

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA

E.A.P. DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**Detección de ADN de *Treponema pallidum* en suero y plasma de una población de hombres que tienen sexo con hombres, seropositivos para sífilis atendidos en los centros de salud Alberto Barton y Epicentro, Lima
2013 – 2014**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciada en Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Chandel Hilary Danae FARROÑAY GARCIA

ASESORES

Eduardo Augusto VERÁSTEGUI LARA

Segundo LEÓN SANDOVAL

Silver VARGAS RIVERA

Lima - Perú

2017

**Detección de ADN de *Treponema pallidum* en suero y plasma
de una población de hombres que tienen sexo con hombres,
seropositivos para sífilis atendidos en los centros de salud
Alberto Barton y Epicentro, Lima 2013 – 2014.**

AUTOR

Bach. FARROÑAY GARCIA CHANDEL HILARY DANAE

ASESOR

Mg. Eduardo Augusto Verástegui Lara

Co-asesores

Mg. Segundo León Sandoval

Mg. Silver Vargas Rivera

Dedicado a

A mi madre Inés, por su amor y apoyo incondicional durante toda mi vida.

A mi hermano Richard, por guiarme en los estudios desde temprana edad.

A Beto, por ser mi compañero fiel durante todos mis años de estudio.

Agradecimientos

Agradezco a Dios por brindarme fortaleza, paciencia y perseverancia para culminar mis estudios. Un agradecimiento especial a Carmen Cabanillas, mi gran amiga y compañera desde la edad de 11 años, cuya motivación y preocupación me ha llevado a seguir y finalizar mis estudios universitarios. También agradezco a mi asesor y coasesores, al Mg. Eduardo Verástegui, asesor de la presente tesis, por su disponibilidad y apoyo para la realización de esta tesis, al Mg. Segundo León, por acompañarme y aconsejarme en cuanta idea de investigación se me presentaba y al Mg. Silver Vargas, por guiarme durante el tiempo de aprendizaje en el Laboratorio de Salud Sexual y durante el presente estudio.

ÍNDICE

Lista de tablas	VII
Lista de Figuras	VII
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES	10
1.2. IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	13
1.3. OBJETIVOS	14
1.4. BASES TEÓRICAS	14
1.4.1. Base teórica	14
1.4.2. Definición de términos.....	22
CAPÍTULO II MÉTODOS	23
2.1. DISEÑO METODOLÓGICO.....	24
2.1.1. Tipo de investigación	24
2.1.2. Diseño de la investigación.....	24
2.1.3. Población.....	24
2.1.4. Muestra y muestreo	24
2.1.5. Criterios de inclusión y exclusión	24
2.1.5.1. Criterios de inclusión.....	24
2.1.5.2. Criterios de exclusión.....	24
2.1.6. Variables.....	26
Variable principal	26
Variable secundaria.....	26
2.1.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	27
2.1.8. Procedimientos y análisis de datos.....	27
2.1.9. Consideraciones éticas	28
CAPÍTULO III RESULTADOS	29
CAPÍTULO IV DISCUSIÓN.....	40
CAPÍTULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	44
5.1. CONCLUSIONES	45

5.2. RECOMENDACIONES.....	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXO I.....	52
ANEXO II	54
ANEXO III	57
ANEXO IV.....	60

Lista de tablas

Tabla 1. Resultados de RPR y *Tpp47* en suero y plasma

Tabla 2. Resultados de *Tpp47* clasificados por título de RPR

Tabla 3. Frecuencia de *Tpp47* positivos en suero y plasma

Lista de Figuras

Figura 1. Resultados de PCR de muestras 1 al 12

Figura 2. Resultados de PCR de muestras 13 al 17

Figura 3. Resultados de PCR de muestras 18 al 25

Figura 4. Resultados de PCR de muestras 26 al 36

Figura 5. Resultados de PCR de muestras 37 al 50

Figura 6. Resultados de PCR de muestras 51 al 57

Figura 7. Resultados de PCR de muestras 58 al 64

Resumen

Objetivos: Detectar ADN de *Treponema pallidum* en suero y plasma de hombres que tienen sexo con hombres que se atendieron en los centros de salud Barton y Epicentro durante los años 2013 y 2014. **Métodos:** Se analizaron mediante PCR 64 muestras de 32 participantes, por cada uno se colectó una muestra de plasma y una de suero, dando un total de 32 muestras de plasma y 32 muestras de suero recolectadas durante los años 2013 y 2014 para detectar el marcador *Tpp47*, y los resultados de la prueba de RPR fueron obtenidos a partir de la base de datos del Laboratorio de Salud Sexual de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. **Resultados:** 1 de las 32 muestras de plasma y 3 de las 32 muestras de suero fueron positivas para *Tpp47*, todas las muestras positivas tuvieron títulos mayores a 1:64 en la prueba de RPR. **Conclusiones:** Se detectó ADN de *Treponema pallidum* en el 3.13% de las muestras de plasma y en el 9.38% de las muestras de suero. Se halló ADN de *Treponema pallidum* en una baja proporción de muestras de suero y plasma con un título de RPR mayor a 64 dils.

Abstract

Objectives: To detect DNA of *Treponema pallidum* in serum and plasma of men who have sex with men and who received medical attention in Barton and Epicentro health centers during 2013 and 2014. **Methods:** One sample of serum and one of plasma were extracted from each of the 32 men, giving a total of 64 samples, the samples were analyzed by PCR using the *Treponema pallidum Tpp47* gene and the RPR titers were taken from the Sexual Health Laboratory database. **Results:** 1 of the 32 samples of plasma and 3 of the 12 samples of serum were positive for *Tpp47*, all of the samples had RPR titers higher than 1:64. **Conclusions:** DNA from *Treponema pallidum* was detected in 3.13% of the plasma samples and in 9.38% of the serum samples. DNA of *Treponema pallidum* was detected in a low proportion of the samples of serum and plasma with RPR higher than 64 dils.

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

1.1. DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES

Ferreira et al (2014) Se buscó el ADN de *Treponema pallidum* en muestras de donantes de sangre en Brasil, donde se encontró ADN de *Treponema pallidum* en muestras de donantes de sangre con resultados de pruebas serológicas de tamizaje reactivas y pruebas serológicas confirmatorias positivas, mientras que en donantes con pruebas de tamizaje reactivas con títulos bajos no se encontró ADN de *Treponema pallidum*. (1).

Grange et al., (2012) Realizaron un PCR anidado para amplificar el gen *Tpp47* de *Treponema pallidum* en muestras de sangre e hisopados de lesiones. Estudiaron a 294 pacientes con sospechas de sífilis y 35 voluntarios sin la infección. 87 de los 294 pacientes tenían sífilis primaria, 103 sífilis secundaria, 40 sífilis latente y 64 no tenían sífilis. Los resultados de la PCR en los hisopados presentaron una alta concordancia con el diagnóstico de sífilis, sensibilidad de 82% y especificidad de 95%. No se encontró concordancia entre los resultados de la detección de *Treponema pallidum* en sangre y el diagnóstico de sífilis, con sensibilidades de 29,18, 14.7 y 24% y especificidades de 96, 92, 93, y 97% para células periféricas sanguíneas mononucleares, plasma, suero y sangre total respectivamente (2).

Castro et al., (2007) Se utilizaron distintos marcadores para detectar el ADN de *Treponema pallidum*, como *Tpp47*, *polA* y *M*. Las muestras recolectadas fueron sangre total, plasma, suero y raspados de lóbulo de oreja de 69 pacientes con sífilis latente y 18 con sífilis tratada. El marcador que se detectó en el mayor número de muestras fue *Tpp47* (39.1%). El mayor número de positivos fue obtenido en los raspados de oreja (56%), seguidos por el plasma (42.9%), sangre total (38.1%) y suero (25%) (3).

Salazar et al., (2007) Utilizaron PCR en tiempo real y midieron el ADN de *Treponema pallidum* en conejos infectados intratesticularmente con la cepa Nichols para determinar el efecto del procesamiento de la sangre en la distribución de los treponemas en varios compartimientos sanguíneos. Los niveles de ADN en plasma y sangre total son 10 veces

más altos que en suero y 200 veces más altos que en células sanguíneas periféricas mononucleares (4).

Kouznetsov et al., (2005) Se utilizó la PCR para amplificar el gen de la proteína de 47 kDa de *Treponema pallidum* en fracciones sanguíneas celulares (células sanguíneas periféricas mononucleares y granulocitos) y no celulares (suero y plasma). Se recolectaron las muestras de 25 pacientes, 15 que aún no habían iniciado tratamiento, de los cuales 2 tenían sífilis primaria, 6 sífilis secundaria y 7 sífilis latente; 10 que tenían historia de sífilis y habían iniciado tratamiento. El 53% de las muestras de suero de paciente que no iniciaban tratamiento resultaron positivas para *Tpp47*, encontrándose mayor número de muestras positivas en las recolectadas de los pacientes con sífilis secundaria. De las muestras de plasma solo se detectó ADN de *Treponema pallidum* en una muestra de los paciente no iniciaban tratamiento, correspondiendo a la muestra de un paciente con sífilis secundaria. No se detectó ADN de *Treponema pallidum* en las muestras de los pacientes que habían iniciado tratamiento (5).

