.4.2.2 de Materiales y Métodos). El genoma de la cepa de referencia Nichols contiene siete

deleciones, seis inserciones y 405 SNP comparado con la cepa de referencia SS14. De acuerdo a los PIS identificados en siete *loci* estudiados, se determinó a los *loci* TP0179 y TP0558 como los mejores candidatos por presentar 88,9 % (8/9) y 100 % (5/5) de PIS, respectivamente (Tabla 8). Los cebadores para la amplificación de estos dos nuevos *loci* se encuentran en Anexo 3.

Tabla 8. Sitios de parsimonia de los *loci* evaluados para la distinción de los grupos genéticos SS14-like and Nichols-like.

<i>Locus</i>	SNP entre SS14 y Nichols	SNP en los genomas examinados	PIS ^a	PIS (%)	Función de la proteína codificada
TP0136	49	68	46	67,6	Proteína de unión a fibronectina
TP0179	8	9	8	88,9	Proteína hipotética
TP0326	12	19	2	10,5	Proteína de membrana externa
TP0462	7	43	0	0	Lipoproteína putativa
TP0515	10	16	1	6,3	Proteína de membrana externa
TP0548	30	38	25	65,8	Proteína de membrana externa
TP0558	5	5	5	100	Transportador putativo de níquel-cobalto

Leyenda: ^aSitios informativos de parsimonia (PIS) que distinguen entre los aislados Nichols-like y SS14-like; se excluyeron del análisis las regiones repetitivas, las regiones intragénicas y las regiones parálogas. Solo se muestran los polimorfismos de simple nucleótido (SNP).

El análisis adicional de las secuencias de los mencionados *loci* en el genotipo 15.7.3 confirmó que el mismo es un miembro verdadero del grupo genético Nichols-like al obtener 100 % de identidad de secuencias con la cepa de referencia TPA Nichols. Esto demuestra el carácter quimérico del *locus* TP0136 como se reveló por inspección manual de las secuencias (Figura 7 C).

En correspondencia con las descripciones mundiales contemporáneas a partir de muestras clínicas humanas, en el presente estudio 91,3 % (63/69) de los aislados de TPA identificados pertenecieron al grupo SS14-like y solo 8,7 % (6/69) al grupo Nichols-like, aunque vale destacar que existió un equilibrio entre el número de genotipos diferentes pertenecientes a cada grupo genético (cuatro genotipos de SS14-like y tres genotipos de Nichols-like).

Está descrito que la mayoría de los aislados de TPA analizados hasta la actualidad, a partir de conejos infectados experimentalmente, pertenecen al grupo Nichols-like (4/6;

6,7 %). Sin embargo, la mayor parte de los aislados obtenidos por vía molecular directamente de muestras clínicas de pacientes pertenecen al grupo SS14-like. De hecho, de 2084 muestras clínicas estudiadas con identificación de TPA, 94 % pertenecen al grupo SS14-like (Figura 8) con un evidente predominio de este grupo en cada región geográfica analizada, con excepción de Madagascar donde por alguna razón aún desconocida el 100 % de los aislados identificados pertenecen al grupo Nichols-like.

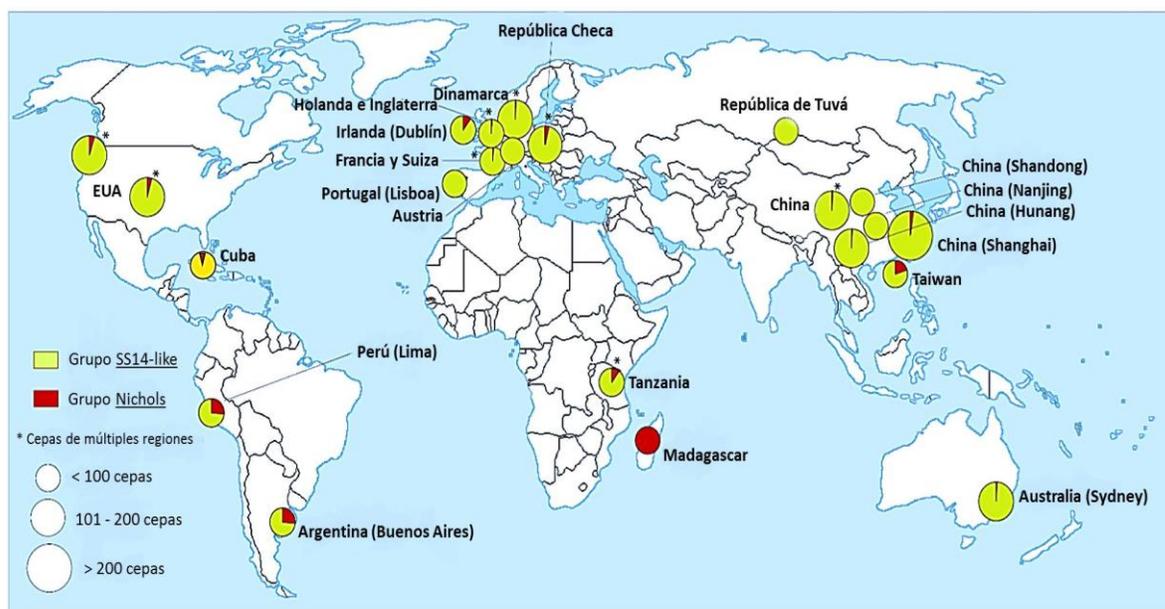


Figura 8. Distribución mundial de la frecuencia absoluta de muestras clínicas caracterizadas con *T. pallidum* subsp. *pallidum* pertenecientes a los grupos genéticos SS14-like y Nichols-like. Las referencias utilizadas para la construcción de la presente figura se describen a continuación: Argentina (100), Australia (88), Austria (4), Bélgica (174), China (9, 188, 189, 211, 212), República Checa (99, 135, 213), Dinamarca (90), Francia (181, 205), Irlanda (9), Madagascar (9), Holanda (4), Perú (154), Portugal (151), República de Tuvá (176), Suiza (4, 10), Taiwán (87), Tanzania (214), Inglaterra (4, 67), EUA (9, 91, 215), Cuba (este estudio).

Una de las explicaciones posibles del fenómeno de distribución temporal desigual entre los grupos genéticos es la diferencia en los momentos en que las muestras fueron colectadas, ya que la mayoría de las cepas de referencia, aisladas y caracterizadas en conejos de experimentación, fueron obtenidas en el siglo pasado (1912 - 1991). Sin embargo, los aislados de TPA recuperados directamente de pacientes han sido

analizados con relativa contemporaneidad (94). Otra explicación pudiera ser la presencia de una determinada ventaja selectiva de los aislados SS14-like sobre los aislados Nichols-like de TPA en humanos o a la inversa en conejos (94). Sin embargo, aunque los aislados Nichols-like se han descrito genéticamente más diversos que los aislados SS14-like (4, 100), no existen reportes hasta el momento que muestren diferencias en infectividad, potencial patogénico o virulencia entre ambos grupos genéticos.

El protocolo de MLSA utilizado ofrece la identificación de una elevada variabilidad genética directamente a partir de muestras clínicas y al mismo tiempo, constituye un método estable y fácilmente reproducible. Los perfiles alélicos detectados mediante este sistema posibilitan una resolución genómica de 30 % del genoma completo de TPA (10). Sin embargo, en casos puntuales donde la información genética revelada por los tres *loci* utilizados (TP0136, TP0548 y TP0705) no sea capaz de distinguir entre ambos grupos genéticos y teniendo en cuenta que los *loci* TP0136 y TP0548 se han identificado previamente con regiones susceptibles potencialmente a recombinaciones intra o inter-especies (4), se propone la utilización del nuevo MLSA que incorpora los *loci* TP0117 y TP0558 para una mejor distinción de ambos grupos genéticos.

Aunque se ha determinado la circulación de otros genotipos menos frecuentes en Europa (Figura 9), el perfil alélico identificado con mayor frecuencia en este estudio (1.3.1) se ha observado también con mayor frecuencia en Francia y Suiza, únicos países donde se ha aplicado el MLSA a muestras clínicas (10, 205).

fueron al mismo tiempo los más abundantes (1.3.1, n=155; 1.1.1, n=28), representando los perfiles alélicos centrales de la topología en forma de estrella de los aislados de TPA pertenecientes al grupo SS14-like, que a su vez pertenecen al agrupamiento de diseminación omega descrito por Arora y colaboradores (4).

Es notable que esta topología en forma de estrella se visualice solamente para el grupo SS14-like; sin embargo, la filogenia del grupo Nichols-like permanece aún poco estudiada debido al número limitado de muestras clínicas caracterizadas en este grupo genético, que representan solo 7 % de todas los aislados de TPA caracterizados a nivel mundial (de un total de 2555 aislados caracterizados). De lo anterior se sugiere la realización de estudios futuros de caracterización molecular y de análisis de genomas totales de TPA pertenecientes al grupo Nichols-like para contribuir a un mejor entendimiento de la filogenia de este grupo menos frecuente.

Se determinaron cinco perfiles alélicos únicos en las muestras cubanas, de ellos tres (9.24.8, 9.25.8 y 15.7.3) pertenecen al grupo filogenético Nichols-like y solo uno (16.3.1) se agrupó dentro del grupo SS14-like, lo que denota una emergencia de nuevos genotipos del grupo Nichols-like.

Como se ha descrito en otros estudios (100, 205), por alguna razón algunos perfiles alélicos se están diseminando mundialmente y otros de ellos se han quedado restringidos a determinadas zonas geográficas. Una de las explicaciones plausibles para la diseminación del perfil alélico más abundante (1.3.1), podría ser la presencia de las mutaciones puntuales A2058G y A2059G en el ADNr 23S que confieren resistencia a los macrólidos, fenómeno con el que se ha asociado con anterioridad (4, 10, 205). La figura 10 muestra una distribución casi totalitaria de los aislados de TPA pertenecientes al grupo SS14-like con las mutaciones de resistencia a macrólidos.

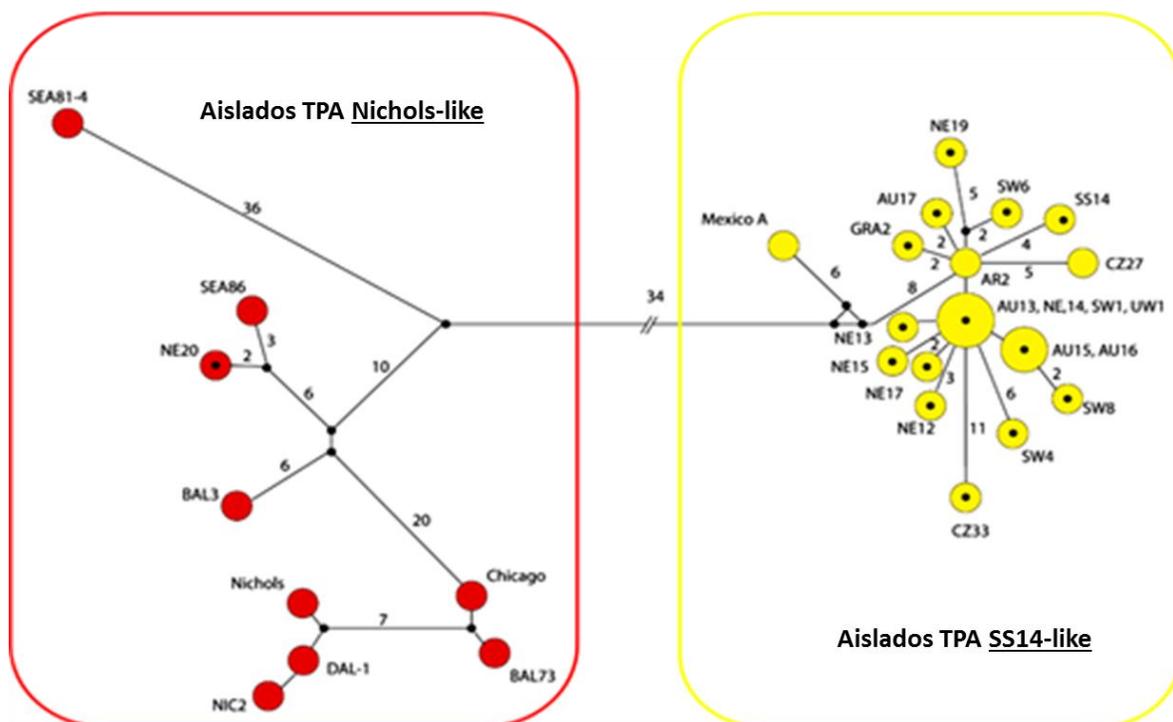


Figura 10. Red filogenética construida mediante el método de Median-Joining que muestra la distribución de aislados de *T. pallidum* subsp. *pallidum* (de acuerdo a su genoma completo) identificados en 300 muestras clínicas estudiadas de Argentina, Austria, República Checa, México, Holanda, EUA y Suiza durante el periodo 1912-2013. El punto negro dentro de un círculo representa la presencia del marcador de resistencia a macrólidos. El número de mutaciones entre un genoma y otro, si son más de una, se ubica encima de las ramas que conectan ambos genomas. Los haplotipos secundarios (ancestros desconocidos) se muestran como puntos negros que conectan los círculos. La figura fue donada gentilmente por la Dra. Linda Grillová de la Universidad Masaryk, República Checa.

4.4 Detección molecular de mecanismos de resistencia a macrólidos y a tetraciclinas

4.4.1 Detección molecular de las mutaciones A2058G y A2059G en el ADN_r 23S que confieren resistencia a macrólidos en *Treponema pallidum*

El primer antimicrobiano utilizado para el tratamiento de la sífilis fue la penicilina G benzatínica, la que se introdujo en el año 1943 y hasta el presente continúa siendo el tratamiento de elección para esta ITS, ya que no existen reportes de fallas clínicas al

tratamiento desde su primera utilización (12). Sin embargo, aquellos pacientes alérgicos a la penicilina o que no elijan la vía inyectable como adquisición del antimicrobiano, necesitan de los tratamientos alternativos o de segunda línea donde se incluyen los macrólidos y las tetraciclinas.

En el caso de los macrólidos que constituyen antimicrobianos bacteriostáticos que inhiben la síntesis de proteínas por unión reversible al ARNr 23S de la subunidad ribosomal 50S, se comenzó su uso para el tratamiento de la sífilis en 1982 con la administración de eritromicina; sin embargo, pocos años después se comenzó a observar fallas al tratamiento en pacientes con lesiones activas de sífilis secundaria (216). Posteriormente Stamm y colaboradores demostraron *in vitro* que la cepa SS14 de TPA era resistente a niveles elevados de eritromicina y azitromicina (16), y que este fenómeno estaba sustentado en una transición de adenina a guanina en la posición identificada como A2058 en el ADNr 23S de *E. coli*, que se encuentra en dos copias en TPA.

En los nueve aislados de TEN se verificó la ausencia de las mutaciones A2058G y A2059G lo que sugiere la utilidad de los macrólidos en el tratamiento de bejel en los pacientes estudiados. Sin embargo, debido al número pequeño de muestras y al desconocimiento de los fenómenos de resistencia a antimicrobianos en este patógeno, es difícil en este punto realizar otro tipo de inferencia al respecto, por lo que la discusión venidera se focalizará en TPA.

En el presente estudio, las dos repeticiones del gen ADNr 23S se amplificaron en muestras clínicas de 72 pacientes (97,3 %; 72/74) infectados con TPA lo que denota la elevada tasa de amplificación de este gen obtenida en las condiciones del ensayo. Los resultados de la secuenciación nucleotídica revelaron que 90,3 % (65/72) de los pacientes estudiados estaban infectados con TPA que contenían la mutación A2058G en ambos fragmentos génicos, lo que las clasifica como aislados resistentes a los macrólidos (16, 149, 217). Por otra parte, no se detectó la mutación A2059G en los aislados estudiados. Esto está en consonancia con lo reportado internacionalmente, donde son escasos los reportes de TPA con esta última mutación (91, 149, 183) a

diferencia de la mutación A2058G que se ha encontrado ampliamente diseminada (4, 100, 151, 154, 174, 176, 218).

En la literatura científica existen reportes disímiles que muestran tasas variables en la frecuencia de aislados de TPA resistentes a macrólidos que oscilan desde 0,7 % en Taiwan y Madagascar hasta 100 % en China (102, 219); sin embargo, los valores de resistencia encontrados en Cuba son alarmantes (más de 90 %), constituyendo las cifras más elevadas en las Américas y comparadas solamente con determinadas regiones en China, Irlanda y Bélgica, donde la resistencia a macrólidos en TPA está reconocida como un problema latente (Figura 11).

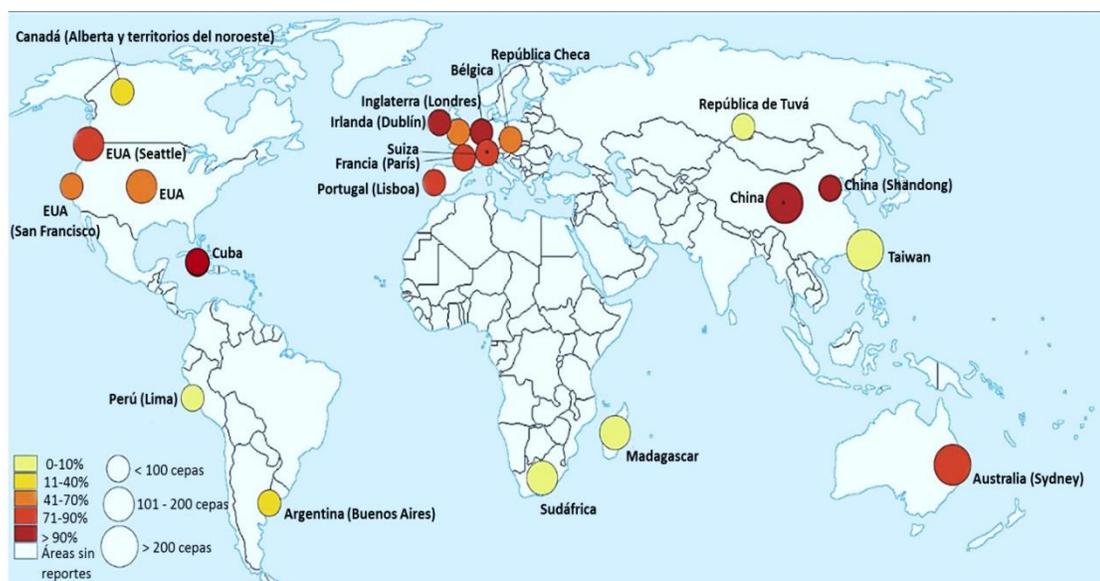


Figura 11. Distribución geográfica de aislados de *T. pallidum* subsp. *pallidum* obtenidos de muestras clínicas humanas y que presentan las mutaciones A2058G y A2059G. La frecuencia de los aislados resistentes a macrólidos se muestra con un código de colores. Las referencias utilizadas para la construcción de la presente figura se describen a continuación: Argentina (100), Australia (88), Bélgica (174), China (9, 188, 189, 211, 212), República Checa (99, 135, 149, 213), Dinamarca (90), Francia (181, 205), Irlanda (9), Madagascar (9), Perú (154), Portugal (151), República de Tuvá (176), Suiza (4, 10), Taiwán (87), Tanzania (214), Inglaterra (4, 67), EUA (9, 91, 215), Canadá (89), Sudáfrica (85), Cuba (el presente estudio).

La explicación más coherente para la emergencia de la resistencia a macrólidos en el contexto cubano es justamente la presión selectiva ejercida a los aislados de TPA por la elevada prescripción de la azitromicina en la práctica clínica en el tratamiento no solo de la sífilis, sino de infecciones respiratorias, de la piel y otras ITS; fenómeno que está unido a la elevada diseminación mundial del perfil alélico 1.3.1, que se ha encontrado altamente asociado ($p < 0,001$) al fenómeno de resistencia a macrólidos (4, 10, 205).

Como elemento adicional, en el estudio se detectó un número elevado de aislados de TPA con la mutación A2058G en cada año de estudio (figura 12), con una frecuencia promedio de 93 %. Lo anterior evidencia la elevada circulación de aislados resistentes a macrólidos durante el periodo de estudio y refleja que la problemática de la resistencia viene desde inicios de la presente investigación, o incluso de años precedentes.

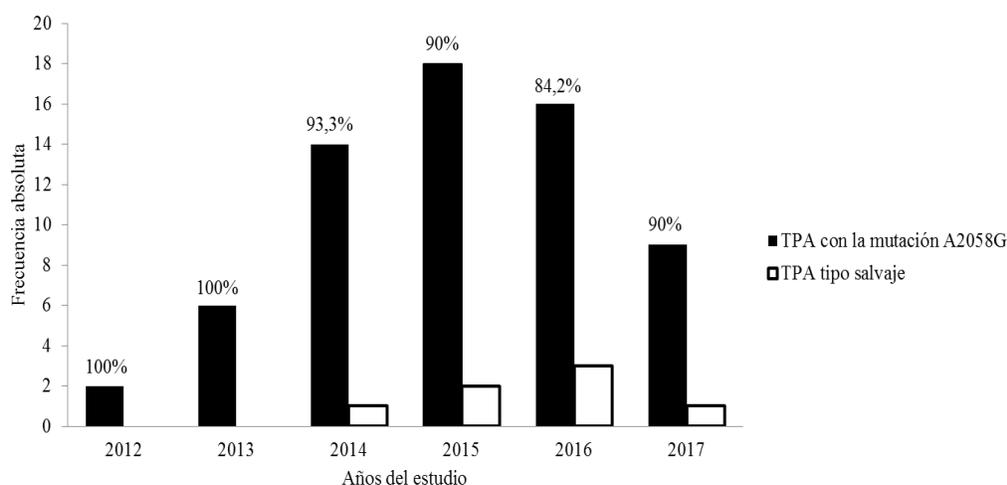


Figura 12. Distribución de aislados de *T. pallidum* subsp. *pallidum* resistentes (con la mutación A2058G) y sensibles (sin la mutación A2058G o tipo salvaje) a macrólidos durante los años de estudio en Cuba (n=72). Los valores de por ciento encima de las barras se refieren al porcentaje de aislados resistentes a macrólidos por año.

Lo anterior demuestra también la estabilidad genética de estos genotipos mutantes en el tiempo, fenómeno que pudiera justificar la incrementada diseminación geográfica de aislados de TPA resistentes a macrólidos en los últimos años.

Si se comparan los valores de frecuencia de aislados de TPA resistentes a macrólidos evidenciados en el presente estudio con los informados en 2015 como parte de un informe del LNRTPE-IPK al MINSAP, se evidencia un marcado incremento de la frecuencia de TPA con la mutación A2058G ($p < 0,001$) de 61 % (25/41) a 90,3 % (65/72). Este incremento, pudiera constituir un aumento real en la frecuencia de aislados resistentes en Cuba, o pudiera ser el resultado de la utilización de técnicas de laboratorio diferentes en ambos estudios para la detección de la mutación A2058G.

En el estudio realizado en 2015, se utilizó la amplificación por PCR simple de un fragmento del gen ADN_r 23S seguido por ensayos con enzimas de restricción (85) para la detección de las mutaciones en las posiciones A2058G y A2059G. Este sistema carece de sensibilidad y objetividad en la interpretación en comparación con la metodología utilizada en el presente estudio, que está basada en amplificación por PCR anidada seguida de secuenciación nucleotídica.

Las cifras alarmantes de resistencia a macrólidos en TPA obtenidas en este estudio constituyen una alerta para las autoridades de Salud Pública de Cuba. Dichos resultados sugieren la eliminación de los macrólidos como antimicrobianos alternativos útiles para el control de la sífilis en las guías actuales para el tratamiento de esta ITS. Los países de las Américas deben considerar estos hallazgos como motores impulsores para la realización de estudios similares que posibiliten impactar en los programas locales de control y tratamiento de la sífilis en cada país.

Las fallas a los tratamientos con macrólidos en pacientes con sífilis suponen una nueva ventana de oportunidades para la transmisión de esta ITS ya que los treponemas persisten por periodos prolongados en los tejidos bajo inadecuada acción antibiótica.

Hasta el momento, la resistencia a macrólidos es el único fenómeno de resistencia antimicrobiana clínicamente demostrado para TPA, y que ha ido aumentando en los últimos años. Por lo tanto, sería adecuado pensar en un marcado incremento del uso de las tetraciclinas como tratamiento alternativo en pacientes alérgicos a la penicilina, lo

que potencialmente pudiese resultar en la aparición futura de aislados de TPA resistentes a este antimicrobiano.

4.4.2 Detección molecular de mutaciones en el ADNr 16S que potencialmente confieren resistencia a tetraciclinas en *Treponema pallidum*

Las tetraciclinas son otro grupo de antimicrobianos también utilizados ampliamente en Cuba para el tratamiento de la sífilis y de un sinnúmero de otras infecciones, lo que supondría al menos la presencia de aislados de TPA bajo la presión de este antimicrobiano y la aparición potencial de resistencia.

En otras bacterias se han descrito mutaciones puntuales en el ADNr 16S que se asocian con resistencia a las tetraciclinas. La primera mutación puntual que se describió en el patógeno *Propionibacterium acnes* (18) se reconoció como G1058C de acuerdo a las coordenadas del genoma de *E. coli*. Posteriormente, se describieron otras tres mutaciones (A965T, G966T, A967C siguiendo también las coordenadas de *E. coli*) en *E. coli* y *H. pylori* (19) que se asociaron con fenotipos de estas bacterias resistentes a las tetraciclinas. Este último triplete de mutaciones está localizado en la zona codificante de un lazo de la hélice 31 del ARNr 16S que constituye un componente esencial del sitio primario de unión de las tetraciclinas en bacterias, y la presencia de las sustituciones dobles o triples revelaron elevadas concentraciones mínimas inhibitorias del antimicrobiano para los aislados que contenían las mutaciones con relación a los aislados salvajes (19).

En este estudio, se amplificó adecuadamente el fragmento deseado del gen ADNr 16S en 98,8 % (82/83) de los aislados estudiados (TEN y TPA), y en todos los casos se verificó la ausencia de las mutaciones previamente descritas.

De manera interesante, todos los genomas de TPA secuenciados hasta el momento (Anexo 6) exhiben una sustitución única (A965T) en el triplete de nucleótidos AGA965-967TTC; sin embargo, esta mutación simple no ofrece influencia sobre la resistencia de TPA a las tetraciclinas según se describe en los experimentos llevados a cabo por Norris y Edmondson (26). Hasta la fecha, se han estudiado 221 aislados de TPA obtenidos de

pacientes con sífilis (incluido el presente estudio) en busca de mutaciones puntuales en el ADNr 16S que confieran resistencia a las tetraciclinas (140, 175) y en ninguno de ellos se han encontrado dichas mutaciones. No obstante, se han determinado fallas serológicas al tratamiento con doxicilina en pacientes daneses (17) lo que constituye una alerta, aunque no definitiva, de una posible aparición de resistencia a este grupo microbiano.

En Cuba, dado el elevado porcentaje de aislados de TPA resistentes a macrólidos, se debe favorecer el uso de las tetraciclinas como tratamiento alternativo, por lo que es importante monitorear la presencia de las mutaciones puntuales que potencialmente pueden generar resistencia a este grupo de antimicrobianos. Estos hallazgos impactan de forma positiva en el uso efectivo de estos antimicrobianos como segunda línea de tratamiento para la sífilis en pacientes cubanos.

Ante las evidencias previamente mencionadas, se impone la realización de estudios amplios a nivel nacional para la detección de resistencia a antimicrobianos de segunda línea, así como la ejecución de investigaciones encaminadas a la caracterización molecular e inferencias filogenéticas de TPA. Esto aportaría elementos necesarios para un mejor control y seguimiento de la sífilis en Cuba.

4.5 Consideraciones generales

La sífilis es una de las ITS más antiguas conocidas por la humanidad (220) y en los últimos 20 años, las investigaciones en el campo de las ITS han enfocado su atención sobre el papel de TPA como patógeno con una importancia cada vez más creciente. Sin embargo, el estudio de este microorganismo es difícil, dada las características biológicas que condicionan su carácter no cultivable en medios químicamente definidos o líneas celulares, por lo que las herramientas moleculares juegan un papel crucial (93). En la actualidad, son limitados los países en el mundo que cuentan con laboratorios con personal capacitado y enfocado al estudio de las infecciones por treponemas. Esto ha restringido el desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas, el conocimiento de la respuesta de los treponemas patógenos ante los antimicrobianos de elección y su epidemiología,

insertada en una contemporaneidad donde las enfermedades infecciosas cobran cada vez mayor relevancia.

Si en este punto, se lleva a cabo un análisis integral de la hipótesis de la investigación, es notable la verificación casi absoluta de la misma pues TPA se presenta con **frecuencia elevada** como agente infeccioso causante de lesiones ulceradas en individuos cubanos con **conductas sexuales de riesgo** y posee una **diversidad genética elevada** con marcadores de resistencia a los **macrólidos**. Afortunadamente, no se detectó la presencia de marcadores genéticos que confieren resistencia a las tetraciclinas.

Uno de los aspectos más importantes lo constituyen las pruebas diagnósticas disponibles y su aplicabilidad, reproducibilidad y robustez. En el presente trabajo, se implementó una estrategia de diagnóstico molecular para las infecciones por TPA, que se basó en una comparación de pruebas moleculares utilizadas en diversos estudios a nivel internacional y publicados en revistas especializadas de alto impacto. Esta herramienta posibilitó la detección de TPA con una frecuencia de aparición considerable en el grupo de pacientes estudiados, cuando se compara con cifras reportadas en la literatura internacional. De manera evidente, estos resultados ratifican la problemática que supone la sífilis en el contexto cubano y sobre todo en los pacientes incluidos en el presente estudio. En estos individuos, se constataron variables de riesgo epidemiológico asociadas con la adquisición de TPA lo que sugiere la realización de estudios futuros encaminados a la detección y prevención de esta ITS con énfasis en pacientes que cumplan con estas características. Lo anterior es además significativo y de vital importancia en el manejo de las enfermedades ulceradas a nivel de la atención primaria de salud, pues brinda al Sistema Nacional de Salud información útil y pertinente sobre la etiología de las enfermedades ulceradas en Cuba.