Burstain et al., (1991) un ensayo para detectar el gen que codifica al inmunógeno de 47 kDa *Treponema pallidum*. Se utilizaron suspensiones de la cepa Nichols en solución salina a diferentes concentraciones y distintas muestras de pacientes con sífilis. El ensayo detecto aproximadamente 0.01 pg de ADN purificado de *Treponema pallidum*, se obtuvieron resultados positivos de suspensiones de treponemas que contenía más de 10 microorganismos. Se detectó ADN de *Treponema pallidum* en suero, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico de pacientes con sífilis (6).

La sífilis es un problema importante de salud pública en el Perú, especialmente en hombres que tienen sexo con hombres (HSH) y mujeres transgénero (MT), en estos grupos de riesgo la prevalencia estimada es del 21% (7). En un estudio realizado en los centros de salud Barton y Epicentro con hombres que tienen sexo con hombres y mujeres transexuales se encontró una prevalencia de sífilis de 7.7%, y una tasa de reinfección del 42.7%. La prevalencia de la coinfección del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y sífilis fue de 15.6% (8).

El diagnóstico de sífilis se basa en la observación clínica de las lesiones generadas y el enfoque clínico de los síntomas, este enfoque no es adecuado debido a que no detecta la infección en personas que se encuentran en etapas asintomáticas, además, ciertas manifestaciones clínicas pueden presentarse de forma atípica. El enfoque clínico y las técnicas de diagnóstico utilizadas actualmente no son capaces de diferenciar entre reinfección y fallo en el tratamiento (9,10). Asimismo se han detectado fallos al tratamiento alternativo debido a que existen cepas de *Treponema pallidum* sub especie pallidum resistentes a la azitromicina (11).

Los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *Treponema pallidum* son altamente sensibles y específicos en la detección de *Treponema pallidum*, incluso pueden diferenciar entre subespecies (12). La PCR puede ser utilizada para el monitoreo del tratamiento y la diferenciación de entre infecciones recientes o antiguas (13–15). A partir de la detección de ácido desoxirribonucleico (ADN) en muestras biológicas pueden detectarse mutaciones relacionadas con resistencia a azitromicina (13,16,17). La PCR ha sido probada en distintas muestras biológicas como exudados e hisopados de lesiones sifilíticas, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, sangre total, suero y plasma. Obteniéndose distintos porcentajes de detección en las diferentes muestras biológicas y los diferentes estadios de la infección (5,18–21).

Se ha encontrado ADN de *Treponema pallidum* en suero y plasma de pacientes con sífilis primaria, secundaria, latente y congénita. La obtención de dichas muestras es relativamente sencilla y poco invasiva (18,22,23). Además este tipo de muestras es de fácil almacenamiento y útiles para estudios epidemiológicos (18).

1.2. IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

La prevalencia de sífilis en el Perú es del 0.5% en hombres y 1.0% en mujeres de la población general. En HSH y MT la prevalencia es mucho mayor, un 21% presenta infección activa y un 35.5% tuvo sífilis alguna vez en su vida (24).

La infección por *Treponema pallidum* es diagnosticada en base a la observación de las úlceras en la infección primaria junto con el análisis microscópico de sus exudados en el estadio temprano, en los demás estadios es detectada por pruebas serológicas; estos métodos no son altamente sensibles ni específicos (10). Adicionalmente estos métodos no permiten conocer características genéticas de la bacteria que podrían contribuir a estudios de resistencia y estudios epidemiológicos.

La detección de ADN del *Treponema pallidum* por PCR es un método específico y sensible que ha sido estudiado para su uso en lesiones sifilíticas, siendo la recolección de este tipo de muestras solo posible durante la infección temprana (25,26). El suero y plasma pueden ser recolectados durante todos los estadios de la infección, además se ha observado la detección y disminución de ADN de *Treponema pallidum* en sangre periférica como respuesta al tratamiento de la sífilis, siendo esta prueba útil para el diagnóstico y el seguimiento de la persona infectada (15). Las muestras de suero y plasma suelen ser almacenadas durante periodos largos de tiempo, lo que las mantiene disponibles para estudios posteriores (18). Estas consideraciones contribuyen al diagnóstico y seguimiento de la sífilis en personas con la infección, y por ende los resultados del estudio contribuirán a evidenciar la detección de *Treponema pallidum* en muestras de fácil obtención y que pueden ser colectadas en cualquier estadio de la infección. Además estas muestras también son almacenadas frecuentemente en serotecas lo que hace que sean accesibles para realizar estudios posteriores en ellas.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general.

Detectar ADN de *Treponema pallidum* en suero y plasma de una población de hombres que tienen sexo con hombres, seropositivos para sífilis atendidos en los centros de salud Alberto Barton y Epicentro, Lima 2013 – 2014

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar la frecuencia de ADN de *Treponema pallidum* en suero y plasma de una población de hombres que tienen sexo con hombres, seropositivos para sífilis atendidos en los centros de salud Alberto Barton y Epicentro, Lima 2013 – 2014
- Calcular la frecuencia de la detección de ADN de *Treponema pallidum* en muestras de suero y plasma con títulos de RPR mayores a 64 dils
- Comparar suero y plasma como muestras para la detección de ADN de *Treponema pallidum* por PCR

1.4. BASES TEÓRICAS

1.4.1. Base teórica

La sífilis es una infección de transmisión sexual de gran importancia en la población de hombres que tienen sexo con hombres, en Perú se reporta una prevalencia de 13.4%, y 21% cuando se incluye la población de mujeres transgénero, un valor mucho mayor al de la población general y que se encuentra asociada a la infección por VIH (3). Se ha encontrado una mayor prevalencia de sífilis en ciudades de Iquitos y Pucallpa (30–32). La infección no solo se encuentra en los centros urbanos, también hay reportes de una prevalencia de 3.4% en comunidades indígenas del Alto Amazonas en Loreto (30).

El 18% de personas en Perú con infección por VIH también presenta infección por sífilis (31). La mayoría tiene una respuesta serológica normal y signos clínicos típicos, pero se han documentado excepciones como: Manifestaciones clínicas atípicas, respuesta serológica ausente, títulos en pruebas no treponémicas que no disminuyen después del tratamiento, títulos muy altos en pruebas no treponémicas, progresión rápida, desaparición de reactividad en pruebas treponémicas (10,32,33).

Agente Etiológico

El *Treponema pallidum* subespecie pallidum es el agente causal de la sífilis, se transmite por vía sexual y por vía vertical. *Treponema pallidum* tiene una capacidad metabólica limitada, no posee las enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico, ni cadena transportadora de electrones, obtiene las macromoléculas necesarias para su supervivencia del hospedero y genera otras mediante interconversión. Es un microorganismo no cultivable y no sobrevive fuera del hospedero. Su tiempo de replicación in vivo es lento, de 30 a 33 horas. Es un microorganismo muy frágil, debido a que no posee enzimas para la detoxificación de especies reactivas del oxígeno, sobrevive más tiempo en ambientes con baja concentración de oxígeno. Posee por lo menos una enzima que es inestable a temperatura corporal, es altamente sensible a temperaturas mayores a 37°C. A pesar de estas características *Treponema pallidum* es un organismo altamente invasivo. Se adhiere a diversos tipos de células, como las células epiteliales, mediante una interacción adhesina- ligando. La unión solo es posible entre células viables y treponemas viables. *Treponema pallidum* también se une a componentes del suero, de las membranas celulares y de la matriz extracelular. La unión a los componentes de la matriz extracelular explica la capacidad de *Treponema pallidum* de invadir diferentes tejidos y diseminarse durante la infección. Otro factor por el cual *Treponema pallidum* se disemina por todo el organismo es su movilidad, las espiroquetas tienen un movimiento característico de saca corcho. Posee un flagelo periplásmico que está compuesto de 3 a 6 fibrillas que están formadas por diversas proteínas que estimulan respuestas humorales y celulares (34–36).

Estadíos de la Infección

La sífilis tiene diversos estadíos, estos presentan distintas manifestaciones clínicas, formas de diagnóstico y ubicación de la bacteria. Los estadíos son: Sífilis primaria, sífilis secundaria, sífilis latente y sífilis terciaria.