En paralelo, es importante una descripción correcta de los genotipos bacterianos circulantes en una determinada región geográfica ya que ayuda al entendimiento de las vías de diseminación del patógeno, a su comportamiento epidemiológico, la propagación de la resistencia antimicrobiana, sus marcadores evolutivos y de patogenicidad, entre otros. TPA es una bacteria monomórfica con muy pocas diferencias en su genoma entre

los aislados estudiados; sin embargo, existen regiones génicas que posibilitan una adecuada caracterización y clasificación entre las subespecies o aislados de *T. pallidum* (93). La elevada diversidad genética de *T. pallidum* que circula en los pacientes cubanos, dada por la descripción de diferentes subtipos/genotipos de TPA, las evidencias de eventos de recombinación genética y la aparición de TEN, sienta las bases para estudios futuros encaminados a determinar el origen y evolución de los aislados cubanos, elucidar redes de transmisión, asociar variables clínico-epidemiológicas con determinado subtipo/genotipo, entre otros. Dichos estudios podrían además robustecerse mediante la aplicación de la secuenciación de genoma completo de aislados de TPA como fuente inagotable de información genética.

Es conocida además la problemática que supone la resistencia bacteriana a los antimicrobianos en la actualidad donde ya existen reportes de superbacterias que se muestran resistentes a todos los antimicrobianos disponibles (221). Aunque TPA no se reconoce como uno de los agentes infecciosos con mayores niveles de resistencia a los antimicrobianos, este no escapa del mencionado fenómeno con una amplia diseminación mundial de aislados resistentes a los macrólidos (tratamientos de segunda línea). Las cifras elevadas de TPA resistentes a los macrólidos constituye una alerta de suma importancia a las autoridades cubanas de Salud Pública al no uso de los macrólidos como tratamientos para la sífilis y al uso controlado de los antimicrobianos en el tratamiento de las múltiples infecciones circulantes ya que las dosis sub-terapéuticas de antimicrobianos en el organismo suponen la aparición de patógenos resistentes. Afortunadamente y gracias a las investigaciones realizadas en este campo de estudio, una reciente actualización de las guías para el tratamiento de las sífilis (2015) propuestas por el CDC no contemplan el uso de macrólidos como alternativa útil para esta ITS (118).

El presente trabajo recoge los resultados de las primeras investigaciones moleculares encaminadas al perfeccionamiento del diagnóstico de laboratorio de la sífilis; al conocimiento de la frecuencia de TPA como agente causal de lesiones ulceradas en pacientes cubanos, la circulación de los subtipos/genotipos de TPA en Cuba y sus

relaciones filogenéticas, y la respuesta del patógeno a los tratamientos alternativos. Los hallazgos encontrados, constituyen sin dudas, aportes científicos al conocimiento de la infección por esta bacteria con traducción directa al mejoramiento de los programas de prevención y control de las ITS en Cuba y en el mundo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La PCR en tiempo real que amplifica un fragmento del locus *poIA* constituye la estrategia molecular con mayor robustez y su combinación con las pruebas serológicas ofrece mayor capacidad diagnóstica, lo que favorece un análisis integral de laboratorio en pacientes con sospechas de sífilis temprana.
2. La frecuencia elevada de TPA encontrada en los pacientes cubanos; con énfasis en individuos jóvenes, HSH e infectados con VIH, que refieren el no uso del condón; evidencia la problemática que constituye este patógeno de transmisión sexual e incita a reforzar las estrategias nacionales para la prevención y control de la sífilis.
3. La diversidad genética encontrada en TPA, dada la variedad de subtipos y genotipos, puede estar sustentada por las conductas sexuales de riesgo referidas por los pacientes estudiados, ello sugiere un abordaje integral del manejo de la sífilis venérea en Cuba.
4. El hallazgo de la circulación, por primera vez en las Américas, de TEN en pacientes cubanos diagnosticados con sífilis venérea constituye un reto para las autoridades de Salud Pública y para la comunidad científica, al romper con paradigmas preestablecidos relacionados con la transmisión, presentación clínica y localización geográfica de este patógeno.
5. Las cifras elevadas de aislados de TPA resistentes a los macrólidos en Cuba sugieren el no uso de este grupo de antimicrobianos para el tratamiento de la sífilis en el contexto nacional, lo que unido a la ausencia de mutaciones puntuales que confieren resistencia a las tetraciclinas ratifican a estas como una posible alternativa terapéutica.

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

1. Extender los estudios de caracterización molecular de TPA y TEN, y de detección molecular de resistencia a antimicrobianos de segunda línea a muestras de pacientes de todo el país y de otros grupos vulnerables.
2. Introducir la secuenciación de genoma completo para el análisis de aspectos relacionados con la presentación clínica, virulencia del agente causal y epidemiología de la sífilis venérea y bejel.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lafond RE, Lukehart SA. Biological basis for syphilis. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(1):29-49.
2. Peeling RW, Mabey D, Kamb ML, Chen XS, Radolf JD, Benzaken AS. Syphilis. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17073.
3. Izard J, Renken C, Hsieh CE, Desrosiers DC, Dunham-Ems S, La Vake C, et al. Cryo-electron tomography elucidates the molecular architecture of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *J Bacteriol.* 2009;191(24):7566-80.
4. Arora N, Schuenemann VJ, Jager G, Peltzer A, Seitz A, Herbig A, et al. Origin of modern syphilis and emergence of a pandemic *Treponema pallidum* cluster. *Nat Microbiol.* 2016;2:16245.
5. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8(1):1-21.
6. Gayet-Ageron A, Sednaoui P, Lautenschlager S, Ferry T, Toutous-Trellu L, Cavassini M, et al. Use of *Treponema pallidum* PCR in testing of ulcers for diagnosis of primary syphilis. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(1):127-9.
7. Pinto M, Antelo M, Ferreira R, Azevedo J, Santo I, Borrego MJ, et al. A retrospective cross-sectional quantitative molecular approach in biological samples from patients with syphilis. *Microb Pathog.* 2017;104:296-302.
8. 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. 2015;53(3):976-80.

9. Marra C, Sahi S, Tantalò L, Godornes C, Reid T, Behets F, et al. Enhanced molecular typing of *Treponema pallidum*: geographical distribution of strain types and association with neurosyphilis. J Infect Dis. 2010;202(9):1380-8.

10. Grillova L, Bawa T, Mikalova L, Gayet-Ageron A, Nieselt K, Strouhal M, et al. Molecular characterization of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Switzerland and France with a new multilocus sequence typing scheme. PLoS One. 2018;13(7):e0200773.

11. Mikalova L, Pospisilova P, Woznicova V, Kuklova I, Zakoucka H, Smajs D. Comparison of CDC and sequence-based molecular typing of syphilis treponemes: *tpr* and *arp* loci are variable in multiple samples from the same patient. BMC Microbiol. 2013;13:178.

12. Workowski KA, Bolan GA. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. MMWR Recomm Rep. 2015;64(3):1-137.

13. Stamm LV. Syphilis: antibiotic treatment and resistance. Epidemiol Infect. 2015;143(8):1567-74.

14. Oberhofer E. In syphilis: penicillin iv. MMW Fortschr Med. 2016;158 Suppl 1:12.

15. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. WHO Guidelines for the Treatment of *Treponema pallidum* (Syphilis). Geneva: World Health Organization; 2016.

16. Stamm LV, Bergen HL. A point mutation associated with bacterial macrolide resistance is present in both 23S rRNA genes of an erythromycin-resistant *Treponema pallidum* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(3):806-7.

17. Salado-Rasmussen K, Hoffmann S, Cowan S, Jensen JS, Benfield T, Gerstoft J, et al. Serological Response to Treatment of Syphilis with Doxycycline Compared with Penicillin in HIV-infected Individuals. *Acta Derm Venereol.* 2016;96(6):807-11.
18. Ross JI, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ. 16S rRNA mutation associated with tetracycline resistance in a gram-positive bacterium. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(7):1702-5.
19. Nonaka L, Connell SR, Taylor DE. 16S rRNA mutations that confer tetracycline resistance in *Helicobacter pylori* decrease drug binding in *Escherichia coli* ribosomes. *J Bacteriol.* 2005;187(11):3708-12.
20. Stamm LV. Global challenge of antibiotic-resistant *Treponema pallidum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(2):583-9.
21. MINSAP. Anuario estadístico de salud 2017. Cuba: Dirección de Registros Médicos y Estadísticas de Salud; 2018.
22. Radolf JD, Deka RK, Anand A, Smajs D, Norgard MV, Yang XF. *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete: making a living as a stealth pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(12):744-59.
23. Miller MR, Miller KA, Bian J, James ME, Zhang S, Lynch MJ, et al. Spirochaete flagella hook proteins self-catalyze a lysinoalanine covalent crosslink for motility. *Nat Microbiol.* 2016;1(10):16134.
24. Horvath I, Duncan WP, Bullard JC. Cultivation of pathogenic *Treponema pallidum in vitro*. *Acta Microbiol Acad Sci Hung.* 1981;28(1):7-24.
25. Cover WH, Norris SJ, Miller JN. The microaerophilic nature of *Treponema pallidum*: enhanced survival and incorporation of tritiated adenine under microaerobic conditions in the presence or absence of reducing compounds. *Sex Transm Dis.* 1982;9(1):1-8.

26. Norris SJ, Edmondson DG. In vitro culture system to determine MICs and MBCs of antimicrobial agents against *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* (Nichols strain). *Antimicrob Agents Chemother.* 1988;32(1):68-74.
27. Levy JA. Confirmation of the successful cultivation of *Treponema pallidum* in tissue culture. *Microbiologica.* 1984;7(4):367-70.
28. Schereschewsky J. Culture of *Treponema pallidum* and immunodiagnosis of syphilis. *Z Haut Geschlechtskr.* 1954;17(8):233-6.
29. Edmondson DG, Hu B, Norris SJ. Long-Term In Vitro Culture of the Syphilis Spirochete *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *MBio.* 2018;9(3):e01153.
30. Tong ML, Zhang HL, Zhu XZ, Fan JY, Gao K, Lin LR, et al. Re-evaluating the sensitivity of the rabbit infectivity test for *Treponema pallidum* in modern era. *Clin Chim Acta.* 2017;464:136-41.
31. Norris SJ, Paster BJ, Moter A, Göbel UB. The Genus *Treponema*. *The Prokaryotes.* Vol. 7. EEUU: Springer Science & Business Media; 2006.
32. Šmajš D, Strouhal M. Uncultivable Pathogenic Treponemes. *Molecular Medical Microbiology.* The Netherlands: Elsevier Science Ltd; 2015. p. 1421-36.
33. Smajs D, Norris SJ, Weinstock GM. Genetic diversity in *Treponema pallidum*: implications for pathogenesis, evolution and molecular diagnostics of syphilis and yaws. *Infect Genet Evol.* 2012;12(2):191-202.
34. Petrosova H, Zbanikova M, Cejkova D, Mikalova L, Pospisilova P, Strouhal M, et al. Whole genome sequence of *Treponema pallidum* ssp. *pallidum*, strain Mexico A, suggests recombination between yaws and syphilis strains. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(9):e1832.
35. Staudova B, Strouhal M, Zbanikova M, Cejkova D, Fulton LL, Chen L, et al. Whole genome sequence of the *Treponema pallidum* subsp. *endemicum* strain Bosnia A:

the genome is related to yaws treponemes but contains few loci similar to syphilis treponemes. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(11):e3261.

36. Mikalova L, Strouhal M, Oppelt J, Grange PA, Janier M, Benhaddou N, et al. Human *Treponema pallidum* 11q/j isolate belongs to subsp. *endemicum* but contains two loci with a sequence in TP0548 and TP0488 similar to subsp. *pertenue* and subsp. *pallidum*, respectively. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(3):e0005434.

37. Stamm LV, Bergen HL. The sequence-variable, single-copy *tprK* gene of *Treponema pallidum* Nichols strain UNC and Street strain 14 encodes heterogeneous TprK proteins. Infect Immun. 2000;68(11):6482-6.

38. Centurion-Lara A, Sun ES, Barrett LK, Castro C, Lukehart SA, Van Voorhis WC. Multiple alleles of *Treponema pallidum* repeat gene D in *Treponema pallidum* isolates. J Bacteriol. 2000;182(8):2332-5.

39. Cejkova D, Strouhal M, Norris SJ, Weinstock GM, Smajs D. A Retrospective Study on Genetic Heterogeneity within *Treponema* Strains: Subpopulations Are Genetically Distinct in a Limited Number of Positions. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(10):e0004110.

40. Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, White O, Sutton GG, Dodson R, et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. Science. 1998;281(5375):375-88.

41. Salazar JC, Rathi A, Michael NL, Radolf JD, Jagodzinski LL. Assessment of the kinetics of *Treponema pallidum* dissemination into blood and tissues in experimental syphilis by real-time quantitative PCR. Infect Immun. 2007;75(6):2954-8.

42. Chen X, Zhao M, Qu H. Cellular metabolic network analysis: discovering important reactions in *Treponema pallidum*. Biomed Res Int. 2015;15:328568.

43. Hazlett KR, Rusnak F, Kehres DG, Bearden SW, La Vake CJ, La Vake ME, et al. The *Treponema pallidum* tro operon encodes a multiple metal transporter, a zinc-

dependent transcriptional repressor, and a semi-autonomously expressed phosphoglycerate mutase. *J Biol Chem.* 2003;278(23):20687-94.

44. Rosahn PD, Rowe CL. Experimental mouse syphilis; minimal infectious number of *Treponema pallidum*. *Am J Syph Gonorrhea Vener Dis.* 1950;34(1):40-4.

45. Zhu A, Wang C, Sun H, Han H, Wang F, Zhang L, et al. Circulating levels of Th1- and Th2-chemokines increase in patients with early syphilis. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2017;33(3):380-3.

46. Lin LR, Liu W, Zhu XZ, Chen YY, Gao ZX, Gao K, et al. *Treponema pallidum* promotes macrophage polarization and activates the NLRP3 inflammasome pathway to induce interleukin-1beta production. *BMC Immunol.* 2018;19(1):28.

47. Berger JR, Dean D. Neurosyphilis. *Handb Clin Neurol.* 2014;121:1461-72.

48. Marra CM. Neurosyphilis. *Continuum (Minneap Minn).* 2015;21(6):1714-28.

49. de Almeida SM, Bhatt A, Riggs PK, Durelle J, Lazzaretto D, Marquie-Beck J, et al. Cerebrospinal fluid human immunodeficiency virus viral load in patients with neurosyphilis. *J Neurovirol.* 2010;16(1):6-12.

50. Janier M, Dupin N, Bouscarat F, Spenatto N, Bertolotti A, Timsit J. Late syphilis. *Ann Dermatol Venereol.* 2016;143(11):725-8.

51. Drago F, Javor S, Parodi A. Relevance in biology and mechanisms of immune and treatment evasion of *Treponema pallidum*: a review. *G Ital Dermatol Venereol.* 2017;1:5830-8.

52. Giacani L, Denisenko O, Tompa M, Centurion-Lara A. Identification of the *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* TP0092 (RpoE) regulon and its implications for pathogen persistence in the host and syphilis pathogenesis. *J Bacteriol.* 2013;195(4):896-907.

53. Hook EWR. Syphilis. *Lancet.* 2017;389(10078):1550-7.

54. Tramont E. *Treponema pallidum* (Syphilis). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*: Livingstone Elsevier; 2010. p. 3035-53.
55. Coleman E, Fiahlo A, Brateanu A. Secondary syphilis. *Cleve Clin J Med*. 2017;84(7):510-1.
56. Pagliarello C, Cortelazzi C, Feliciani C, Di Nuzzo S. Secondary syphilis. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(11):1304.
57. Wells J, Wood C, Sukthankar A, Jones NP. Ocular syphilis: the re-establishment of an old disease. *Eye (Lond)*. 2018;32(1):99-103.
58. Dupin N. Syphilis. *Rev Med Interne*. 2016;37(11):735-42.
59. Morshed MG. Current trend on syphilis diagnosis: issues and challenges. *Adv Exp Med Biol*. 2014;808:51-64.
60. Kingston M, French P, Higgins S, McQuillan O, Sukthankar A, Stott C, et al. UK national guidelines on the management of syphilis 2015. *Int J STD AIDS*. 2016;27(6):421-46.
61. Sandes VS, Silva SGC, Motta IJF, Velarde LGC, de Castilho SR. Evaluation of positive and false-positive results in syphilis screening of blood donors in Rio de Janeiro, Brazil. *Transfus Med*. 2017;27(3):200-6.
62. Manavi K, Young H, McMillan A. The sensitivity of syphilis assays in detecting different stages of early syphilis. *Int J STD AIDS*. 2006;17(11):768-71.
63. Knaute DF, Graf N, Lautenschlager S, Weber R, Bosshard PP. Serological response to treatment of syphilis according to disease stage and HIV status. *Clin Infect Dis*. 2012;55(12):1615-22.
64. Morshed MG, Singh AE. Recent trends in the serologic diagnosis of syphilis. *Clin Vaccine Immunol*. 2015;22(2):137-47.

65. Shimelis T, Tadesse E. The diagnostic performance evaluation of the SD BIOLINE HIV/syphilis Duo rapid test in southern Ethiopia: a cross-sectional study. *BMJ Open*. 2015;5(4):e007371.
66. Woznicova V, Heroldova M. Direct detection of *Treponema pallidum* in diagnosis of syphilis. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*. 2004;53(3):121-5.
67. Tipple C, Taylor GP. Syphilis testing, typing, and treatment follow-up: a new era for an old disease. *Curr Opin Infect Dis*. 2015;28(1):53-60.
68. Mattei PL, Beachkofsky TM, Gilson RT, Wisco OJ. Syphilis: a reemerging infection. *Am Fam Physician*. 2012;86(5):433-40.
69. Shields M, Guy RJ, Jeffreys NJ, Finlayson RJ, Donovan B. A longitudinal evaluation of *Treponema pallidum* PCR testing in early syphilis. *BMC Infect Dis*. 2012;12:353.
70. Costa-Silva M, Coutinho D, Sobrinho-Simoes J, Azevedo F, Lisboa C. Cross-sectional study of *Treponema pallidum* PCR in diagnosis of primary and secondary syphilis. *Int J Dermatol*. 2018;57(1):46-9.
71. Waters DL, Shapter FM. The polymerase chain reaction (PCR): general methods. *Methods Mol Biol*. 2014;1099:65-75.
72. Chen CY, Chi KH, George RW, Cox DL, Srivastava A, Rui Silva M, et al. Diagnosis of gastric syphilis by direct immunofluorescence staining and real-time PCR testing. *J Clin Microbiol*. 2006;44(9):3452-6.
73. Chean R, Kwong JC, Ciciulla J, Leslie D. Confirmation of tertiary *Treponema pallidum* infection by *polA* polymerase chain reaction (PCR). *Pathology*. 2014;46(3):259-60.

74. Castro R, Aguas MJ, Batista T, Araujo C, Mansinho K, Pereira Fda L. Detection of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* DNA in Cerebrospinal Fluid (CSF) by Two PCR Techniques. *J Clin Lab Anal.* 2016;30(5):628-32.
75. Gama A, Carrillo-Casas EM, Hernandez-Castro R, Vazquez-Aceituno VA, Toussaint-Caire S, Xicohtencatl-Cortes J, et al. *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* identification by real-time PCR targeting the *polA* gene in paraffin-embedded samples positive by immunohistochemistry. *Int J STD AIDS.* 2017;28(13):1299-304.
76. Gayet-Ageron A, Combescure C, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger TV. Comparison of Diagnostic Accuracy of PCR Targeting the 47-Kilodalton Protein Membrane Gene of *Treponema pallidum* and PCR Targeting the DNA Polymerase I Gene: Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 2015;53(11):3522-9.
77. Heymans R, van der Helm JJ, de Vries HJ, Fennema HS, Coutinho RA, Bruisten SM. Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. *J Clin Microbiol.* 2010;48(2):497-502.
78. Vanhaecke C, Grange P, Benhaddou N, Blanche P, Salmon D, Parize P, et al. Clinical and Biological Characteristics of 40 Patients With Neurosyphilis and Evaluation of *Treponema pallidum* Nested Polymerase Chain Reaction in Cerebrospinal Fluid Samples. *Clin Infect Dis.* 2016;63(9):1180-6.
79. Chen CY, Ballard RC. The molecular diagnosis of sexually transmitted genital ulcer disease. *Methods Mol Biol.* 2012;903:103-12.
80. CDC. Syphilis (*Treponema pallidum*) 2018 Case Definition, EEUU: National Notifiable Diseases Surveillance System (NNDSS); 2018 [updated 26/11/2018; cited 2018 26/11/2018].
81. Grange PA, Gressier L, Dion PL, Farhi D, Benhaddou N, Gerhardt P, et al. Evaluation of a PCR test for detection of *Treponema pallidum* in swabs and blood. *J Clin Microbiol.* 2012;50(3):546-52.

82. Gayet-Ageron A, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger TV, Combescure C. Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis: a systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect.* 2013;89(3):251-6.
83. Pillay A, Liu H, Chen CY, Holloway B, Sturm AW, Steiner B, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies pallidum. *Sex Transm Dis.* 1998;25(8):408-14.
84. Cole MJ, Chisholm SA, Palmer HM, Wallace LA, Ison CA. Molecular epidemiology of syphilis in Scotland. *Sex Transm Infect.* 2009;85(6):447-51.
85. Muller EE, Paz-Bailey G, Lewis DA. Macrolide resistance testing and molecular subtyping of *Treponema pallidum* strains from southern Africa. *Sex Transm Infect.* 2012;88(6):470-4.
86. Li Z, Wang C, Xiao H, Zhao W, Li Z, Zheng R, et al. Enhanced molecular typing of *Treponema pallidum* identified a new tp0548 Gene type in Shandong, China. *Apmis.* 2017;125(10):937-9.
87. Wu H, Chang SY, Lee NY, Huang WC, Wu BR, Yang CJ, et al. Evaluation of macrolide resistance and enhanced molecular typing of *Treponema pallidum* in patients with syphilis in Taiwan: a prospective multicenter study. *J Clin Microbiol.* 2012;50(7):2299-304.
88. Read P, Tagg KA, Jeffreys N, Guy RJ, Gilbert GL, Donovan B. *Treponema pallidum* Strain Types and Association with Macrolide Resistance in Sydney, Australia: New TP0548 Gene Types Identified. *J Clin Microbiol.* 2016;54(8):2172-4.
89. Shuel M, Hayden K, Kadkhoda K, Tsang RSW. Molecular Typing and Macrolide Resistance of Syphilis Cases in Manitoba, Canada, From 2012 to 2016. *Sex Transm Dis.* 2018;45(4):233-6.

90. Salado-Rasmussen K, Cowan S, Gerstoft J, Larsen HK, Hoffmann S, Knudsen TB, et al. Molecular Typing of *Treponema pallidum* in Denmark: A Nationwide Study of Syphilis. *Acta Derm Venereol.* 2016;96(2):202-6.
91. Grimes M, Sahi SK, Godornes BC, Tantaló LC, Roberts N, Bostick D, et al. Two mutations associated with macrolide resistance in *Treponema pallidum*: increasing prevalence and correlation with molecular strain type in Seattle, Washington. *Sex Transm Dis.* 2012;39(12):954-8.
92. Zhang RL, Wang QQ, Zhang JP, Yang LJ. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* and associated factors of serofast status in early syphilis patients: Identified novel genotype and cytokine marker. *PLoS One.* 2017;12(4):e0175477.
93. Šmajš D, Strouhal M, Knauf S. Genetics of human and animal uncultivable treponemal pathogens. *Infect Genet Evol.* 2018;61:92-107.
94. Šmajš D, Mikalová L, Strouhal M, Grillová L. Why Are There Two Genetically Distinct Syphilis-Causing Strains? *For Immunopathol Dis Therap.* 2017;5:020184.
95. Grange PA, Mikalova L, Gaudin C, Strouhal M, Janier M, Benhaddou N, et al. *Treponema pallidum* 11qj Subtype May Correspond to a *Treponema pallidum* subsp. *endemicum* Strain. *Sex Transm Dis.* 2016;43(8):517-8.
96. Hook EW, 3rd, Behets F, Van Damme K, Ravelomanana N, Leone P, Sena AC, et al. A phase III equivalence trial of azithromycin versus benzathine penicillin for treatment of early syphilis. *J Infect Dis.* 2010;201(11):1729-35.
97. Muldoon EG, Walsh A, Crowley B, Mulcahy F. *Treponema pallidum* azithromycin resistance in Dublin, Ireland. *Sex Transm Dis.* 2012;39(10):784-6.
98. Li Z, Hou J, Zheng R, Li Z, Wen J, Liu D, et al. Two mutations associated with macrolide resistance in *Treponema pallidum* in Shandong, China. *J Clin Microbiol.* 2013;51(12):4270-1.

99. Grillova L, Petrosova H, Mikalova L, Strnadel R, Dastychova E, Kuklova I, et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* in the Czech Republic during 2011 to 2013: increased prevalence of identified genotypes and of isolates with macrolide resistance. J Clin Microbiol. 2014;52(10):3693-700.
100. Gallo Vaulet L, Grillova L, Mikalova L, Casco R, Rodriguez Fermepin M, Pando MA, et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* isolates from Buenos Aires, Argentina: Frequent Nichols-like isolates and low levels of macrolide resistance. PLoS One. 2017;12(2):e0172905.
101. Kanai M, Arima Y, Nishiki S, Shimuta K, Itoda I, Matsui T, et al. Molecular typing and macrolide resistance analyses of *Treponema pallidum* in heterosexuals and men who have sex with men in Japan in 2017. J Clin Microbiol. 2019;57(1):e01167.
102. Chen XS, Yin YP, Wei WH, Wang HC, Peng RR, Zheng HP, et al. High prevalence of azithromycin resistance to *Treponema pallidum* in geographically different areas in China. Clin Microbiol Infect. 2013;19(10):975-9.
103. Hoerr V, Duggan GE, Zbytnuik L, Poon KK, Grosse C, Neugebauer U, et al. Characterization and prediction of the mechanism of action of antibiotics through NMR metabolomics. BMC Microbiol. 2016;16:82.
104. Psomas KC, Brun M, Causse A, Atoui N, Reynes J, Le Moing V. Efficacy of ceftriaxone and doxycycline in the treatment of early syphilis. Med Mal Infect. 2012;42(1):15-9.
105. Tsai JC, Lin YH, Lu PL, Shen NJ, Yang CJ, Lee NY, et al. Comparison of serological response to doxycycline versus benzathine penicillin G in the treatment of early syphilis in HIV-infected patients: a multi-center observational study. PLoS One. 2014;9(10):e109813.
106. Dai T, Qu R, Liu J, Zhou P, Wang Q. Efficacy of Doxycycline in the Treatment of Syphilis. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(1):e01092.

107. Xiao H, Liu D, Li Z, Zheng R, Li Z, Hou J, et al. Comparison of Doxycycline and Benzathine Penicillin G for the Treatment of Early Syphilis. *Acta Dermatovenerol Croat.* 2017;25(2):107-11.
108. Grossman TH. Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(4):a025387.
109. Wu JY, Kim JJ, Reddy R, Wang WM, Graham DY, Kwon DH. Tetracycline-resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates with and without mutations in 16S rRNA-encoding genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(2):578-83.
110. Newman L, Rowley J, Vander Hoorn S, Wijesooriya NS, Unemo M, Low N, et al. Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. *PLoS One.* 2015;10(12):e0143304.
111. Wijesooriya NS, Rochat RW, Kamb ML, Turlapati P, Temmerman M, Broutet N, et al. Global burden of maternal and congenital syphilis in 2008 and 2012: a health systems modelling study. *Lancet Glob Health.* 2016;4(8):525-33.
112. Black V, Williams BG, Maseko V, Radebe F, Rees HV, Lewis DA. Field evaluation of Standard Diagnostics' Bioline HIV/Syphilis Duo test among female sex workers in Johannesburg, South Africa. *Sex Transm Infect.* 2016;92(7):495-8.
113. Elhadi M, Elbadawi A, Abdelrahman S, Mohammed I, Bozicevic I, Hassan EA, et al. Integrated bio-behavioural HIV surveillance surveys among female sex workers in Sudan, 2011-2012. *Sex Transm Infect.* 2013;89(3):17-22.
114. Vandepitte J, Bukenya J, Weiss HA, Nakubulwa S, Francis SC, Hughes P, et al. HIV and other sexually transmitted infections in a cohort of women involved in high-risk sexual behavior in Kampala, Uganda. *Sex Transm Dis.* 2011;38(4):316-23.
115. Abara WE, Hess KL, Neblett Fanfair R, Bernstein KT, Paz-Bailey G. Syphilis Trends among Men Who Have Sex with Men in the United States and Western Europe:

A Systematic Review of Trend Studies Published between 2004 and 2015. PLoS One. 2016;11(7):e0159309.

116. de Voux A, Kidd S, Grey JA, Rosenberg ES, Gift TL, Weinstock H, et al. State-Specific Rates of Primary and Secondary Syphilis Among Men Who Have Sex with Men - United States, 2015. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2017;66(13):349-54.

117. Burchell AN, Allen VG, Gardner SL, Moravan V, Tan DH, Grewal R, et al. High incidence of diagnosis with syphilis co-infection among men who have sex with men in an HIV cohort in Ontario, Canada. BMC Infect Dis. 2015;15:356.

118. CDC. Syphilis Treatment and Care, EEUU: Division of STD Prevention, National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention; 2017 [updated 30/11/2017; cited 2018 26/11/2018].

119. Van Wagoner NJ, Harbison HS, Drewry J, Turnipseed E, Hook EW, 3rd. Characteristics of women reporting multiple recent sex partners presenting to a sexually transmitted disease clinic for care. Sex Transm Dis. 2011;38(3):210-5.

120. Bibbins-Domingo K, Grossman DC, Curry SJ, Davidson KW, Epling JW, Jr., Garcia FA, et al. Screening for Syphilis Infection in Nonpregnant Adults and Adolescents: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. Jama. 2016;315(21):2321-7.

121. Rekart ML, Ndifon W, Brunham RC, Dushoff J, Park SW, Rawat S, et al. A double-edged sword: does highly active antiretroviral therapy contribute to syphilis incidence by impairing immunity to *Treponema pallidum*? Sex Transm Infect. 2017;93(5):374-8.