En el estadio de Sífilis primaria, la bacteria penetra la epidermis a través de microabrasiones o membranas mucosas intactas, generando un chancro que se convierte en una ulceración, de forma general esta es indolora y no purulenta, pero se han reportado lesiones atípicas: múltiples, purulentas, dolorosas y destructivas. La lesión generalmente se observa en la zona genital, en varones en el pene y en mujeres en los labios vaginales o en el cérvix, también puede generarse en el recto y la cavidad oral. El chancro primario se desarrolla 3 semanas después de la exposición y el periodo de incubación varía entre 10 a 90 días y cura espontáneamente dentro de 4 a 6 semanas. La dosis infecciosa al 50% es de 57 organismos y las lesiones se desarrollan más rápido mientras más grande sea el tamaño del inóculo. Aproximadamente un 30% de las personas que tienen contacto sexual con una persona infectada desarrollarán sífilis (34,35,37).

En Sífilis secundaria el *Treponema pallidum* se disemina a varios tejidos. Las manifestaciones de sífilis secundaria ocurren dentro de los 3 meses desde la infección inicial: Dolor de garganta, dolores musculares, pérdida de peso, linfadenopatía, malestar y la erupción mucocutánea diseminada que no genera picazón que es la manifestación más común. La erupción mucocutánea diseminada consiste en lesiones maculares y discretas que aparecen en el tronco y las extremidades proximales. Otras manifestaciones menos comunes son: alopecia, uveítis anterior, meningitis, hepatitis, esplenomegalia, periostitis y glomerulonefritis. Las manifestaciones de la sífilis secundaria se resuelven espontáneamente 3 meses después de su aparición (35,37).

La sífilis latente se divide en dos estadíos según el tiempo de duración de la infección, sífilis latente temprana, infección con una duración menor a un año y sífilis latente tardía, infección con un tiempo de duración mayor a un año o muchas veces desconocido. Las

pruebas serológicas realizadas durante esta etapa tienden a ser positivas, pero la transmisión sexual es poco probable. Se ha observado bacteriemia intermitente durante este estadio (34,35).

La sífilis terciaria se desarrolla después de 10 a 20 años del inicio de la infección no tratada. Se caracteriza por lesiones nodulares con necrosis centrales variables, conocidas como Gumma, estas lesiones afectan la piel y los huesos, pero también pueden encontrarse en el hígado, corazón, cerebro, estómago y tracto respiratorio superior. En la sífilis terciaria también se presentan manifestaciones cardiovasculares y complicaciones neurológicas (34,35).

El *Treponema pallidum* puede invadir el sistema nervioso central durante estadios tempranos de la enfermedad. En la neurosífilis los valores de proteínas y leucocitos en líquido cefalorraquídeo (LCR) se encuentran aumentados y la prueba de VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) da un resultado reactivo. Los síntomas de meningitis aguda temprana incluyen dolor de cabeza, náuseas, vómitos y rigidez cervical. El compromiso del nervio craneal puede resultar en perturbaciones visuales, visión borrosa y fotofobia, pérdida de la audición y debilidad facial. Diversos estudios han asociado el desarrollo de neurosífilis con el título obtenido en la prueba de RPR (Rapid Plasmatic Reagine), al parecer un título mayor a 1:32 estaría asociado de forma significativa con neurosífilis (34,35).

El *Treponema pallidum* invade el torrente sanguíneo y puede producir bacteriemias intermitentes, las que en una mujer gestante podrían infectar al feto. El tratamiento con antibióticos es suficiente para prevenir la muerte fetal, daño fetal o el nacimiento de un infante infectado. Los infantes afectados presentan bajo peso al nacer. La sífilis congénita se divide en dos etapas: Sífilis congénita temprana, antes de los 2 primeros años y sífilis congénita tardía, después de los dos años (34,35).

Tratamiento

La penicilina es un antibiótico aún eficaz para el tratamiento de sífilis, se usa en sus dos formas, penicilina G benzatinica (BPG) y penicilina acuosa, BPG por vía intramuscular, de 1 a 3 dosis y penicilina acuosa en casos de neurosífilis. Existen alternativas orales al tratamiento, el uso de macrólidos y tetraciclinas durante 2 a 4 semanas, excepto la azitromicina, que solo requiere una dosis, pero se han reportado casos de resistencia a esta conferidas por mutaciones en el gen 23S RNA (35).

Métodos de diagnóstico

El diagnóstico se realiza por observación clínica y análisis de laboratorio. Las pruebas de laboratorio se clasifican en: Pruebas directas de detección microscópica, pruebas serológicas no treponémicas, pruebas serológicas treponémicas y pruebas directas de detección del antígeno (13,37).

En las pruebas directas de detección microscópica el *Treponema pallidum* se puede observar al microscopio en fresco en campo oscuro, mediante tinciones o marcado con anticuerpos fluorescentes. La observación en campo oscuro se realiza con muestras de las lesiones sifilíticas, se observan la morfología y la motilidad para identificar treponemas, la observación debe ser realizada en un tiempo menor a 20 minutos luego de la toma de muestra y por un personal entrenado; la lesiones no debe ubicarse en lugar que tengan como flora natural treponemas no patógenos, por ejemplo: lesiones en la región anal u oral. La observación de Treponemas es afectada por el uso de antibióticos y la sensibilidad es baja (10). Las tinciones no son específicas para treponemas patógenos. El uso de anticuerpos fluorescentes distingue a los treponemas patógenos de los no patógenos pero no distingue entre treponemas patógenos (10,13,34,35,37).

Las pruebas serológicas para el diagnóstico de sífilis caen en dos categorías: pruebas no treponémicas y pruebas treponémicas. Las pruebas no treponémicas detectan inmunoglobulinas G e inmunoglobulinas M contra material lipóide liberado por las células

dañadas del hospedero, también contra lipoproteínas y cardiolípidinas posiblemente liberadas por el *Treponema pallidum*. Las pruebas no treponémicas estandarizadas son: el VDRL (Venereal Disease Research Laboratory), RPR (Rapid Plasmatic Reagine), TRUST (Toluidine Red Unheated Serum Test) y USR (Unheated Serum Reagine), todas utilizan como antígeno la fórmula del VDRL: Cardiolípidina, colesterol y lecitina. Las pruebas no treponémicas pueden dar falsos positivos, en diversas situaciones como: embarazo, enfermedades autoinmunes, muestras hemolizadas, entre otras. Las pruebas treponémicas se basan en la detección de anticuerpos específicos contra antígenos de treponemas patógenos, las pruebas treponémicas disponibles son: El FTA-ABS (Absorción de Anticuerpos Treponémicos Fluorescentes), MHA-TP (Microaglutinación para *Treponema pallidum*), TPPA (Ensayo de aglutinación de partículas para *Treponema pallidum*) y EIA (Enzima inmunoensayo) para la detección de anticuerpos contra *Treponema pallidum*. Estas pruebas son usualmente utilizadas junto a un resultado de una prueba no treponémica reactiva. No pueden ser utilizadas para monitorear tratamiento y pueden generar falsos positivos en personas de edad avanzada o personas con enfermedades autoinmunes.

Las pruebas de detección directa del *Treponema pallidum* incluyen a la PCR, esta técnica es altamente sensible puede detectar de 1 a 10 microorganismos por espécimen y hasta 0.01 pg de ADN purificado, aún está en evaluación el uso de los distintos marcadores y el tipo de muestra adecuada según estadio de la infección (10,6,12,13).

En sífilis primaria, los treponemas pueden ser detectados en las lesiones utilizando la observación directa al microscopio, un 30% de personas infectadas presentan pruebas no treponémicas no reactivas y las pruebas treponémicas presentan menor sensibilidad. En sífilis secundaria, las pruebas serológicas presentan una mejor sensibilidad y usualmente son reactivas, el treponema también puede ser observado en sífilis secundaria realizando raspados de las lesiones o el “rash” cutáneo. En sífilis latente, las lesiones ya no existen haciendo imposible la observación microscópica del microorganismo, la detección de la infección se realiza por pruebas serológicas, estas tienden a ser reactivas durante la fase temprana, pero a medida que el periodo de latencia aumenta tienden a negativizarse. En sífilis terciaria, las pruebas no treponémicas pueden ser no reactivas hasta en un 30% de pacientes, si existen sospechas de sífilis terciaria se procede a realizar una prueba

treponémica independientemente del resultado de la prueba no treponémica, se pueden observar algunos microorganismos en raspados y biopsias de las lesiones gumatosas. El diagnóstico de neurosífilis se realiza con una prueba serológica reactiva, VDRL en LCR reactivo y el análisis cito químico del LCR, en búsqueda de pleocitosis linfocitaria, que es el aumento de linfocitos en el líquido cefalorraquídeo (10,13,32).