122. MINSAP. Plan estratégico nacional para la prevención y el control de las ITS y el VIH/Sida | 2014-2018. Cuba. 2013.

123. Giacani L, Lukehart SA. The endemic treponematoses. Clin Microbiol Rev. 2014;27(1):89-115.

124. Mitja O, Bassat Q. Developments in therapy and diagnosis of yaws and future prospects. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013;11(10):1115-21.
125. Marks M, Solomon AW, Mabey DC. Endemic treponemal diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2014;108(10):601-7.
126. Mitja O, Asiedu K, Mabey D. Yaws. *Lancet.* 2013;381(9868):763-73.
127. Maxfield L, Crane JS. Yaws (Frambesia tropica, Thymosis, Polypapilloma tropicum, Parangi, Bouba, Frambosie, Pian). *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018.*
128. Satter EK, Tokarz VA. Secondary yaws: an endemic treponemal infection. *Pediatr Dermatol.* 2010;27(4):364-7.
129. Gonzalez-Beiras C, Vall-Mayans M, Gonzalez-Escalante A, McClymont K, Ma L, Mitja O. Yaws Osteoperiostitis Treated with Single-Dose Azithromycin. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;96(5):1039-41.
130. Lipozencic J, Marinovic B, Gruber F. Endemic syphilis in Europe. *Clin Dermatol.* 2014;32(2):219-26.
131. Stamm LV. Pinta: Latin America's Forgotten Disease? *Am J Trop Med Hyg.* 2015;93(5):901-3.
132. Schmitz M, Scheungraber C, Herrmann J, Teller K, Gajda M, Runnebaum IB, et al. Quantitative multiplex PCR assay for the detection of the seven clinically most relevant high-risk HPV types. *J Clin Virol.* 2009;44(4):302-7.
133. Orle KA, Gates CA, Martin DH, Body BA, Weiss JB. Simultaneous PCR detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and herpes simplex virus types 1 and 2 from genital ulcers. *J Clin Microbiol.* 1996;34(1):49-54.

134. Lan J, Ossewaarde JM, Walboomers JM, Meijer CJ, van den Brule AJ. Improved PCR sensitivity for direct genotyping of *Chlamydia trachomatis* serovars by using a nested PCR. J Clin Microbiol. 1994;32(2):528-30.
135. Flasarova M, Pospisilova P, Mikalova L, Valisova Z, Dastychova E, Strnadel R, et al. Sequencing-based molecular typing of *Treponema pallidum* strains in the Czech Republic: all identified genotypes are related to the sequence of the SS14 strain. Acta Derm Venereol. 2012;92(6):669-74.
136. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 2013;30(12):2725-9.
137. Bandelt HJ, Forster P, Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol Biol Evol. 1999;16(1):37-48.
138. Roure B, Rodriguez-Ezpeleta N, Philippe H. SCAFoS: a tool for selection, concatenation and fusion of sequences for phylogenomics. BMC Evol Biol. 2007;7(1):2.
139. Lukehart SA, Godornes C, Molini BJ, Sonnett P, Hopkins S, Mulcahy F, et al. Macrolide resistance in *Treponema pallidum* in the United States and Ireland. N Engl J Med. 2004;351(2):154-8.
140. Wu BR, Liu WC, Wu PY, Su YC, Yang SP, Hung CC, et al. Surveillance study of *Treponema pallidum* harbouring tetracycline resistance mutations in patients with syphilis. Int J Antimicrob Agents. 2014;44(4):370-2.
141. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. Jama. 2013;310(20):2191-4.
142. CECMED. Requerimientos para la certificación de buenas prácticas clínicas, 52-2008. Cuba. 2008.

143. Hoorfar J, Malorny B, Abdulmawjood A, Cook N, Wagner M, Fach P. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *J Clin Microbiol.* 2004;42(5):1863-8.
144. Radstrom P, Knutsson R, Wolffs P, Dahlenborg M, Lofstrom C. Pre-PCR processing of samples. *Methods Mol Biol.* 2003;216:31-50.
145. Opel KL, Chung D, McCord BR. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J Forensic Sci.* 2010;55(1):25-33.
146. Fox DH, Huang CK, Du J, Chang TY, Pan Q. Profound inhibition of the PCR step of CF V3 multiplex PCR/OLA assay by the use of UV-irradiated plastic reaction tubes. *Diagn Mol Pathol.* 2007;16(2):121-3.
147. Champlot S, Berthelot C, Pruvost M, Bennett EA, Grange T, Geigl EM. An efficient multistrategy DNA decontamination procedure of PCR reagents for hypersensitive PCR applications. *PLoS One.* 2010;5(9):e0013042.
148. Navarro E, Serrano-Heras G, Castano MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta.* 2015;439:231-50.
149. Matejkova P, Flasarova M, Zakoucka H, Borek M, Kremenova S, Arenberger P, et al. Macrolide treatment failure in a case of secondary syphilis: a novel A2059G mutation in the 23S rRNA gene of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *J Med Microbiol.* 2009;58(6):832-6.
150. Cejkova D, Zbanikova M, Pospisilova P, Strouhal M, Mikalova L, Weinstock GM, et al. Structure of *rrn* operons in pathogenic non-cultivable treponemes: sequence but not genomic position of intergenic spacers correlates with classification of *Treponema pallidum* and *Treponema paraluisancuniculi* strains. *J Med Microbiol.* 2013;62(2):196-207.

151. Pinto M, Borges V, Antelo M, Pinheiro M, Nunes A, Azevedo J, et al. Genome-scale analysis of the non-cultivable *Treponema pallidum* reveals extensive within-patient genetic variation. *Nat Microbiol.* 2016;2:16190.
152. Janier M, Hegyi V, Dupin N, Unemo M, Tiplica GS, Potocnik M, et al. 2014 European guideline on the management of syphilis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014;28(12):1581-93.
153. Palmer HM, Higgins SP, Herring AJ, Kingston MA. Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. *Sex Transm Infect.* 2003;79(6):479-83.
154. Flores JA, Vargas SK, Leon SR, Perez DG, Ramos LB, Chow J, et al. *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* Genotypes and Macrolide Resistance Status in Syphilitic Lesions among Patients at 2 Sexually Transmitted Infection Clinics in Lima, Peru. *Sex Transm Dis.* 2016;43(7):465-6.
155. Cruz AR, Pillay A, Zuluaga AV, Ramirez LG, Duque JE, Aristizabal GE, et al. Secondary syphilis in Cali, Colombia: new concepts in disease pathogenesis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(5):e690.
156. Sena AC, Wolff M, Martin DH, Behets F, Van Damme K, Leone P, et al. Predictors of serological cure and Serofast State after treatment in HIV-negative persons with early syphilis. *Clin Infect Dis.* 2011;53(11):1092-9.
157. Roett MA, Mayor MT, Uduhiri KA. Diagnosis and management of genital ulcers. *Am Fam Physician.* 2012;85(3):254-62.
158. Brischetto A, Gassiep I, Whiley D, Norton R. Retrospective Review of *Treponema pallidum* PCR and Serology Results: Are Both Tests Necessary? *J Clin Microbiol.* 2018;56(5):e01782.
159. Hope-Rapp E, Anyfantakis V, Fouere S, Bonhomme P, Louison JB, de Marsac TT, et al. Etiology of genital ulcer disease. A prospective study of 278 cases seen in an STD clinic in Paris. *Sex Transm Dis.* 2010;37(3):153-8.

160. Prabhakar P, Narayanan P, Deshpande GR, Das A, Neilsen G, Mehendale S, et al. Genital ulcer disease in India: etiologies and performance of current syndrome guidelines. *Sex Transm Dis.* 2012;39(11):906-10.
161. Phiri S, Zadrozny S, Weiss HA, Martinson F, Nyirenda N, Chen CY, et al. Etiology of genital ulcer disease and association with HIV infection in Malawi. *Sex Transm Dis.* 2013;40(12):923-8.
162. Totten PA, Kuypers JM, Chen CY, Alfa MJ, Parsons LM, Dutro SM, et al. Etiology of genital ulcer disease in Dakar, Senegal, and comparison of PCR and serologic assays for detection of *Haemophilus ducreyi*. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):268-73.
163. Ahmed HJ, Mbwana J, Gunnarsson E, Ahlman K, Guerino C, Svensson LA, et al. Etiology of genital ulcer disease and association with human immunodeficiency virus infection in two tanzanian cities. *Sex Transm Dis.* 2003;30(2):114-9.
164. Suntoke TR, Hardick A, Tobian AA, Mpoza B, Laeyendecker O, Serwadda D, et al. Evaluation of multiplex real-time PCR for detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, herpes simplex virus type 1 and 2 in the diagnosis of genital ulcer disease in the Rakai District, Uganda. *Sex Transm Infect.* 2009;85(2):97-101.
165. Gomes Naveca F, Sabido M, Amaral Pires de Almeida T, Araujo Veras E, Contreras Mejia Mdel C, Galban E, et al. Etiology of genital ulcer disease in a sexually transmitted infection reference center in Manaus, Brazilian Amazon. *PLoS One.* 2013;8(5):e63953.
166. Chesson HW, Zaidi AA, Aral SO. Decreasing age disparities in syphilis and gonorrhea incidence rates in the United States, 1981--2005. *Sex Transm Dis.* 2008;35(4):393-7.
167. Viegas EO, Tembe N, Macovela E, Goncalves E, Augusto O, Ismael N, et al. Incidence of HIV and the prevalence of HIV, hepatitis B and syphilis among youths in Maputo, Mozambique: a cohort study. *PLoS One.* 2015;10(3):e0121452.

168. Szwarcwald CL, de Almeida WDS, Damacena GN, de Souza-Junior PRB, Ferreira-Junior ODC, Guimaraes MDC. Changes in attitudes, risky practices, and HIV and syphilis prevalence among female sex workers in Brazil from 2009 to 2016. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(1):46-53.
169. Dijanic T, Kozul K, Miskulin M, Medic A, Jurcev-Savicevic A, Burazin J. Sexual behaviour and condom use as a protection against sexually transmitted infections in student population. *Coll Antropol*. 2014;38(1):31-7.
170. Crosby R, Skakoon-Sparling S, Milhausen RR, Sanders S, Graham CA, Yarber WL. The Protective Value of Discussing Condom Use: A Study of Young Black Men Attending STI Clinics in the Southern United States. *Health Educ Behav*. 2018;45(5):706-13.
171. Salado-Rasmussen K. Syphilis and HIV co-infection. Epidemiology, treatment and molecular typing of *Treponema pallidum*. *Dan Med J*. 2015;62(12):B5176.
172. Bruisten SM, Cairo I, Fennema H, Pijl A, Buimer M, Peerbooms PG, et al. Diagnosing genital ulcer disease in a clinic for sexually transmitted diseases in Amsterdam, The Netherlands. *J Clin Microbiol*. 2001;39(2):601-5.
173. Pathela P, Braunstein SL, Blank S, Shepard C, Schillinger JA. The high risk of an HIV diagnosis following a diagnosis of syphilis: a population-level analysis of New York City men. *Clin Infect Dis*. 2015;61(2):281-7.
174. Mikalova L, Grillova L, Osbak K, Strouhal M, Kenyon C, Crucitti T, et al. Molecular Typing of Syphilis-Causing Strains Among Human Immunodeficiency Virus-Positive Patients in Antwerp, Belgium. *Sex Transm Dis*. 2017;44(6):376-9.
175. Giacani L, Ciccarese G, Puga-Salazar C, Dal Conte I, Colli L, Cusini M, et al. Enhanced Molecular Typing of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* Strains From 4 Italian Hospitals Shows Geographical Differences in Strain Type Heterogeneity, Widespread Resistance to Macrolides, and Lack of Mutations Associated With Doxycycline Resistance. *Sex Transm Dis*. 2018;45(4):237-42.

176. Khairullin R, Vorobyev D, Obukhov A, Kuular UH, Kubanova A, Kubanov A, et al. Syphilis epidemiology in 1994-2013, molecular epidemiological strain typing and determination of macrolide resistance in *Treponema pallidum* in 2013-2014 in Tuva Republic, Russia. *Apmis*. 2016;124(7):595-602.
177. Sutton MY, Liu H, Steiner B, Pillay A, Mickey T, Finelli L, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* in an Arizona County with increasing syphilis morbidity: use of specimens from ulcers and blood. *J Infect Dis*. 2001;183(11):1601-6.
178. Pope V, Fox K, Liu H, Marfin AA, Leone P, Sena AC, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* from North and South Carolina. *J Clin Microbiol*. 2005;43(8):3743-6.
179. Ho EL, Lukehart SA. Syphilis: using modern approaches to understand an old disease. *J Clin Invest*. 2011;121(12):4584-92.
180. Martin IE, Tsang RS, Sutherland K, Anderson B, Read R, Roy C, et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* strains in western Canada: predominance of 14d subtypes. *Sex Transm Dis*. 2010;37(9):544-8.
181. Grange PA, Allix-Beguec C, Chanal J, Benhaddou N, Gerhardt P, Morini JP, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* in Paris, France. *Sex Transm Dis*. 2013;40(8):641-4.
182. Castro R, Prieto E, Aguas MJ, Manata MJ, Botas J, Pereira FM. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Lisbon, Portugal. *J Clin Microbiol*. 2009;47(8):2510-2.
183. Tipple C, McClure MO, Taylor GP. High prevalence of macrolide resistant *Treponema pallidum* strains in a London centre. *Sex Transm Infect*. 2011;87(6):486-8.
184. Van Damme K, Behets F, Ravelomanana N, Godornes C, Khan M, Randrianasolo B, et al. Evaluation of azithromycin resistance in *Treponema pallidum* specimens from Madagascar. *Sex Transm Dis*. 2009;36(12):775-6.

185. Molepo J, Pillay A, Weber B, Morse SA, Hoosen AA. Molecular typing of *Treponema pallidum* strains from patients with neurosyphilis in Pretoria, South Africa. *Sex Transm Infect.* 2007;83(3):189-92.
186. Martin IE, Gu W, Yang Y, Tsang RS. Macrolide resistance and molecular types of *Treponema pallidum* causing primary syphilis in Shanghai, China. *Clin Infect Dis.* 2009;49(4):515-21.
187. Peng RR, Yin YP, Wei WH, Wang HC, Zhu BY, Liu QZ, et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* causing early syphilis in China: a cross-sectional study. *Sex Transm Dis.* 2012;39(1):42-5.
188. Xiao Y, Liu S, Liu Z, Xie Y, Jiang C, Xu M, et al. Molecular Subtyping and Surveillance of Resistance Genes In *Treponema pallidum* DNA From Patients With Secondary and Latent Syphilis in Hunan, China. *Sex Transm Dis.* 2016;43(5):310-6.
189. Peng RR, Wang AL, Li J, Tucker JD, Yin YP, Chen XS. Molecular typing of *Treponema pallidum*: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(11):e1273.
190. Petrosova H, Pospisilova P, Strouhal M, Cejkova D, Zobanikova M, Mikalova 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.* 2013;8(9):e74319.
191. Mitja O, Smajs D, Bassat Q. Advances in the diagnosis of endemic treponematoses: yaws, bejel, and pinta. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(10):e2283.
192. Lukehart SA, Giacani L. When is syphilis not syphilis? Or is it? *Sex Transm Dis.* 2014;41(9):554-5.
193. Valdivielso-Ramos M, Casado I, Chavarria E, Hernanz JM. Primary chancre on the chest wall. *Actas Dermosifiliogr.* 2011;102(7):545-6.