Detección de ADN de *Treponema pallidum* mediante PCR

La PCR proporciona un método de detección directa de ADN de *Treponema pallidum* por medio del uso de diferentes marcadores en distintas muestras que se recolectan dependiendo del estadio de la enfermedad (12). En sífilis primaria la muestra más adecuada para la realización de la PCR es el hisopado de las úlceras o chancros, para distinguirlo de otras infecciones venéreas que causan úlceras, como el herpes tipo 2 o la infección por *Haemophilus ducreyi* (26,38,39). En sífilis secundaria se han recolectado hisopados de las lesiones mucocutáneas (19,26), biopsias de piel y muestras de sangre, de la cual se han separado sus diferentes componentes (suero, plasma y PBMC) (38); en sífilis latente se han recolectado muestras de raspados de lóbulo de oreja y sangre (3,40); en Sífilis terciaria se han recolectado muestras de las lesiones en la piel (40); para la detección de Neurosífilis, líquido cefalorraquídeo y para la detección de sífilis congénita, líquido cefalorraquídeo y líquido amniótico (23). Los marcadores utilizados para el estudio de *Treponema pallidum* son diversos, para la detección de *Treponema pallidum* se han estudiado los genes *Tpp47*, *bmp*, *TmpA* y *polA*, siendo *Tpp47* y *polA* los más sensibles, aunque generan reacciones cruzadas con otros treponemas patógenos, para la diferenciación entre estos se utilizan pruebas de detección de Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) (17,18,35). Para la tipificación de *Treponema pallidum* se han utilizado en conjunto los genes *arp* y *trp*. Para la detección de resistencia a macrólidos se utiliza el gen 23SrARN, para detectar las mutaciones A2058G y A2059G (17,41).

La detección de ADN de *Treponema pallidum* varía según el estadio de infección y el momento en el cual la muestra fue colectada. En un estudio de la cinética y cuantificación del *Treponema pallidum* en sangre y tejido en sífilis experimental en conejos, se encontraron niveles mayores en plasma y sangre total que en suero (4). En estudios en

humanos con sífilis se obtuvo una mayor sensibilidad durante el estadio secundario (3,42,43).

1.4.2. Definición de términos

Ácido Desoxirribonucleico (ADN): Macromolécula que contiene el material genético de la bacteria.

Bacteriemia intermitente: Aparición y desaparición de las bacterias en el torrente sanguíneo.

Suero: Porción líquida de una muestra sanguínea que fue recolectada en un tubo sin anticoagulante tras la centrifugación. Sobrenadante sin factores de coagulación.

Plasma: Porción líquida de una muestra sanguínea que fue recolectada en un tubo con anticoagulante tras la centrifugación. Sobrenadante con factores de coagulación.

Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP): Diferencia en la secuencia de ADN homólogo que pueden ser detectada por fragmentos de diferentes longitudes después de la digestión del ADN con endonucleasas de restricción.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Amplificación de una secuencia de ADN blanco mediante el uso de la enzima ADN polimerasa para la generación de millones de copias de ADN y su posterior detección.

Tpp47: Marcador molecular para la lipoproteína presente en la membrana citoplásmica del *Treponema pallidum* sub especie *pallidum*.

Gumma: Lesión nodular infiltrada de monocitos y que genera destrucción tisular con tendencia a sufrir necrosis y úlceras.

CAPÍTULO II MÉTODOS

2.1. DISEÑO METODOLÓGICO

2.1.1. Tipo de investigación

Observacional

2.1.2. Diseño de la investigación

Descriptiva, Transversal y Retrospectiva

2.1.3. Población

Ciento setenta y cinco muestras de suero y ciento setenta y cinco muestras de plasma con RPR reactivo y TPPA positivo colectadas de hombres que tienen sexo con otros hombres que se atendieron en los Centros de Salud Alberto Barton del Callao y Epicentro durante los años 2013 y 2014.

2.1.4. Muestra y muestreo

Muestreo por conveniencia. Se seleccionaron 60 muestras de suero con sus correspondientes muestras de plasma por cada participante, todas colectadas de hombres que tienen sexo con otros hombres que se atendieron en los Centros de Salud Alberto Barton del Callao y Epicentro durante los años 2013 y 2014 con resultados de RPR mayores a 8 dils y TPPA positivo almacenadas en las congeladoras del Laboratorio de Salud Sexual de la Universidad Peruana Cayetano Heredia a -80°C; de estas luego de aplicar los criterios de inclusión y exclusión, solo se analizaron 32 muestras de suero y 32 muestras de plasma.

2.1.5. Criterios de inclusión y exclusión

2.1.5.1. Criterios de inclusión

Muestras de suero y plasma con RPR mayor 8 dils

2.1.5.2. Criterios de exclusión

Muestras de suero y plasma con el marcador beta-globina negativo

Muestras hemolizadas

Muestras lipémicas

Muestras que no se encontraban pareadas

Muestras con código de identificación ilegible

2.1.6. Variables

Variable principal

Nombre de la variable	Definición conceptual	Dimensiones	Indicador	Valores	Tipo de variable	Instrumento
ADN para <i>Treponema pallidum</i>	Material genético de <i>Treponema pallidum</i>	Suero Plasma	PCR Convencional	Presencia o Ausencia de la banda de 300bp indicadora de <i>Tpp47</i>	Cualitativa	Ficha de recolección de datos

Variable secundaria

Nombre de la variable	Definición conceptual	Dimensiones	Indicador	Valores	Tipo de variable	Instrumento
Título de RPR	Mayor dilución en la cual la prueba de RPR muestra reactividad	< 64 dils >64dils	RPR card test	1dils 2 dils 4 dils 8dils 16 dils ...	Cuantitativa	Ficha de recolección de datos

2.1.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Las técnicas empleadas fueron:

- El análisis por la reacción en cadena de la polimerasa para detectar el gen *Tpp47* (ANEXO III, IV y V).

Los instrumentos de recolección de datos fueron:

- La base de datos del Laboratorio de Salud Sexual de la Universidad Peruana Cayetano Heredia

2.1.8. Procedimientos y análisis de datos

Se envió una solicitud de autorización para el uso de datos y muestras de suero y plasma procedentes del estudio PICASSO almacenadas en el Laboratorio de Salud Sexual de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Se seleccionaron las muestras almacenadas en el Laboratorio de Salud Sexual. Se analizaron mediante PCR las muestras para detectar beta globina, la cual es un marcador que indica la correcta extracción del ADN. Se analizaron mediante la PCR para detectar *Tpp47* las muestras que cumplieron con los criterios de inclusión. Se organizaron los datos en tablas de Excel según el título de RPR. Se calculó el porcentaje de detección de la PCR para suero y plasma. Se compararon los porcentajes de detección en suero y plasma.

Se utilizaron los programas Microsoft Excel ® (Microsoft Corporation, Seattle, WA) para el desarrollo de la base de datos y el programa Rstudio ® (RStudio, Inc, Boston) para el análisis estadístico. Se calcularon frecuencias y se compararon según títulos y tipos de muestra.

2.1.9. Consideraciones éticas

Las muestras fueron colectadas en el marco del estudio PICASSO, estudio que ya contaba con aprobación ética. En el consentimiento informado del estudio PICASSO los participantes aceptaron el uso de sus muestras para posteriores trabajos de investigación. Solo se permitió el acceso a la base de datos para los investigadores del estudio anterior y para el investigador del presente estudio, los datos fueron mantenidos en carácter confidencial. Las muestras que fueron utilizadas solo se encuentran identificadas con el código que se le asignó al participante en el Laboratorio de Salud Sexual, no se identificará al participante a partir de estas muestras.

CAPÍTULO III RESULTADOS

Se procesaron 64 muestras entre plasma y suero de hombres que tienen sexo con hombres atendidos en los Centros de Salud Barton y Epicentro durante los años 2013 y 2014. Se seleccionaron las muestras de 32 personas, una muestra de suero y una muestra de plasma por cada participante, de las cuales solamente ocho tuvieron un título de RPR de 16 dils , ocho de 32 dils, ocho de 64 dils, seis de 128 dils y dos de 256 dils (**Tabla 1**) (**Tabla 2**). Se detectó ADN de *Treponema pallidum* en tres de las muestras de suero y una de las muestras de plasma (**Tabla 3**).

Se calculó la frecuencia de las muestras positivas a ADN de *Treponema pallidum*. En las treinta y dos muestras de suero, tres fueron positivas (9.38%) y veintinueve negativas para *Tpp47*. En las muestras de plasma, se encontró una muestra positiva (3.13%) y 31 muestras negativas para *Tpp47* (**Tabla 2**).

El porcentaje de muestras positivas según título en las muestras de suero fue de 0% en muestras de títulos de 16 dils, 32 dils y 256 dils, de 12.5% en muestras con resultados de 64 dils y 33.3% en 128 dils, mientras que el porcentaje en plasma fue de 0% en 16 dils, 32 dils, 64 dils y 256 dils y 16.7% en 128 dils (**Tabla 2**).

Tabla 1. Resultados de RPR y *Tpp47* en suero y plasma

Muestra #	Título RPR (dils)	<i>Tpp47</i> en Suero(300bp)	<i>Tpp47</i> en Plasma(300bp)
1	16	Ausente	Ausente
2	16	Ausente	Ausente
3	16	Ausente	Ausente
4	16	Ausente	Ausente
5	16	Ausente	Ausente
6	16	Ausente	Ausente
7	16	Ausente	Ausente
8	16	Ausente	Ausente
9	32	Ausente	Ausente
10	32	Ausente	Ausente
11	32	Ausente	Ausente
12	32	Ausente	Ausente
13	32	Ausente	Ausente
14	32	Ausente	Ausente
15	32	Ausente	Ausente
16	32	Ausente	Ausente
17	64	Ausente	Ausente
18	64	Ausente	Ausente
19	64	Ausente	Ausente
20	64	Ausente	Ausente
21	64	Ausente	Ausente
22	64	Ausente	Ausente
23	64	Presente	Ausente
24	128	Ausente	Ausente
25	64	Ausente	Ausente
26	128	Ausente	Ausente
27	128	Presente	Ausente
28	128	Presente	Presente
29	128	Ausente	Ausente
30	128	Ausente	Ausente
31	256	Ausente	Ausente
32	256	Ausente	Ausente

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos de amplificación de *Tpp47* en sueros y plasmas de hombres que tienen sexo con hombres seropositivos a sífilis, atendidos en los centros de salud Barton y Epicentro. Lima 2013 -2014



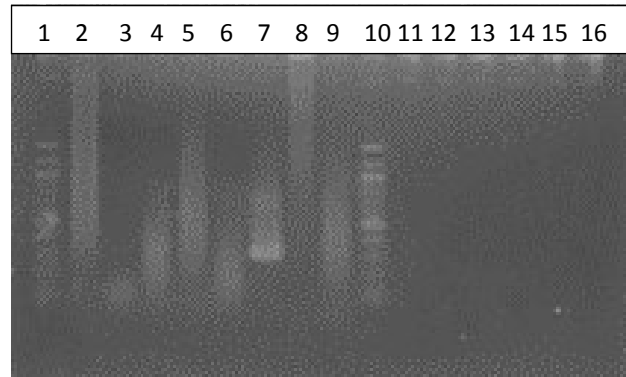
Leyenda: 1: Marcador 100 bp 2: Muestra 1 (-) 3: Muestra 2 (-) 4: Muestra 3 (-) 5: Muestra 4 (-) 6: Muestra 5 (-) 7: Muestra 6 (-) 8: Muestra 7 (-) 9: Muestra 8: (-) 10: Muestra 9 (-) 11: Muestra 10 (-) 12: Muestra 11 (-) 13: Muestra 12 (-) 14: Control Negativo 15: Control Positivo 16: Marcador 100 bp

Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos de amplificación de *Tpp47* en sueros y plasmas de hombres que tienen sexo con hombres seropositivos a sífilis, atendidos en los centros de salud Barton y Epicentro. Lima 2013 -2014



Leyenda: 1: Marcador 100 bp 2: Muestra 13 (-) 3: Muestra 14 (-) 4: Muestra 15 (-) 5: Muestra 16 (-) 6: Muestra 17 (-) 7: Control Positivo 8: Control Positivo 9: Control Negativo 10: Marcador 100 bp

Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos de amplificación de *Tpp47* en sueros y plasmas de hombres que tienen sexo con hombres seropositivos a sífilis, atendidos en los centros de salud Barton y Epicentro. Lima 2013 -2014



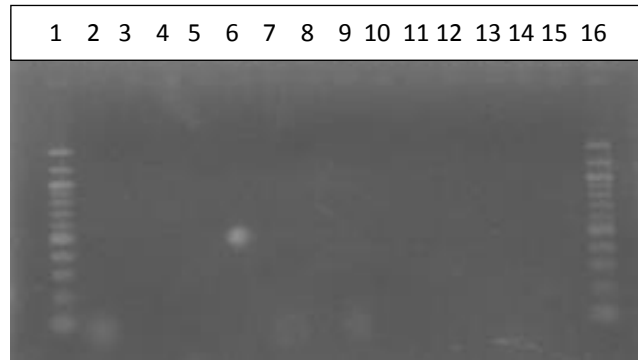
Leyenda: 1: Marcador 100 bp 2: Muestra 18 (-) 3: Muestra 19 (-) 4: Muestra 20 (-) 5: Muestra 21 (-) 6: Muestra 22 (-) 7: Muestra 23 (+) 8: Muestra 24 (-) 9: Muestra 25 (-) 10: Marcador 100 bp

Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos de amplificación de *Tpp47* en sueros y plasmas de hombres que tienen sexo con hombres seropositivos a sífilis, atendidos en los centros de salud Barton y Epicentro. Lima 2013 -2014



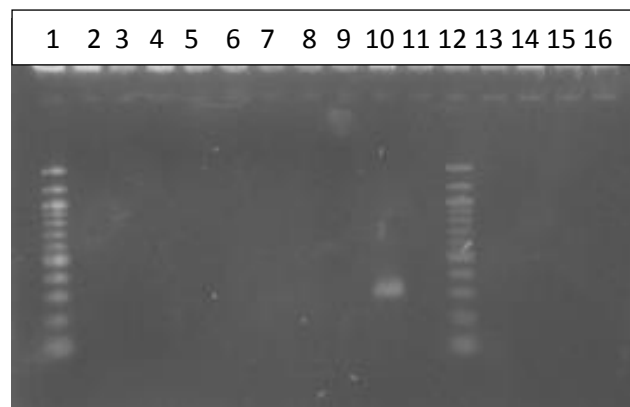
Leyenda: 1: Marcador 100 bp 2: Muestra 26 (-) 3: Muestra 27 (+) 4: Muestra 28 (+) 5: Muestra 29 (-) 6: Muestra 30 (-) 7: Muestra 31 (-) 8: Muestra 32 (-) 9: Muestra 33 (-) 10: Muestra 34 (-) 11: Muestra 35 (-) 12: Muestra 36 (-) 13: Control Positivo 14: Control Negativo 15: Control Negativo 16: Marcador 100 bp

Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos de amplificación de *Tpp47* en sueros y plasmas de hombres que tienen sexo con hombres seropositivos a sífilis, atendidos en los centros de salud Barton y Epicentro. Lima 2013 -2014



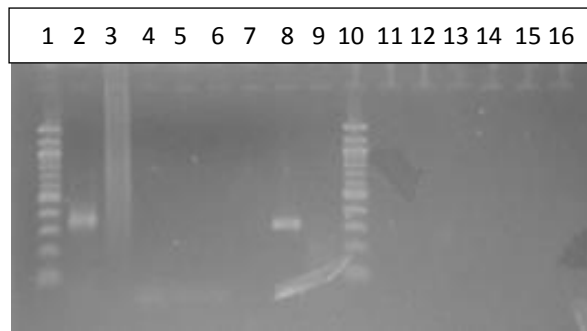
Leyenda: 1: Marcador 100 bp 2: Muestra 37 (-) 3: Muestra 38 (-) 4: Muestra 39 (-) 5: Muestra 40 (-) 6: Muestra 41 (-) 7: Muestra 42 (-) 8: Muestra 43 (-) 9: Muestra 44 (-) 10: Muestra 45 (-) 11: Muestra 46 (-) 12: Muestra 47 (-) 13: Muestra 48 (-) 14: Muestra 49 (-) 15: Muestra 50 (-) 16: Marcador 100 bp

Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos de amplificación de *Tpp47* en sueros y plasmas de hombres que tienen sexo con hombres seropositivos a sífilis, atendidos en los centros de salud Barton y Epicentro. Lima 2013 -2014



Leyenda: 1: Marcador 100 bp 2: Muestra 51 (-) 3: Muestra 52 (-) 4: Muestra 53 (-) 5: Muestra 54 (-) 6: Muestra 55 (-) 7: Muestra 56 (-) 8: Muestra 57 (-) 9: Muestra 58 (-) 10: Control Positivo 11: Control Negativo (-) 12: Marcador 100 bp

Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% de los productos de amplificación de *Tpp47* en sueros y plasmas de hombres que tienen sexo con hombres seropositivos a sífilis, atendidos en los centros de salud Barton y Epicentro. Lima 2013 -2014



Leyenda: 1: Marcador 100 bp 2: Muestra 59 (+) 3: Muestra 60 (-) 4: Muestra 61 (-) 5: Muestra 62 (-) 6: Muestra 63 (-) 7: Muestra 64 (-) 8: Control Positivo 9: Control Negativo (-) 10: Marcador 100 bp

Tabla 2. Resultados de *Tpp47* clasificados por título de RPR

Título RPR (dils)	# de Muestras Suero y Plasma	<i>Tpp47</i> en suero (%)	<i>Tpp47</i> en plasma (%)
16	8	0 (0)	0 (0)
32	8	0 (0)	0 (0)
64	8	1 (12.5)	0 (0)
128	6	2 (33.3)	1(16.7)
256	2	0 (0)	0 (0)

Tabla 3. Frecuencia de *Tpp47* positivo en suero y plasma

Muestra	# de muestras	Presencia de <i>Tpp47</i>	%
Suero	32	3	9.38
Plasma	32	1	3.13

CAPÍTULO IV DISCUSIÓN

Se detectó ADN de *Treponema pallidum* en las muestras de suero y plasma, los porcentajes de muestras positivas en suero y en plasma fueron bajos esto se puede explicar debido a que la bacteriemia en la infección por sífilis es intermitente, el estadio y el momento en el que se toma la muestra deberían coincidir con la bacteriemia para poder encontrar ADN de *Treponema pallidum* circulando en sangre, además que el *Treponema pallidum* puede encontrarse dentro del paquete globular o coágulo que se descarta durante el procesamiento del plasma o suero respectivamente. *Treponema pallidum* se fija a las estructuras celulares y los monocitos pueden ser opsonizados por los treponemas, haciendo que se encuentre un mayor porcentaje en muestras de sangre total o PBMC (37,48). Las muestras fueron colectadas entre los años 2013 y 2014, y posteriormente congeladas, se han logrado mayores porcentajes de positividad en muestras que han sido recientemente colectadas y el ADN fue extraído inmediatamente.