194. Kompanje EJ. Primary syphilitic chancres on arms, fingers and hands: more common than reported. *Int J STD AIDS*. 2013;24(6):505.
195. Streit E, Hartschuh W, Flux K. Solitary lesion on finger. Primary syphilitic lesion on finger. *Acta Derm Venereol*. 2013;93(2):251-2.
196. Mulligan CJ, Norris SJ, Lukehart SA. Molecular studies in *Treponema pallidum* evolution: toward clarity? *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2(1):e184.
197. Roman GC, Roman LN. Occurrence of congenital, cardiovascular, visceral, neurologic, and neuro-ophthalmologic complications in late yaws: a theme for future research. *Rev Infect Dis*. 1986;8(5):760-70.
198. Edington GM. Cardiovascular disease as a cause of death in the Gold Coast African. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1954;48(5):419-25.
199. Smith JL, David NJ, Indgin S, Israel CW, Levine BM, Justice J, Jr., et al. Neuro-ophthalmological study of late yaws and pinta. II. The Caracas project. *Br J Vener Dis*. 1971;47(4):226-51.
200. Mohamed KN. Late yaws and optic atrophy. *Ann Trop Med Parasitol*. 1990;84(6):637-9.
201. Grin EI. Endemic syphilis in Bosnia; clinical and epidemiological observations on a successful mass-treatment campaign. *Bull World Health Organ*. 1952;7(1):1-74.
202. Wicher K, Wicher V, Abbruscato F, Baughn RE. *Treponema pallidum* subsp. *pertenue* displays pathogenic properties different from those of *T. pallidum* subsp. *pallidum*. *Infect Immun*. 2000;68(6):3219-25.
203. Knauf S, Batamuzi EK, Mlengya T, Kilewo M, Lejora IA, Nordhoff M, et al. *Treponema* infection associated with genital ulceration in wild baboons. *Vet Pathol*. 2012;49(2):292-303.

204. Strouhal M, Mikalova L, Havlickova P, Tenti P, Cejkova D, Rychlik I, et al. Complete genome sequences of two strains of *Treponema pallidum* subsp. *pertenue* from Ghana, Africa: Identical genome sequences in samples isolated more than 7 years apart. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(9):e0005894.
205. Pospisilova P, Grange PA, Grillova L, Mikalova L, Martinet P, Janier M, et al. Multi-locus sequence typing of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* present in clinical samples from France: Infecting treponemes are genetically diverse and belong to 18 allelic profiles. PLoS One. 2018;13(7):e0201068.
206. Mikalova L, Strouhal M, Cejkova D, Zobanikova M, Pospisilova P, Norris SJ, et al. Genome analysis of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* and subsp. *pertenue* strains: most of the genetic differences are localized in six regions. PLoS One. 2010;5(12):e15713.
207. Harper KN, Ocampo PS, Steiner BM, George RW, Silverman MS, Bolotin S, et al. On the origin of the treponematoses: a phylogenetic approach. PLoS Negl Trop Dis. 2008;2(1):e148.
208. Centurion-Lara A, Molini BJ, Godornes C, Sun E, Hevner K, Van Voorhis WC, et al. Molecular differentiation of *Treponema pallidum* subspecies. J Clin Microbiol. 2006;44(9):3377-80.
209. Gray RR, Mulligan CJ, Molini BJ, Sun ES, Giacani L, Godornes C, et al. Molecular evolution of the *tprC*, *D*, *I*, *K*, *G*, and *J* genes in the pathogenic genus *Treponema*. Mol Biol Evol. 2006;23(11):2220-33.
210. Strouhal M, Oppelt J, Mikalova L, Arora N, Nieselt K, Gonzalez-Candelas F, et al. Reanalysis of Chinese *Treponema pallidum* samples: all Chinese samples cluster with SS14-like group of syphilis-causing treponemes. BMC Res Notes. 2018;11(1):16.
211. Zhu B, Bu J, Li W, Zhang J, Huang G, Cao J, et al. High Resistance to Azithromycin in Clinical Samples from Patients with Sexually Transmitted Diseases in Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. PLoS One. 2016;11(7):e0159787.

212. Sun J, Meng Z, Wu K, Liu B, Zhang S, Liu Y, et al. Tracing the origin of *Treponema pallidum* in China using next-generation sequencing. *Oncotarget*. 2016;7(28):42904-18.
213. Flasarova M, Smajs D, Matejkova P, Woznicova V, Heroldova-Dvorakova M, Votava M. Molecular detection and subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in clinical specimens. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*. 2006;55(3):105-11.
214. Knauf S, Raphael J, Mitja O, Lejora IAV, Chuma IS, Batamuzi EK, et al. Isolation of *Treponema* DNA from Necrophagous Flies in a Natural Ecosystem. *EBioMedicine*. 2016;11:85-90.
215. Oliver S, Sahi SK, Tantaló LC, Godornes C, Neblett Fanfair R, Markowitz LE, et al. Molecular Typing of *Treponema pallidum* in Ocular Syphilis. *Sex Transm Dis*. 2016;43(8):524-7.
216. Stapleton JT, Stamm LV, Bassford PJ, Jr. Potential for development of antibiotic resistance in pathogenic treponemes. *Rev Infect Dis*. 1985;7(2):314-7.
217. Molini BJ, Tantaló LC, Sahi SK, Rodríguez VI, Brandt SL, Fernández MC, et al. Macrolide Resistance in *Treponema pallidum* Correlates With 23S rDNA Mutations in Recently Isolated Clinical Strains. *Sex Transm Dis*. 2016;43(9):579-83.
218. Smajs D, Pastekova L, Grillova L. Macrolide Resistance in the Syphilis Spirochete, *Treponema pallidum* ssp. *pallidum*: Can We Also Expect Macrolide-Resistant Yaws Strains? *Am J Trop Med Hyg*. 2015;93(4):678-83.
219. Wu BR, Yang CJ, Tsai MS, Lee KY, Lee NY, Huang WC, et al. Multicentre surveillance of prevalence of the 23S rRNA A2058G and A2059G point mutations and molecular subtypes of *Treponema pallidum* in Taiwan, 2009-2013. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(8):802-7.

220. Harper KN, Zuckerman MK, Harper ML, Kingston JD, Armelagos GJ. The origin and antiquity of syphilis revisited: an appraisal of Old World pre-Columbian evidence for treponemal infection. *Am J Phys Anthropol.* 2011;146(53):99-133.
221. Alos JI. Antibiotic resistance: A global crisis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015;33(10):692-9.
222. 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.* 2001;39(5):1941-6.
223. Glatz M, Juricevic N, Altwegg M, Bruisten S, Komericki P, Lautenschlager S, et al. A multicenter prospective trial to assess a new real-time polymerase chain reaction for detection of *Treponema pallidum*, herpes simplex-1/2 and *Haemophilus ducreyi* in genital, anal and oropharyngeal ulcers. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(12):1020-7.
224. Woznicova V, Smajs D, Wechsler D, Matejkova P, Flasarova M. Detection of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* from skin lesions, serum, and cerebrospinal fluid in an infant with congenital syphilis after clindamycin treatment of the mother during pregnancy. *J Clin Microbiol.* 2007;45(2):659-61.
225. Zobanikova M, Mikolka P, Cejkova D, Pospisilova P, Chen L, Strouhal M, et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum* strain DAL-1. *Stand Genomic Sci.* 2012;7(1):12-21.
226. Giacani L, Iverson-Cabral SL, King JC, Molini BJ, Lukehart SA, Centurion-Lara A. Complete Genome Sequence of the *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* Sea81-4 Strain. *Genome Announc.* 2014;2(2):e00333.
227. Tong ML, Zhao Q, Liu LL, Zhu XZ, Gao K, Zhang HL, et al. Whole genome sequence of the *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* strain Amoy: An Asian isolate highly similar to SS14. *PLoS One.* 2017;12(8):e0182768.

228. Zbanikova M, Strouhal M, Mikalova L, Cejkova D, Ambrozova L, Pospisilova P, et al. Whole genome sequence of the *Treponema* Fribourg-Blanc: unspecified simian isolate is highly similar to the yaws subspecies. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(4):e2172.
229. Cejkova D, Zbanikova M, Chen L, Pospisilova P, Strouhal M, Qin X, et al. Whole genome sequences of three *Treponema pallidum* ssp. *pertenue* strains: yaws and syphilis treponemes differ in less than 0.2% of the genome sequence. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(1):e1471.
230. Knauf S, Gogarten JF, Schuenemann VJ, De Nys HM. Nonhuman primates across sub-Saharan Africa are infected with the yaws bacterium *Treponema pallidum* subsp. *pertenue*. Emerg Microbes Infect. 2018;7(1):157.
231. Giacani L, Jeffrey BM, Molini BJ, Le HT, Lukehart SA, Centurion-Lara A, et al. Complete genome sequence and annotation of the *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* Chicago strain. J Bacteriol. 2010;192(10):2645-6.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado aplicado a cada paciente al momento de la toma de muestras.

FORMA DE CONSENTIMIENTO

Forma de Consentimiento Informado para: Toma de muestra a paciente

Investigador Principal: Lic. Angel Alberto Noda Ramos

Institución/Organización: Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK)

Patrocinador: MINSAP

Proyecto: “Diagnóstico y caracterización molecular de la infección por *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* en Cuba.”

Este formato consta de 2 partes:

1. Hoja Informativa (para compartir información del estudio)
2. Certificado de Consentimiento (para ser firmado si desea participar)

PARTE I: HOJA INFORMATIVA

1. (Propósito): La sífilis venérea constituye en la actualidad la ITS bacteriana más frecuente en Cuba y una de las más frecuentes en el mundo. La transmisión es fundamentalmente por vía sexual, contacto directo con piel y mucosas y transmisión vertical como resultado del pase transplacentario del agente causal, *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, durante el embarazo. La sífilis es además, una de las siete infecciones de transmisión sexual (ITS) curables causadas por bacterias; sin embargo, se estima una aparición global de 11 millones de casos nuevos en adultos cada año con un notable incremento en el número de casos en los últimos años, lo que apunta a la necesidad del fortalecimiento de los programas globales de vigilancia y control de esta infección. Mediante la presente investigación se pretende implementar el diagnóstico molecular de la sífilis temprana en Cuba así como conocer los genotipos circulantes y los patrones de resistencia a las drogas de segunda línea.

- 2. (Beneficios):** Dado la importancia y frecuencia actual de la sífilis en Cuba, los resultados de esta investigación permitirán brindar conclusiones científicas a nuestro Sistema Nacional de Salud para lograr una mejor atención de las ITS en Cuba. Los pacientes involucrados se verán beneficiados por un diagnóstico y seguimiento oportuno por parte del dermatólogo de atención involucrado.
- 3. (Procedimiento):** El doctor o la doctora/enfermera/técnico responsable de la toma de muestra le realizará un conjunto de preguntas recogidas en la encuesta epidemiológica que permitirán conocer algunos aspectos claves sobre la infección que usted padece, así como le será tomadas muestras de exudado genital, oral, anal o biopsia de lesiones en piel. Todas las muestras serán destruidas una vez terminado el estudio.
- 4. (Quiénes están incluidos en el estudio):** Todos los pacientes con úlceras ano/genitales, orales o lesiones en piel que asistieron a la consulta de dermatología del IPK y que conscientemente decidieron ser incluidos en el estudio.
Los criterios para ser excluidos: No voluntariedad.
- 5. (Confidencialidad y privacidad):** Los médicos de asistencia de cada paciente tendrán acceso a los datos personales y registros de los resultados de la investigación de los pacientes que cada uno atiende, no al resto. Toda la información referida a usted, aunque puede ser revisada por otros investigadores, autoridades hospitalarias y regulatorias estatales, no se hará pública en ningún caso. Su identidad no será revelada en ninguna publicación científica y se identificará a través de un código de identificación.

Las encuestas se guardarán en la oficina del Responsable principal de la investigación y se destruirán después de cinco años de concluido el mismo por el personal del equipo.
- 6. (Cuáles son sus derechos como participantes):** Ud. debe recibir periódicamente información acerca de sus resultados y la conducta a seguir. Además de las conclusiones a las que se arriben al final de estudio.
- 7.** Le reiteramos que puede abandonar el estudio cuando lo desee, sin dar explicaciones por ello, y sin afectar los cuidados posteriores que deba recibir.

¿Tiene alguna duda o pregunta hasta aquí?

- 8. (Riesgos y molestias):** Usted puede sentir o sufrir algún tipo de molestia, ligero sangramiento o dolor, durante el procedimiento de toma de la muestra, lo cual resulta normal en este tipo de examen.
- 9. (Preguntas e inquietudes sobre la presente investigación):** Cualquier pregunta que usted tenga, puede realizarla en cualquier momento a los especialistas/investigadores tratantes de su centro de atención de salud o al investigador responsable (ver datos de contacto debajo).
- 10. (Publicación de los resultados):** Queda prohibida la información vía telefónica o de otra forma impersonal que viole la confidencialidad del estudio. Una vez terminado el estudio y analizado los datos, los resultados globales y sus implicaciones podrán y deberán ser publicados para el conocimiento de cualquier persona o profesional interesado, en forma de artículo científico, tesis o presentaciones en congresos científicos.
- 11. (Participación voluntaria):** Su participación es voluntaria; pero si no quiere participar en este estudio puede detener la entrevista en cualquier momento. Si tiene alguna pregunta puede realizarla ahora o en cualquier momento también. Al finalizar la entrevista responderé a todas sus preguntas. Si quiere saber más del estudio después de que nos vayamos, puede contactar a la siguiente persona:

Responsable: Angel Alberto Noda Ramos (Investigador principal)

Teléfono y dirección: 255-3551. Instituto Pedro Kourí. Autopista Novia del Mediodía km 6 ½. La Lisa.

PARTE II: CERTIFICADO DE CONSENTIMIENTO

Se me ha informado que el propósito de la investigación titulada "Diagnóstico y caracterización molecular de la infección por *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* en Cuba.", es la implementación del diagnóstico molecular de la sífilis temprana en Cuba así como conocer los genotipos circulantes y los patrones de resistencia a las drogas de segunda línea. La toma de la muestra (exudado de lesiones ulceradas) será realizada en la consulta de dermatología de nuestra Institución, por personal autorizado y con experiencia en ese menester, y cumpliendo todas las normas éticas y de bioseguridad. La muestra obtenida para el estudio no será empleada para realizar ningún otro estudio, ni prueba que no sea lo estrictamente estipulado en el presente proyecto.

Se me ha informado que los riesgos de participar en el estudio son mínimos y se refieren a aquellas situaciones incómodas que resultan de la toma de la muestra de exudado de la lesión ulcerada, tales como un poquito de dolor en el sitio de la lesión o en muy raras ocasiones un pequeño sangramiento en la zona donde se toma la muestra.

Se me ha informado que los beneficios para mí serán que una vez tenga el diagnóstico oportuno, se me ofrecerá completo seguimiento y tratamiento en la consulta de dermatología del IPK. Por otro lado, el médico de asistencia contará con un nuevo soporte de laboratorio que le permitirá el diagnóstico oportuno y la detección de resistencia antimicrobiana del agente causal de la sífilis. Le permitirá al sistema de salud conocer la prevalencia de *T. pallidum* y su frecuencia de distribución en Cuba. Elevará el nivel científico de nuestras instituciones, al contar con el equipamiento adecuado y con el personal entrenado en el análisis de las pruebas de laboratorio.

Se me ha informado que mi participación es totalmente voluntaria y estoy en todo mi derecho de decidir si deseo o no colaborar con el estudio y una vez en él, puedo solicitar mi exclusión en cualquier etapa del mismo, si así lo deseara. Se me ha informado que esta decisión será respetada y no conllevará a ninguna penalidad o pérdida de los beneficios, a los cuales tengo derecho, incluido recibir la terapia adecuada en el momento que la requiera. Se me ha informado que podré conocer el resultado del estudio en las diferentes fases del proyecto hasta la conclusión final, y que me serán explicados, de desearlo.

Se me ha informado que la información ofrecida se mantendrá bajo estricta confidencialidad y que no se utilizará mi nombre o cualquier otra información que pueda identificarme.

Si en algún momento deseo obtener información adicional sobre este proyecto puedo contactar al Lic. Angel Alberto Noda Ramos, al teléfono 7 2553530.

He leído el contenido de esta hoja de consentimiento y he escuchado la explicación dada por el Investigador. Se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas acerca de este proyecto y las mismas me han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de esta hoja de consentimiento. Mi firma en este documento certifica que soy mayor de edad, que tengo capacidad legal para consentir y que consiento a participar.

Nombre del participante o tutor _____

Firma _____ Fecha (*día/mes/año*) _____

Soy testigo de la correcta lectura de esta forma de consentimiento al participante de la entrevista (muestreo) y de que ha tenido la oportunidad de hacer las preguntas pertinentes al caso. Confirmando que el individuo otorga su consentimiento libre y voluntariamente.

Nombre del testigo _____

Firma _____ Fecha (*día/mes/año*) _____

Atestiguo la lectura correcta de esta forma de consentimiento al participante potencial, y de que ha tenido la oportunidad de hacer las preguntas pertinentes al caso. Confirmando que el individuo otorga su consentimiento libre y voluntariamente.

Nombre del Investigador _____

Firma _____ Fecha (*día/mes/año*) _____

Anexo 2. Encuesta clínico-epidemiológica aplicada a cada paciente al momento de la toma de muestras.

**Encuesta clínico-epidemiológica para estudio de lesiones ulceradas y en piel en
pacientes con sospecha de ITS**

- Nombre del paciente: _____
- Fecha: _____ Identificación de la muestra: _____
- Edad: _____ Sexo: _____ No. Historia Clínica _____
- Provincia _____
1. Mantiene relaciones sexuales con:
____ personas del mismo sexo ____ personas del sexo contrario ____ personas de ambos sexos
____ siempre con la misma persona
____ con varias personas conocidas, siempre las mismas
____ esporádicamente con personas desconocidas o poco conocidas
____ frecuentemente con personas desconocidas o poco conocidas
 2. Usa condón: No _____ Sí _____ Siempre _____ A veces _____
 3. Es paciente seropositivo al VIH: Sí _____ No _____
 4. Ha tenido anteriormente otra infección de transmisión sexual:
No _____ Sí _____ Cuál _____ Cuándo _____
 5. Qué tiempo lleva con la lesión: _____
 6. # lesiones genitales: _____
 7. Localización de la lesión:
Hombres: Glande o prepucio _____ Cuerpo del pene _____
Base del pene _____ Otra (cuál) _____
Mujeres: Labios mayores _____ Labios menores _____
Vagina _____ Endocervix _____ Otra (cuál) _____
 8. La lesión es dolorosa: Sí _____ No _____
 9. Presencia de secreción en la lesión: Sí _____ No _____
 10. Ha recibido algún tratamiento con antimicrobianos durante los últimos 15 días:
No _____ Sí _____ Cuál _____
 11. Es alérgico a la penicilina
No _____ Sí _____
 12. Mencione otros signos o síntomas clínicos que presente:

 13. Ha salido al exterior o ha tenido contacto sexual con extranjeros en los últimos 6 meses.
No _____ Sí _____ País _____

Anexo 3. Secuencia de cada cebador y sonda utilizados durante el estudio.

Gen diana	Cebador (5' - 3')	Sonda [marcaje] (5' - 3') [marcaje]	Talla del producto de PCR (pb)	Referencia	Utilidad
β -globina humana	ACACAACCTGTGTTCACTAGC CAACTTCATCCACGTTCAACC	[YY]-TCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCC-[BHQ1]	110	(132)	Control de la extracción de ADN y de inhibición de la PCR
<i>polA</i>	TGCGCGTGTGCGAATGGTGTGGTC CACAGTGCTCAAAAACGCCTGCACG		377	(222)	Diagnóstico de sífilis (PCR a punto final)
<i>polA</i>	CAGGATCCGGCATATGTCC AAGTG TGAGCGTCTCATATTCC	[FAM]-CTGTCATGCACCAGCTTCGACGTCTT-[BHQ1]		(72)	
<i>tpp47</i>	CAACACGGTCCGCTACGACTA TGCCATAACTCGCCATCAGA	[ROX]-ACGGTGATGACGCGAGCTACACCA-[BHQ3]		(72)	Diagnóstico de sífilis (PCR en tiempo real)
ADNr 16S	GCCTTTGAGATGGGGATAGC GTCGCAGGCTCATCTCTGA	[FAM]-CCGCAGCCCCTTTCCT CTCA-[BHQ-1]		(223)	
<i>arp</i>	CAAGTCAGGACGGACTGTCC GGTATCACCTGGGGATGC		60		
<i>tpr</i>	ACTGGCTCTGCCACACTTGA CTACCAGGAGAGGGTGAAGC		2186	(83)	Caracterización de <i>T. pallidum</i> (Criterio mejorado CDC)
<i>tpr</i>	CAGGTTTTGCCGTTAAGC AATCAAGGGAGAATACCGTC		1836		
TP0548	GGTCCCTATGATATCGTGTTCG GTCATGGATCTGCGAGTGG		81	(9)	

Gen diana	Cebador (5' - 3')	Talla del producto de PCR (pb)	Referencia	Utilidad
TP0136	AACCCGTTAGCGCCCAACAT TCCCAGCTCAGCCGAATCTC	1789	(149)	Caracterización de <i>T. pallidum</i> (Criterio basado en MLSA)
	AGTGTCTTCCTCGTCCGTTT CACGTGGTGGTGTCAAACCTT	1206	(224)	
TP0548	TGGGGCACTAAACCGGAAGA TACGGGCATTTGCGGATAGG	1567	(149)	
	GCGGTCCCTATGATATCGTGT GAGCCACTTCAGCCCTACTG	1065	(224)	
TP0705	GGTCTATATGCAGCCCTTCTTC GCTTGAGAACGATACCGGATAC	1181	(10)	
	TGCGGCTTATCCTGATGAATAG TATTCTGCGGCGTTGGATAG	803		
ADNr 23S	CGAAGGGAAGCAGGTGTAGT GCGCGAACACCTCTTTTTTAC	1666 y 1658	(139)	
	GAACCGTCCCTGAAAACCTCA GTACCGCAAACCGACACAG	629		
ADNr 16S	GTGGATGAGGAAGGTGCGAAA CAGAGTCCCCAACACCACTT	748	(140)	
	TCAACTTGGGAAGTGCCTG CAGAGTCCCCAACACCACTT	531		
TP0326	CGTTTAAGATCACGGTGGTG CGGACCGTAGCTCATTTTGT	1346	Esta tesis	
	CCTGAATGTGGAGGAGCAGT TTTTTCGAGAAAGGGAACGA	658		
TP0367	TTGCTCCTCAGGGGATTATG TCGCTCAGAAGCAGATTCAA	1274	Esta tesis	
	AAGCTGAGGCAGGACAAAAA TCATCAAGCATCCCAACAAA	940		
TP0488	TCCGTAGCGAGCTTTGTGTA AGCAAAGCGAATCTTCTCCA	1370	Esta tesis	
	GAAGTTTTGCAAGGCTCGTC CCCATAAACTCGGAGACAG	624		

TP0859	GCTACGACGCTGCGATCT	1250	Esta tesis	Confirmación de las subespecies de <i>T. pallidum</i>
	TTTTGGTTCAGCTGCAAAAG			
TP0861	GCACGAAATGACGTGGACTA	955	Esta tesis	
	CCCCAATTGAAACGTAGTGG			
TP0861	GGTGTACCGCTCCTATTTGC	1167	Esta tesis	
	GTGGGATGTCAGGTGGAGAT			
TP0865	TTGCAGCTGAACCAAAAGGT	804	Esta tesis	
	GGGGTCAGAAATAGGGGTTG			
TP0865	AATTGCAAAAGCTTCGTTGC	1274	Esta tesis	
	GGGATGTCTGCCTTGTGTCT			
ADNr 16S	GCGTCGGTCTCGATTAAAAA	1035	Esta tesis	
	GGTGAAGTTCTGGGGGAAGT			
ADNr 16S	GTGGATGAGGAAGGTCGAAA	1248	Esta tesis	
	CAAAAGGGAAGGGGAGAGAC			
TP0179	ACTAGGTGTTGGGGCATGAG	694	Esta tesis	
	CCGGTACGGCTACCTTGTTA			
TP0179	CTCTGAGTTTACCGAGGAAGATG	709	Esta tesis	Confirmación de los grupos genéticos de TPA en genotipos de difícil clasificación
	GAGGTGTTTGTACGTGTGGA			
TP0558	GGTGGTGAACCTCAGTGGTT	610	Esta tesis	
	TCTCCTCGGGCAGACTTT			
TP0558	GCAGCCTTCCTACGAAATTG	1092	Esta tesis	
	TCAACCGAGTGAAGCTACGA			
TP0558	GAAAGCACTCCCCAATACGA	797	Esta tesis	
	GCTGAGCACCAGAATCATCA			

Anexo 4. Operacionalización de las variables utilizadas en el análisis univariado y multivariado.

Variable	Tipo	Operacionalización Escala	Descripción
Edad	Cuantitativa continua	15-20 21-30 31-40 >40	Edad en años cumplidos
Uso de condón	Cualitativa nominal	Sí No	Disposición o conducta habitual de mantener relaciones sexuales utilizando condón
Antecedentes de ITS	Cualitativa nominal	Sí No	Haber padecido alguna infección de transmisión sexual en algún momento anterior al estudio
Seropositividad al VIH	Cualitativa nominal	Sí No	Diagnóstico de la infección por el VIH previo o durante la realización del estudio.
Orientación sexual	Cualitativa nominal	HSH Heterosexual	Disposición o conducta de mantener relaciones sexuales con personas de su propio sexo y/o del sexo opuesto
Prácticas sexuales de riesgo	Cualitativa nominal	Sí No	Prácticas sexuales con la misma persona, con varias personas conocidas o desconocidas y la frecuencia de estas prácticas
Tiempo con la lesión	Cuantitativa continua	0-7 8-15 >15	Número de días que median desde la aparición de la lesión hasta el día de toma del exudado
Número de lesiones ulceradas	Cualitativa nominal	Única Múltiples	Número de lesiones ulceradas al momento de la toma del exudado
Localización de la lesión	Cualitativa ordinal	Glande o prepucio Cuerpo del pene Base del pene Otra	Localización anatómica de la lesión ulcerada al momento de la toma del exudado
Dolor en la lesión	Cualitativa nominal	Sí No	Referencia de dolor por el paciente en el sitio de la lesión ulcerada
Secreción en la lesión	Cualitativa nominal	Sí No	Presencia de secreción en la lesión ulcerada al momento de la toma del exudado o referencia de esto por el paciente en momentos anteriores
Tratamiento con antimicrobianos	Cualitativa nominal	Sí No	Información referida por el paciente y/o en la historia clínica relacionada con la administración de antimicrobianos en los 15 días antes de la toma del exudado
Alergia a la penicilina	Cualitativa nominal	Sí No	Información referida por el paciente y/o en la historia clínica relacionada con alergias a la penicilina
Relaciones sexuales con extranjeros	Cualitativa nominal	Sí No	Información referida por el paciente relacionada con haber tenido relaciones sexuales con extranjeros en los seis meses antes de la toma del exudado

Anexo 5. Secuencias génicas de *T. pallidum* utilizadas en el estudio para el análisis filogenético.

Cepa o aislado/Código genoma <u>GenBank</u>^a	Subespecies	Fuente de obtención	Referencias
Nichols/CP004010.2	TPA	Pases en conejos	(190)
SS14/CP004011.1	TPA	Pases en conejos	(190)
Mexico A/CP003064.1	TPA	Pases en conejos	(34)
DAL-1/CP003115.1	TPA	Pases en conejos	(225)
Sea81-4/CP003679.1	TPA	Pases en conejos	(226)
Chicago/CP001752	TPA	Pases en conejos	(226)
Amoy/CP0015162	TPA	Pases en conejos	(227)
PT_SIF0697	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF0751	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF0857	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF0877_3	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF0908	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF0954	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF1002	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF1020	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF1063	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF1127	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF1135	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF1140	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF1142	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF1156	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF1167	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF1183	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF1196	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF1200	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF1242	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF1252	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF1261	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF1278	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF1280	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF1299	TPA	Casos clínicos	(151)
PT_SIF1348	TPA	Casos clínicos	(151)
Bosnia A/CP007548.1	TEN	Pases en conejos	(35)
Iraq B	TEN	Pases en conejos	(34)

11q/j	TEN	Casos clínicos	(36)
Fribourg-Blanc/CP003902.1	TPE	Pases en conejos	(228)
Samoa D/CP002374.1	TPE	Pases en conejos	(229)
CDC-2/CP002375.1	TPE	Pases en conejos	(229)
Gauthier/CP002376.1	TPE	Pases en conejos	(229)
CDC2575	TPE	Pases en conejos	(204)
Ghana051	TPE	Pases en conejos	(204)
LMNP-1	TPE	Casos clínicos	(230)

^aSe utilizaron todas las secuencias de *T. pallidum* disponibles en el [GenBank](#) que contenían los *loci* (TP0136, TP0326, TP0367, TP0488, TP0548, TP0859, TP0861, TP0865 y ADNr 16S).

Anexo 6. Relación de los genomas completos de *T. pallidum* secuenciados hasta el momento.

Cepa/Aislado	Grupo genético	País	Año	Fuente de obtención	Código de genoma (GenBank)	Referencias
Nichols	<u>Nichols-like</u>	EUA	1912	Pases en conejos	CP004010.2	(190)
SS14	<u>SS14-like</u>	EUA	1977	Pases en conejos	CP004011.1	(190)
Chicago	<u>Nichols-like</u>	EUA	1951	Pases en conejos	CP001752.1	(231)
Mexico A	<u>SS14-like</u>	México	1953	Pases en conejos	CP003064.1	(34)
DAL-1	<u>Nichols-like</u>	EUA	1991	Pases en conejos	CP003115.1	(225)
SEA81-4	<u>Nichols-like</u>	EUA	1981	Pases en conejos	CP003679.1	(226)
Amoy	<u>SS14-like</u>	China	2011	Pases en conejos	CP015162.1	(227)
AU13	<u>SS14-like</u>	Austria	2013	Casos clínicos	No depositado	(4)
AU15	<u>SS14-like</u>	Austria	2013	Casos clínicos	No depositado	(4)
AU16	<u>SS14-like</u>	Austria	2013	Casos clínicos	No depositado	(4)
AU17	<u>SS14-like</u>	Austria	2013	Casos clínicos	No depositado	(4)
CZ27	<u>SS14-like</u>	República Checa	2012	Casos clínicos	No depositado	(4)
CZ33	<u>SS14-like</u>	República Checa	2013	Casos clínicos	No depositado	(4)
GRA2	<u>SS14-like</u>	EUA	1980-1999	Pases en conejos	No depositado	(4)
NE12	<u>SS14-like</u>	Holanda	2013	Casos clínicos	No depositado	(4)
NE13	<u>SS14-like</u>	Holanda	2013	Casos clínicos	No depositado	(4)
NE14	<u>SS14-like</u>	Holanda	2013	Casos clínicos	No depositado	(4)
NE15	<u>SS14-like</u>	Holanda	2013	Casos clínicos	No depositado	(4)
NE17	<u>SS14-like</u>	Holanda	2013	Casos clínicos	No depositado	(4)
NE19	<u>SS14-like</u>	Holanda	2013	Casos clínicos	No depositado	(4)
SW1	<u>SS14-like</u>	Suiza	2012	Casos clínicos	No depositado	(4)
SW4	<u>SS14-like</u>	Suiza	2012	Casos clínicos	No depositado	(4)
SW6	<u>SS14-like</u>	Suiza	2012	Casos clínicos	No depositado	(4)
SW8	<u>SS14-like</u>	Suiza	2012	Casos clínicos	No depositado	(4)
UW249B	<u>SS14-like</u>	EUA	2004	Pases en conejos	No depositado	(4)
BAL3	<u>Nichols-like</u>	EUA	1973	Pases en conejos	No depositado	(4)
BAL73	<u>Nichols-like</u>	EUA	1973	Pases en conejos	No depositado	(4)
NE20	<u>Nichols-like</u>	Holanda	2013	Casos clínicos	No depositado	(4)
SEA86-1	<u>Nichols-like</u>	EUA	1986	Pases en conejos	No depositado	(4)
SHC_0	<u>SS14-like</u>	China	2014	Pases en conejos	No depositado	(210, 212)
SHD_R	<u>SS14-like</u>	China	2014	Pases en conejos	No depositado	(210, 212)