Se observa un porcentaje mayor de detección de ADN de *Treponema pallidum* en suero que en plasma. *Treponema pallidum* se adhiere a los elementos celulares, esto produce que al no añadir anticoagulante a la sangre total las células se atrapan dentro del coágulo, atrapando al *Treponema pallidum*, por eso se espera encontrar un mayor porcentaje de muestras positivas en muestras de sangre total y plasma que en muestras de suero. En este estudio se encontraron porcentajes mayores de positivos en muestras de suero, esto se le puede atribuir al almacenamiento, la congelación y descongelación de muestras puede degradar el ADN, además se obtienen mejores resultados en muestras frescas, recientemente colectadas (45-47). Las muestras de suero en el presente estudio estuvieron sometidas a un menor número de congelamientos y descongelamientos sucesivos que las muestras de plasma. En el presente estudio el número de muestras es reducido, en estudios con un tamaño de muestra mayor se podría evidenciar si la diferencia de rendimiento de los diferentes tipos de muestras es real. En estudios realizados por Kouznetzov en el año 2005, donde estudió *Tpp47* en diferentes tejidos de paciente infectados por sífilis, entre ellos suero y plasma reportó porcentajes del 53.3% y 6.7% respectivamente (19); mientras que Castro en 2007 reportó porcentajes de 43.0%

en plasma y 25% en suero (28). En conejos infectados intratesticularmente con *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* analizados por PCR en tiempo real se encontraron niveles 10 veces superiores en plasma que en suero. Esto puede suceder debido a que el número de muestras es reducido. También se ha demostrado la mayor cantidad de detección de positivos en muestras de sangre de personas con sífilis secundaria (19).

Los únicos resultados positivos fueron encontrados en títulos de 64 y 128 dils. Lo que sugiere que hay una mayor probabilidad de encontrar ADN de *Treponema pallidum* en muestras con títulos superiores a 64 dils, evidencia de infección reciente. La prueba de RPR se utiliza en el diagnóstico y monitoreo del tratamiento de la infección por sífilis. Un RPR reactivo y una prueba treponémica confirman el diagnóstico de sífilis. Para monitorear la eficacia del tratamiento se compara el título de RPR obtenido al inicio del tratamiento y los títulos obtenidos a los 3 y 6 meses posteriores, si se observa una reducción de 4 veces el título inicial a los 3 meses y 8 veces a los 6 meses se considera que el tratamiento fue efectivo.

Las pruebas utilizadas para diagnosticar sífilis con mayor frecuencia son las pruebas serológicas, debido a que permiten detectar la infección durante sus diferentes estadios, ya que la muestra utilizada es sangre, que se puede obtener en cualquier estadio de la infección. Las pruebas utilizadas frecuentemente son una prueba no treponémica como tamizaje, como el RPR, prueba que genera falsos positivos en mujeres embarazadas, personas con enfermedades autoinmunes, entre otros, y una prueba treponémica como confirmatoria, como el TPHA, que no es útil para monitorear el tratamiento y genera falsos positivos en personas de edad avanzada y personas con enfermedades autoinmunes (9). Estas pruebas evidencian la respuesta inmune del hospedero pero no ayudan a conocer más sobre la bacteria que está produciendo la enfermedad. La detección de ADN de *Treponema pallidum* no solo nos permitiría realizar el diagnóstico de la infección, también nos permitiría monitorear el tratamiento, ya que en personas que concluyeron el tratamiento para sífilis no se encuentra ADN de *Treponema pallidum* en

diferentes tipos de muestra, además el uso de la PCR para la detección de Treponema es útil para la detección de mutaciones relacionadas a la resistencia a macrólidos (7,9,12,13,40)

Estudios posteriores con ADN de *T. pallidum*, deberían asegurar un mayor número de muestras, muestreo seriado en diferentes días y/o semanas, y quizá sistemas de enriquecimiento de ADN en muestras de suero y/o sangre que permitan una mejor detección del ADN bacteriano.

CAPÍTULO IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

Es posible encontrar ADN de *Treponema pallidum* en muestras de suero y plasma que fueron recolectadas en los años 2013 y 2014, es decir hace 4 años, aunque en un porcentaje menor a lo esperado según la bibliografía.

La detección de ADN de *Treponema pallidum* fue mayor en muestras de suero que en muestras de plasma.

La frecuencia de ADN de *Treponema pallidum* positivo en la PCR fue mayor en muestras de RPR con títulos más altos, como 64 y 128 dils

5.2. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un estudio de evaluación de la PCR en diferentes muestras biológicas, incluyendo suero, plasma y sangre total, considerando un tamaño de muestra mayor.

El estadio de infección del participante es un dato importante que debería ser considerado en futuros estudios.

Se han obtenido mejores resultados con porcentajes más altos de detección en muestras cuyo ADN fue extraído poco tiempo después de la recolección de la muestra, esto debe ser tomado en consideración para estudios posteriores. En el caso de trabajar con muestras almacenadas están no deben de ser sometidas a ciclos de congelamiento y descongelamiento repetidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferreira SC, De Almeida-Neto C, Nishiya AS, Di-Lorenzo-Oliveira C, Ferreira JE, Alencar CS, et al. Prevalence of *Treponema pallidum* DNA among blood donors with two different serologic tests profiles for syphilis in São Paulo, Brazil. *Vox Sang*. 2014;106(4):376–8.
2. 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.
3. Castro R, Prieto E, Aguas MJ, Manata MJ, Botas J, Santo I, et al. Detection of *Treponema pallidum* sp pallidum DNA in latent syphilis. *Int J STD AIDS* [Internet]. 2007;18(12):842–5.
4. 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.
5. Kouznetsov AV, Weisenseel P, Trommler P, Multhaup S, Prinz JC. Detection of the 47-kilodalton membrane immunogen gene of *Treponema pallidum* in various tissue sources of patients with syphilis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005;51(2):143–5.
6. Burstain JM, Grimprel E, Lukehart SA, Norgard M V., Radolf JD. Sensitive detection of *Treponema pallidum* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1991;29(1):62–9.

7. Sanchez J, Lama JR, Peinado J, Paredes A, Lucchetti A, Russell K, et al. High HIV and ulcerative sexually transmitted infection incidence estimates among men who have sex with men in Peru: awaiting for an effective preventive intervention. *J Acquir Immune Defic Syndr* [Internet]. 2009;51 Suppl 1:S47-51.
8. Long CM, Klausner JD, Leon S, Jones FR, Giron M, Cuadros J, et al. Syphilis treatment and HIV infection in a population-based study of persons at high risk for sexually transmitted disease/HIV infection in Lima, Peru. *Sex Transm Dis*. 2006;33(3):151–5.
9. Deiss RG, Leon SR, Konda KA, Brown B, Segura ER, Galea JT, et al. Characterizing the syphilis epidemic among men who have sex with men in Lima, Peru to identify new treatment and control strategies. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2013;13(1):426.
10. S. L. Diagnosis of syphilis: Clinical and laboratory problems. *JDDG - J Ger Soc Dermatology* . 2006;4(CDC):1058–75.
11. Fries J a, Ho a TY, Segre... a M. Using Craigslist Messages for Syphilis Surveillance. ... Meet Emerg 2011;2011:2011.
12. Morshed MG. Current trend on syphilis diagnosis: issues and challenges. Vol. 808, *Advances in experimental medicine and biology*. 2014. p. 51–64.
13. Ratnam S. The laboratory diagnosis of syphilis. *Can J Infect Dis Med Microbiol = J Can des Mal Infect la Microbiol médicale / AMMI Canada*. 2005;16(1):45–51.
14. Wicher K, Abbruscato F, Wicher V, Collins DN, Auger I, Horowitz HW. Identification of persistent infection in experimental syphilis by PCR. *Infect Immun*. 1998;66(6):2509–2313.
15. Tipple C, Jones R, McClure M, Taylor G. Rapid *Treponema pallidum* Clearance

from Blood and Ulcer Samples following Single Dose Benzathine Penicillin Treatment of Early Syphilis. PLoS Negl Trop Dis. 2015;

16. Martin IE, Tsang RSW, Sutherland K, Tilley P, Read R, Anderson B, et al. Molecular characterization of syphilis in patients in Canada: Azithromycin resistance and detection of *Treponema pallidum* DNA in whole-blood samples versus ulcerative swabs. J Clin Microbiol. 2009;47(6):1668–73.
17. Chen CY, Chi KH, Pillay A, Nachamkin E, Su JR, Ballard RC. Detection of the A2058G and A2059G 23S rRNA gene point mutations associated with azithromycin resistance in *Treponema pallidum* by use of a TaqMan real-time multiplex PCR assay. J Clin Microbiol. 2013;51(3):908–13.
18. Gayet-Ageron A, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger T V, Combescure C. Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis: a systematic review and meta-analysis. Sex Transm Infect. 2012;
19. Buffet M, Grange PA, Gerhardt P, Carlotti A, Calvez V, Bianchi A, et al. Diagnosing *Treponema pallidum* in secondary syphilis by PCR and immunohistochemistry. J Invest Dermatol. 2007;127(10):2345–50.
20. Heymans R, Van Der Helm JJ, De Vries HJC, Fennema HSA, Coutinho RA, Bruisten SM. Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. J Clin Microbiol. 2010;48(2):497–502.
21. Koek AG, Bruisten SM, Dierdorff M, van Dam AP, Templeton K. Specific and sensitive diagnosis of syphilis using a real-time PCR for *Treponema pallidum*. Clin Microbiol Infect. 2006;12(12):1233–6.
22. Gayet-Ageron a, Ninet B, Toutous-Trellu L, Lautenschlager S, Furrer H, Piguet V, et al. Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse

- biological samples. *Sex Transm Infect.* 2009;85(4):264–9.
23. Woznicová V, Šmajš D, Wechsler D, Matějková P, Flasarová 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.
 24. Deiss RG, Leon SL, Konda K a, Brown B, Segura ER, Galea JT, et al. Characterizing the syphilis epidemic among men who have sex with men in Lima, Peru to identify new treatment and control strategies. *BMC Infect Dis.* 2013;13(1):426.
 25. Gayet-Ageron A, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger T V, 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.
 26. 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.
 27. Lama JR, Lucchetti A, Suarez L, Laguna-Torres V a, Guanira J V, Pun M, et al. Association of herpes simplex virus type 2 infection and syphilis with human immunodeficiency virus infection among men who have sex with men in Peru. *J Infect Dis [Internet].* 2006;194(10):1459–66.
 28. Press N, Chavez VM, Ticona E, Calderon M, Apolinario IS, Culotta A, et al. Screening for sexually transmitted diseases in human immunodeficiency virus-positive patients in Peru reveals an absence of *Chlamydia trachomatis* and identifies *Trichomonas vaginalis* in pharyngeal specimens. *Clin Infect Dis [Internet].* 2001;32(5):808–14.
 29. Sanchez J, Lama JR, Peinado J, Paredes A, Lucchetti A, Russell K, et al. High

- HIV and ulcerative sexually transmitted infection incidence estimates among men who have sex with men in Peru: awaiting for an effective preventive intervention. *J Acquired Immune Deficiency Syndrome*. 2009;51 Suppl 1:S47-51.
30. Bartlett EC, Zavaleta C, Fernández C, Razuri H, Vilcarromero S, Vermund SH, et al. Expansion of HIV and syphilis into the Peruvian Amazon: a survey of four communities of an indigenous Amazonian ethnic group. *Int J Infect Dis*. 2008;12(6).
 31. Press N, Chavez VM, Ticona E, Calderon M, Apolinario IS, Culotta A, et al. Screening for sexually transmitted diseases in human immunodeficiency virus-positive patients in Peru reveals an absence of *Chlamydia trachomatis* and identifies *Trichomonas vaginalis* in pharyngeal specimens. *Clin Infect Dis*. 2001;32(5):808–14.
 32. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. Vol. 8, *Clinical Microbiology Reviews*. 1995. p. 1–21.
 33. Salado-Rasmussen K. Syphilis and HIV co-infection: Epidemiology, treatment and molecular typing of *Treponema pallidum*. *Dan Med J*. 2015;62(12).
 34. LaFond RE, Lukehart SA. Biological basis for syphilis. Vol. 19, *Clinical Microbiology Reviews*. 2006. p. 29–49.
 35. Ho EL, Lukehart SA. Syphilis: Using modern approaches to understand an old disease. Vol. 121, *Journal of Clinical Investigation*. 2011. p. 4584–92.
 36. Peeling RW, Hook EW. The pathogenesis of syphilis: The Great Mimicker, revisited. Vol. 208, *Journal of Pathology*. 2006. p. 224–32.
 37. Janier M, Hegyi V, Dupin N, Unemo M, Tiplica GS, Potočnik M, et al. 2014 European guideline on the management of syphilis. *J Eur Acad Dermatology*

- Venereol. 2014;28(12):1581–93.
38. Pietravallo M, Pimpinelli F, Maini A, Capoluongo E, Felici C, D’Auria L, et al. Diagnostic relevance of polymerase chain reaction technology for *T. pallidum* in subjects with syphilis in different phases of infection. *New Microbiol.* 1999;22(2):99–104.
 39. Shields M, Guy RJ, Jeffreys NJ, Finlayson RJ, Donovan B. A longitudinal evaluation of *Treponema pallidum* PCR testing in early syphilis. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2012;12:353.
 40. Zochling N, Schluenzen EM, Soyer HP, Kerl H, Volkenandt M. Molecular detection of *Treponema pallidum* in secondary and tertiary syphilis. *Br J Dermatol.* 1997;136(5):683–6.
 41. Bruisten SM. Protocols for detection and typing of *Treponema pallidum* using PCR methods. *Methods Molecular Biology.* 2012;903:141–67.
 42. Tipple C, Hanna MOF, Hill S, Daniel J, Goldmeier D, McClure MO, et al. Getting the measure of syphilis: qPCR to better understand early infection. *Sex Transm Infect.* 2011;87(6):479–85.
 43. Gayet-Ageron A, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger T V, Combescure C. Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis: A systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect.* 2013;89:251–6.

ANEXO I

PROCEDIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN DE COMPONENTES SANGUÍNEOS (SUERO Y PLASMA)

Separación de suero

- Centrifugar por 5 minutos a 3500 rpm el tubo con activador de coágulo (tubo rojo) conteniendo la sangre total.
- Abrir la tapa del tubo centrifugado y con ayuda de una pipeta pasteur descartable (transfer) aspirar todo el contenido líquido del sobrenadante y llevarlo hacia un criotubo de 2mL. Recuperar el máximo volumen de suero del tubo evitando la contaminación con el paquete globular.
- Hacer 3 alícuotas del suero y rotular adecuadamente. Cada alícuota debe tener al menos 0.5 mL de suero.
- Descartar apropiadamente el tubo residual que contiene el coágulo. (ver manual de bioseguridad).
- Guardar adecuadamente las muestras para su transporte.

Separación de plasma

- Centrifugar por 5 minutos a 3500 rpm el tubo con EDTA (tapa lila) conteniendo la sangre total

- Abrir la tapa del tubo centrifugado y con ayuda de una pipeta pasteur descartable (transfer) aspirar todo el contenido líquido del sobrenadante y llevarlo hacia un criotubo de 2mL. Recuperar el máximo volumen de plasma del tubo evitando la contaminación con el paquete globular.
- Hacer 3 alícuotas del plasma y rotular adecuadamente. Cada alícuota debe tener al menos 0.5 mL de suero.
- Descartar apropiadamente el tubo residual que contiene el paquete globular. (ver manual de bioseguridad).
- Guardar adecuadamente las muestras para su transporte.

ANEXO II

PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN

Procedimiento: Extracción de ADN para muestras de estudio Picasso							
Reactivo		Marca		País de fabricación			
qIAamp DNA minikit		Qiagen		USA			
Preparado por:		Fecha de aprobación:		Manual #:			
Antonio Flores Silver Vargas		ABRIL 2013		Extracción de ADN Picasso 2013			
Fecha de revisión:		Fecha de aprobación:		Firma:			
Distribuido a:		# de copias:		Distribuido a:		# de copias:	

I. INTRODUCCIÓN

Esta parte del manual describe como realizar la extracción del ADN de las muestras colectadas del estudio PICASSO. El Kit de extracción que se usará se basa en que luego de la lisis de las células, el ADN se adhiere a la superficie de la columna del Kit que contiene una membrana de sílica gel, que bajo las condiciones adecuadas de sales y pH retendrá al ADN y dejara pasar a los inhibidores de una PCR (proteínas). De esta manera tendremos un ADN libre de contaminantes de calidad óptima para un PCR.