Cepa/Aislado	Grupo genético	País	Año	Fuente de obtención	Código de genoma (GenBank)	Referencias
SHE_V	<u>SS14-like</u>	China	2014	Pases en conejos	No depositado	(210, 212)
SGF_12	<u>SS14-like</u>	China	2014	Pases en conejos	No depositado	(210, 212)
B3	<u>SS14-like</u>	China	2015	Pases en conejos	No depositado	(210, 212)
C3	<u>SS14-like</u>	China	2015	Pases en conejos	No depositado	(210, 212)
K3	<u>SS14-like</u>	China	2015	Pases en conejos	No depositado	(210, 212)
Q3	<u>SS14-like</u>	China	2015	Pases en conejos	No depositado	(210, 212)
PT_SIF1348	<u>SS14-like</u>	Portugal	2014	Casos clínicos	No depositado	(151)
PT_SIF1127	<u>SS14-like</u>	Portugal	2013	Casos clínicos	No depositado	(151)
PT_SIF1135	<u>SS14-like</u>	Portugal	2013	Casos clínicos	No depositado	(151)
PT_SIF1140	<u>SS14-like</u>	Portugal	2013	Casos clínicos	No depositado	(151)
PT_SIF1142	<u>SS14-like</u>	Portugal	2013	Casos clínicos	No depositado	(151)
PT_SIF1156	<u>SS14-like</u>	Portugal	2013	Casos clínicos	No depositado	(151)
PT_SIF1167	<u>SS14-like</u>	Portugal	2013	Casos clínicos	No depositado	(151)
PT_SIF1183	<u>SS14-like</u>	Portugal	2013	Casos clínicos	No depositado	(151)
PT_SIF1196	<u>SS14-like</u>	Portugal	2013	Casos clínicos	No depositado	(151)
PT_SIF1200	<u>SS14-like</u>	Portugal	2013	Casos clínicos	No depositado	(151)
PT_SIF1242	<u>SS14-like</u>	Portugal	2014	Casos clínicos	No depositado	(151)
PT_SIF1299	<u>SS14-like</u>	Portugal	2014	Casos clínicos	No depositado	(151)
PT_SIF1252	<u>SS14-like</u>	Portugal	2014	Casos clínicos	No depositado	(151)
PT_SIF1261	<u>SS14-like</u>	Portugal	2014	Casos clínicos	No depositado	(151)
PT_SIF1278	<u>SS14-like</u>	Portugal	2014	Casos clínicos	No depositado	(151)
PT_SIF1280	<u>SS14-like</u>	Portugal	2014	Casos clínicos	No depositado	(151)
PT_SIF0877_3	<u>SS14-like</u>	Portugal	2010	Casos clínicos	No depositado	(151)
RP_SIF0751	<u>SS14-like</u>	Portugal	2009	Casos clínicos	No depositado	(151)
PT_SIF0857	<u>SS14-like</u>	Portugal	2010	Casos clínicos	No depositado	(151)
PT_SIF0697	<u>SS14-like</u>	Portugal	2009	Casos clínicos	No depositado	(151)
PT_SIF0908	<u>SS14-like</u>	Portugal	2010	Casos clínicos	No depositado	(151)
PT_SIF0954	<u>SS14-like</u>	Portugal	2010	Casos clínicos	No depositado	(151)
PT_SIF1002	<u>SS14-like</u>	Portugal	2011	Casos clínicos	No depositado	(151)
PT_SIF1020	<u>SS14-like</u>	Portugal	2011	Casos clínicos	No depositado	(151)
PT_SIF1063	<u>SS14-like</u>	Portugal	2013	Casos clínicos	No depositado	(151)

**PRODUCCIÓN CIENTÍFICA
DEL AUTOR SOBRE EL
TEMA DE LA TESIS**

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR SOBRE EL TEMA DE LA TESIS

PUBLICACIONES

1. **Noda AA**, Matos N, Blanco O, Rodríguez I, Stamm LV. First report of the 23S rRNA gene A2058G point mutation associated with macrolide resistance in *Treponema pallidum* from syphilis patients in Cuba. Sex Transm Dis. 2016; 43(5):332-4. **(FI: 2,968)**
2. **Noda AA**, Blanco O, Correa C, Pérez L, Kourí V, Rodríguez I. Etiology of genital ulcer disease in male patients attending a sexually transmitted diseases clinic: First assessment in Cuba. Sex Transm Dis 2016; 43(8):494-7. **(FI: 2,968)**
3. **Noda AA**, Grillová L, Lienhard R, Blanco O, Rodríguez I, Šmajš D. Bejel in Cuba: molecular identification of *Treponema pallidum* subsp. *endemicum* in patients diagnosed with venereal syphilis. Clin Microbiol Infect. 2018, doi.org/10.1016/j.cmi.2018.02.006. **(FI: 5,824)**
4. Grillová L*, **Noda AA***, Lienhard R, Blanco O, Rodríguez I, Šmajš D. Multilocus sequence typing of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Cuba from 2012 to 2017. J Infect Dis. 2018; doi.0.1093/infdis/jiy604. **(FI: 5,345) *Primer autor compartido (igual contribución)**
5. **Noda AA**, Espinosa Y, Rodríguez I. Bejel en Cuba: evidencias moleculares. Bol IPK. 2018; 28(40):313-320.
6. **Noda AA**, Rodríguez I, Grillová L, Bosshard PP, Lienhard R. Accuracy of PCR and serological testing for the diagnosis of primary syphilis: both tests are necessary. Int J STD AIDS. 2019; *Aceptada el 13 de abril de 2019.* **(FI: 1,504)**

PRESENTACIÓN DE RESULTADOS EN EVENTOS CIENTÍFICOS

1. IV Curso-Taller Internacional de Leptospirosis, Sífilis y Borreliosis “Espiroquetas, Habana 2016” del 9 al 13 de mayo de 2016: Detección molecular, genotipaje y resistencia antimicrobiana en *Treponema pallidum* en Cuba. Conferencista: **Noda AA.**
2. Swiss Congress of Microbiology (Suiza) del 8 al 10 de agosto de 2017: Molecular confirmation of early syphilis: is *polA* or *tp47* the most feasible PCR target? Autor principal: **Noda AA.**
3. Congreso 80 Aniversario del Instituto de Medicina Tropical. IX Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. VI Congreso Nacional de Medicina Tropical. VI Seminario Internacional sobre la Infección por el VIH y el sida en Cuba. V Simposio Internacional. Chromoblastomycosis: Una enfermedad desatendida del 4 al 8 de diciembre de 2017: Bejel en Cuba: identificación molecular de *Treponema pallidum* subsp. *endemicum* en pacientes cubanos diagnosticados con sífilis venérea. Autor principal: **Noda AA.**
4. Curso pre-congreso: Retos de la medicina tropical y la infectología en estos tiempos. Hospital Calixto García del 4 al 8 de diciembre de 2017: Resistencia microbiana en *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. Conferencista: **Noda AA.**
5. Curso internacional “Espiroquetas-Brucelas Habana 2018” (9na edición) del 28 al 31 de mayo de 2018: *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*: Detección molecular, subtipaje y resistencia antimicrobiana. Conferencista: **Noda AA.**
6. Actividad Científica de la Sociedad Cubana de Microbiología y Parasitología el 20 de marzo de 2019. Bejel (sífilis endémica): Hallazgos en Cuba y aportes al conocimiento científico. Conferencista: **Noda AA.**

RESULTADOS CIENTÍFICOS

1. Premio BTJ-IPK 2016. *Treponema pallidum* en pacientes cubanos: Prevalencia en enfermedad genital ulcerada, caracterización molecular y resistencia a macrólidos. Autor principal: **Noda AA.**
2. Resultado Relevante Institucional 2017. Aportes microbiológicos a la prevención y control de la sífilis venérea en Cuba. Autor principal: **Noda AA.**
3. Premio en la XLII edición del Premio Anual de Salud 2017 (Nivel Central). Aportes científicos al conocimiento de la infección por *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* en Cuba. Autor principal: **Noda AA.**
4. Mención en la XLII edición del Premio Anual de Salud 2017 (Nivel Nacional). Aportes científicos al conocimiento de la infección por *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* en Cuba. Autor principal: **Noda AA.**
5. Resultado Relevante Institucional 2018. Bejel (sífilis endémica): Hallazgos en Cuba y aportes al conocimiento científico. Autor principal: **Noda AA.**
6. Logro de la Academia de Ciencias de Cuba 2019. Bejel (sífilis endémica): Hallazgos en Cuba y aportes al conocimiento científico. Autor principal: **Noda AA.**

TESIS DEFENDIDAS Y TUTOREADAS

1. Tesis en opción al título de Licenciado en Microbiología: Diagnóstico molecular, subtipaje y detección de resistencia a macrólidos de *Treponema pallidum* en Cuba. Autora: Nelvis Matos. Julio 2015.
2. Tesis en opción al título de Médico Especialista de Primer Grado en Microbiología: Sífilis venérea en hombres cubanos que tienen sexo con hombres. IPK, Octubre 2015-Junio 2016. Autora: Dra. Marilyn Morales Martínez. Junio 2017.

**PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DEL
AUTOR NO RELACIONADAS
CON TEMA DE LA TESIS**

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DEL AUTOR NO RELACIONADAS CON TEMA DE LA TESIS

1. Rodríguez I, Fernández C, Fuentes O, González RA, Martínez B, Echevarría E, **Noda AA**, Obregón AM. Evidences of autochthonous infection by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Cuba. Biotec Apl. 2012; 29:190-93.
2. Fernández C, Obregón AM, Rodríguez I, Rodríguez Y, Mondeja BA, **Noda AA**, Rodríguez JE, Echevarria E, Baños Y. Manual de Operaciones y Procederes para el diagnóstico de la leptospirosis humana. 2012; Ediciones DAMPSA: La Habana/Panamá (ISBN: 978-9962-9000-0-9).
3. **Noda AA**, Rodríguez I, Fuentes O, Quintana Y. Artificial infection assay of Cuban ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. Rev Cubana Med Trop. 2013; 65(2): 277-80.
4. Rodríguez I, Echevarria E, **Noda AA**, Rivero M, Hernández CM, Machado L, Roque de Escobar H, Espinosa Y, Gómez I, Pérez BR, Góngora M, Ruiz A, Brito Y. *Treponema pallidum* hemagglutination for confirmation of syphilis in Cuba. Rev Cubana Med Trop. 2013; 65(2): 264-71.
5. **Noda AA**, Rodríguez I, Mondeja B, Fernández C. Design, Optimization and Evaluation of a Polymerase Chain Reaction for Detection of *Borrelia* spp. Adv Clin Exp Med. 2013; 22(5): 639-53.
6. Rodríguez I, Torres C, Echevarría E, **Noda AA**. A new methodological proposal for the serological screening of syphilis using VDRL-Plus. Rev Cubana Med Trop. 2014; 66(1):158-61.

7. **Noda AA**, Rodríguez I. DNA isolation by Chelex-100: an efficient approach to consider in leptospirosis early stages. *J Coast Life Med.* 2014; 2(6): 501-4.
8. Rodríguez I, Fraga J, **Noda AA**, Mayet M, Duarte Y, Echevarría E, Fernández C. An alternative and rapid method for the extraction of nucleic acids from ixodid ticks by potassium acetate procedure. *Braz Arch Biol Technol.* 2014; 57(4): 542-47.
9. **Noda AA**, Rodríguez I, Rodríguez Y, Govín A, Fernández C, Obregón AM. High sensitive PCR method for detection of *Leptospira interrogans* in paraffin-embedded tissues. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014; 56(5): 234-38.
10. **Noda AA**, Rodríguez I, Rodríguez Y, Govín A, Obregón AM. Evaluation of PCR for molecular confirmation of leptospirosis in fresh tissue samples from deceased peoples. *Rev Cubana Med Trop* 2014; 66(3):447-52.
11. Rodríguez I, **Noda AA**, Echevarria E. Considerations on the use and interpretation of *Treponema pallidum* hemagglutination test for diagnosis of syphilis. *Indian J Sex Transm Dis* 2015; 36:219-20.
12. Rodríguez I, Burri C, **Noda AA**, Douet V, Gern L. Multiplex PCR for molecular screening of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Babesia* spp. *Ann Agric Environ Med* 2015; 22(4):647-51.
13. Rodríguez I, **Noda AA**, Echevarria E. Cerebrospinal fluid RPR-Carbon test (Centis, Cuba) as an alternative for diagnosis of neurosyphilis. *Rev Cubana Med Trop* 2015; 67(2):146-49.
14. **Noda AA**, Rodríguez I, Miranda J, Contreras V, Mattar S. First molecular evidence of *Coxiella burnetii* infecting ticks in Cuba. *Ticks Tick Borne Dis* 2016; 7:68-70.
15. **Noda AA**, Rodríguez I, Miranda J, Mattar S, Cabezas-Cruz A. First report of spotted fever group *Rickettsia* in Cuba. *Ticks Tick Borne Dis* 2016; 7:1057-1058.

16. Rodríguez I, **Noda AA**, Ale K, Stamm LV. The Cuban experience in the elimination of mother-to-child transmission of congenital syphilis. *Am J Pub Health* 2016; 106(11):1-2.
17. Stamm LV, **Noda AA**. Elimination of mother-to-child transmission of syphilis in the Americas - - a goal that must not slip away. *Sex Transm Dis.* 2017; 44(1):12-13.
18. **Noda AA**, Fleitas O, Rodríguez I, Beltran JF, Falcon R, Almaguer T, Samaha TH. Triton X-100 Vs. Triton X-114: Isolation of Outer Membrane Proteins from *Leptospira* spp. *Int J Vet Sci Technol.* 2017;1(1):007-012.
19. Rodríguez I, **Noda AA**, Echevarría E, Rodríguez ME, Iglesias TM, Lienhard R. About Lyme disease in Cuba and its knowledge by medical personnel. *Rev. Cubana Salud Pública.*2018;44(1):<http://www.revsaludpublica.sld.cu/index.php/spu/article/view/1028/1013>.
20. Tique V, Mattar S, Miranda J, Oviedo M, **Noda AA**, Montes E, Rodríguez V. Clinical and Epidemiological Status of Leptospirosis in a Tropical Caribbean Area of Colombia. *BioMed Research International.* 2018;<https://doi.org/10.1155/2018/6473851>.
21. Rodríguez I, **Noda AA**, Fuentes O, Lienhard R, Gern L. Evidence about human tick-borne infections in Cuba. *Acta Biomedica Scientifica*, 2018;3(5):164-5.