II. Preparación previa:

Las muestras se colectaran con el buffer de lisis descrito anteriormente, el cual lizará al *Treponema pallidum*.

1. Equilibrar a temperatura ambiente las muestras a ser extraídas
2. Preparar el baño María a 56 ° C.
3. Hacer alícuotas de etanol 100% o isopropanol a partir del stock limpio.
4. Chequear el buffer AL de QIAGEN si tiene precipitación o no. Si es necesario, el precipitado puede ser disuelto a 70 °C por corto tiempo.

III. PROTOCOLO

1. Coloque 200 µL del lisado colectado en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
2. Agregar 25 µL de proteinasa K (viene con el Kit). Incubar las muestras por 30 minutos a una hora a 56° C.
3. Agregar 220 µL de buffer AL (viene con el Kit) a cada muestra a ser extraída. Cierre la tapa usando un kim-wipe para prevenir la aerolización de la muestra.
4. Mezclar inmediatamente con ayuda de vórtex por 15 segundos.
5. Incubar las muestras por 10 minutos en un bloque caliente a 70 °C.
6. Abrir el microtubo usando un kim-wipe
7. Agregar 210 µL de etanol al 100% a cada muestra. Cerrar los tubos usando un kim-wipe.
PARA SANGRE TOTAL O CAPILAR USAR 210 µL DE ISOPROPANOL EN LUGAR DE ETANOL.
8. Abrir el microtubo usando un kim-wipe.
9. Aplicar la mezcla del microtubo a una columna QIAamp spin sin tocar la parte superior ni inferior de la columna del kit. Cierre las columnas usando un kim-wipe.
10. Centrifugue la columna a 8000 rpm por un minuto.

11. Transfiera la columna sobre un nuevo tubo de colección y descarte el tubo de colección usado.
12. Abrir la columna usando un kim-wipe.
13. Agregar 500 μ L de buffer AW1 a cada tubo, tape la columna usando un kim-wipe y centrifugue a 8000 rpm por un minuto.
14. Abrir la columna usando un kim-wipe.
15. Agregar 500 μ L de buffer AW2 y tape cada columna con ayuda de un kim-wipe. Centrifugar a 8000 rpm por un minuto.
16. Descarte el contenido del tubo colector y vuelva a colocarlo con la columna y centrifugar nuevamente a 13000 rpm por dos minutos.
17. Transfiera la columna a un tubo Eppendorf libre de ADNasa/ARNasa debidamente rotulado.
18. Agregue 200 μ L de agua PCR estéril. Dejar reposar por 15 minutos y luego centrifugar a 8000 rpm por dos minutos.

ANEXO III

PCR CONVENCIONAL PARA LA DETECCIÓN DE TPP47

Procedimiento: PCR convencional. T47.							
Reactivo		Marca		País de fabricación			
PCR		In house		Lukehart and col.			
Preparado por:		Fecha de aprobación:		Manual #:			
Antonio Flores Silver Vargas		ABRIL 2013		PCR T47. Picasso 2013			
Fecha de revisión:		Fecha de aprobación:		Firma:			
Distribuido a:		# de copias:		Distribuido a:		# de copias:	

Primers:

T47 sense : CGTGTGGTATCAACTATGG

T47 antisense : TCAACCGTGTACTCAGTGC

Producto Esperado: 310 bp

b-globin F : 5' GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3'

b globin R : 5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3'

Producto esperado: Aprox 300 bp.

Preparar el siguiente master Mix:

componente	Concentración Stock	Concentración final	1X reacción	24X reacción
Agua PCR	---	---	7.75	186
5X buffer GoTaq flexi	50 mM Tris-HCl pH 9, 250 mM KCl, 0.5% tritón X100	10 mM Tris-HCl pH 9, 500 mM KCl, 0.1% triton X 100	3	72
dNTPs	2.5 mM	200 µM	1.2	28.8
MgCl ₂	25 mM	1.5 mM	0.9	21.6
primer sense*	20 µM	0.32 µM	0.24	5.76
primer antisense*	20 µM	0.32 µM	0.24	5.76
ADN molde			1.5	
Taq polimerasa (promega)	5 U/µL	4 U	0.17	4.13
Volumen total			15 µL	

Observaciones:

*Deberá hacerse 2 tipos de reacciones: una con primers específicos *TPP47* y otra con primers de beta-globina que servirá como control de extracción de ADN.

Condiciones de ciclamiento

94 °C x 3 minutos

94 °C x 1 minuto

60 °C x 2 minutos

72 °C x 1 minuto

} x 45 ciclos

Correr en gel de agarosa 1.5%.

ANEXO IV

PROCEDIMIENTO PARA LA ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA

Procedimiento: Electroforesis en gel de agarosa para ADN.			
Reactivo		Marca	País de fabricación
Electroforesis en agarosa		In house	LSS – Perú.
Preparado por:		Fecha de aprobación:	Manual #:
Antonio Flores Silver Vargas		ABRIL 2013	Electroforesis. Picasso 2013
Fecha de revisión:		Fecha de aprobación:	Firma:
Distribuido a:	# de copias:	Distribuido a:	# de copias:

Preparación y corrida en Gel de agarosa

Materiales

Agarosa grado molecular

Buffer TBE

Agua destilada

Materiales de electroforesis (bandejas, colorantes, balanza, peines de geles, fuente poder y cámara de electroforesis)

Preparación del gel.

Se deberá pesar el gel en la cantidad deseada. Por ejemplo, para preparar un gel al 1.5%. Se deberá pesar 0.45 g de agarosa y adicionarlo a c.s.p. 30 mL.

Calentar con microondas la preparación para mezclar. Puede configurarse a 60 segundos con pausas cada 30 segundos para verificar que todo está mezclado.

Dejar enfriar la preparación por 5 minutos y armar la bandeja de electroforesis, para ello verificar que el nivel de la bandeja es el adecuado y que está limpio.

Una vez enfriado la agarosa, verter sobre la bandeja preparada. Con ayuda de un tip eliminar las burbujas que puedan aparecer y colocar el peine que corresponda.

Dejar gelificar por un mínimo de 20 minutos.

Nota.

Se puede almacenar geles si estos se colocan en bandejas cubiertas con buffer TBE 1X de corrida. Son estables por una semana.

Corrida del gel.

Llevar el gel preparado a la cámara de electroforesis. Colocar el gel con o sin su base en que fue preparada.

Retirar el peine usado con cuidado de no romper los pocillos.

Llenar la cámara con el Buffer TBE a 1X. (Si el buffer TBE estuviera concentrado, llevar a la concentración de trabajo de 1X). Asegurarse que el buffer este cubriendo los pocillos.

Si la amplificación del ADN usa el buffer que posee un marcador de cargado, entonces no es necesario usar aparte el buffer de cargado para correr en el gel. No olvidarse colocar el marcador de peso molecular adecuado.

Una vez finalizado tapar la cámara y colocar los cables de manera correcta (guiarse por los colores). Siempre la corriente deberá estar en el sentido de polo negativo (cátodo) próximo al pocillo de las muestras y el polo positivo (ánodo) próximo al otro extremo del gel.

Usar un voltaje de 100 Voltios. Por aprox. 21 minutos, o hasta que el frente de corrida este cercano al extremo del gel.

Revelado del gel y toma de la fotografía.

Una vez concluido la corrida electroforética, retirar los cables, apagar la fuente y retirar el gel.

Si se usa el SYBR® Safe DNA Gel Stain, el gel se coloreará en un recipiente que contenga el SYBR a 1X, por unos 5 – 10 minutos. Luego inmediatamente se colocará el gel sobre la luz del transiluminador y se tomará una fotografía. Se debe usar un mínimo de 3 μ L de marcador de peso molecular.

Si se usa el RUNSAFE de Cleaver Scientific 6X, se tomarán 5 μ L del ADN a visualizar y se adicionará 1 μ L del buffer de cargado Runsafe 6X. Toda esta mezcla se colocara dentro del pocillo preparado en el gel. Se debe usar un mínimo de 3 μ L de marcador de peso molecular.

Si se usa el bromuro de etidio (peligro: agente mutagénico), se deberán tomar todas las precauciones de Bioseguridad en su manejo. Se iniciara la coloración en una bandeja que contenga el agente intercalador y se embeberá el gel en esta solución por aprox. 15- 30 min.

Luego deberá enjuagarse en una bandeja con agua destilada por un tiempo similar. Finalmente se colocará el gel sobre la luz del transiluminador y se tomará una fotografía. Se debe usar un mínimo de 1.5uL de marcador de peso molecular.