

UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR APLICADA À SAÚDE



**DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO *Treponema pallidum* EM
AMOSTRAS CLÍNICAS**

VERA MILEIDE TRIVELLATO GRASSI

CANOAS
2021

UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR APLICADA À SAÚDE



**DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO *Treponema pallidum* EM
AMOSTRAS CLÍNICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e
Molecular Aplicada a Saúde como
requisito para obtenção do título de
Doutor

VERA MILEIDE TRIVELLATO GRASSI

Orientadora: Dra. MARIA LUCIA ROSA ROSSETTI

CANOAS

2021

INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) – Canoas - RS.

FONTES FINANCIADORAS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), Código 001.
Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) número SCON00400 / 2019 através do Ministério da Saúde do Brasil.

*“Talvez não tenha
conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor
fosse feito. Não sou o que
deveria ser, mas Graças a
Deus, não sou o que era antes”.
(Marthín Luther Kíng)*

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a Deus,

O todo poderoso que nos guia e sempre nos
coloca no caminho certo, pois tudo já estava
escrito;

Aos meus Pais, Otávio e Zinha, pelo Amor, apoio,
incentivo e compreensão;

Aos meus irmãos, Liliane, Gislaine e Luís Otávio,
amigos e companheiros desta vida, que sempre
torceram por mim;

E a todos que me apoiaram direta ou indiretamente
a realizar esse sonho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a DEUS, pois ele nos mostra que nada é impossível, só precisamos acreditar e ter fé.

A todos do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada a Saúde, e a todos os professores pelos seus ensinamentos.

A Secretaria Estadual de Saúde, por me disponibilizar esse tempo para a realização de um sonho.

A todos do Laboratório de Biologia Molecular, Fernanda, Francielle, Yanka, Jéssica, Graziela e Taina, por toda a ajuda e colaboração neste projeto.

A Dra. Maria Lucia, pois foi a primeira a acreditar que eu poderia realizar este trabalho, e que acabou se tornando a minha mentora neste projeto, agradeço o apoio, orientação e dedicação e amizade durante todo este tempo.

A minha querida Dra. Marcia Susana, por todos os ensinamentos, pelo apoio, orientação, dedicação e amizade.

A todos que de alguma forma me ajudaram e contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Aos meus irmãos, Luis Otavio e Gislaíne pelo incentivo, paciência e compreensão nesta minha jornada. A minha irmã Lílíane, que além de todo o apoio como membro da família, ainda foi um porto seguro, que me ajudou a seguir em frente e conseguir terminar esse projeto.

E pôr fim aos meus amados pais, Otávio e Zinha, por todo o Amor, incentivo, apoio e dedicação, por serem tão especiais pois sem eles eu não conseguiria ter forças para ficar tanto tempo longe de casa, da família e vir me aventurar neste projeto para realizar este antigo sonho.

A todos muito obrigada.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 AGENTE ETIOLÓGICO	16
1.2 A DOENÇA.....	17
1.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	19
1.4 GENOTIPAGEM DE <i>T. pallidum</i>	24
2 JUSTIFICATIVA	27
3 OBJETIVO GERAL	28
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 METODOLOGIA E RESULTADOS.....	29
4.1 CAPÍTULO 1 - ARTIGO: “UMA REVISÃO DAS TÉCNICAS DE DETECÇÃO MOLECULAR DE <i>Treponema pallidum</i> , QUAL A MAIS EFICAZ”	31
4.2 CAPÍTULO 2 - ARTIGO: “ANALYSIS OF DNA EXTRACTION METHODS FOR DETECTION OF <i>Treponema pallidum</i> : A COMPARISON OF THREE METHODS”.	44
4.3 CAPÍTULO 3 - ARTIGO: “DETECÇÃO DE <i>Treponema pallidum</i> EM AMOSTRAS DE SANGUE FIXADAS EM CARTÃO PARA DIAGNÓSTICO DA SÍFILIS CONGÊNITA”.....	51
4.4 CAPÍTULO 4 - ARTIGO: “DETECTION AND MOLECULAR TYPING OF <i>Treponema pallidum</i> ISOLATES FROM SOUTHERN BRAZIL: FREQUENT HIGH OF MACROLIDE RESISTANCE”.	59
5 DISCUSSÃO	74
6 CONCLUSÃO FINAL	77
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXOS	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVC – Acidente vascular cerebral

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CDCT – *CDC-typing*

CIA – *Chemiluminescence Immunoassay*

E-CDCT – *Enhanced CDC-Typing*

EIA – *Treponemal Enzyme Immunoassay*

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FTA-abs – *Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Test*

HIV – Vírus da Imunodeficiência adquirida

HSH – Homens que fazem sexo com homens

IST – Infecção sexualmente transmissível

MHA-TP – *Micro-hemagglutination Assay for T. pallidum*

MLST – *Multilocus Sequence Typing*

MS – Ministério da Saúde

OMS – Organização mundial da Saúde

pb – pares de base

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RIT – *Rabbit Infection Test*

RPR – *Rapid Plasmatic Reagin*

SBMT – *Sequence based molecular typing*

TPHA – *T. pallidum Haemagglutination Test*

TPPA – *T. pallidum Passive Particle Agglutination Test*

TRUST – *Toluidine Red Unheated Serum Test*

VDRL – *Veneral Disease Research Laboratory*

RESUMO

A sífilis é uma infecção sexualmente transmissível (IST) de grande impacto e importância na saúde pública no Brasil e no mundo. O diagnóstico dessa doença nem sempre é fácil e nos casos de sífilis congênita (SC) é ainda mais difícil e tem sido feito por uma combinação de critérios clínicos e laboratoriais. Os métodos de detecção molecular de *Treponema pallidum* começaram a ser utilizados para facilitar o diagnóstico em diferentes estágios da doença, e para a genotipagem. O sucesso dessas metodologias depende também, de etapas pré analíticas como a coleta, o tipo de amostra, e da extração do DNA em quantidade e qualidade adequadas. Nosso estudo teve como objetivo detectar o *T. pallidum* de amostras clínicas por Reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando o gene *tpp47* como alvo para amplificação, fazer uma comparação entre diferentes métodos de extração de DNA, mostrar a detecção dessa bactéria em amostras de sangue fixado em cartão (SFC), coletadas de recém-nascidos, comparadas a amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR), e definir os genótipos circulantes a partir de DNA extraído de amostras de swabs de úlcera de pacientes com suspeita de sífilis. Para a extração de DNA, três métodos foram comparados, um *in house* (sonicação) e dois comerciais LGC (Brasil) e o PureLink® Mini Kit de DNA Genômico (Thermo Fisher Scientific, EUA). Os resultados de PCR foram comparados ao sequenciamento dessas amostras, que foram utilizados como referência. Cada método foi avaliado com base na detecção de *T. pallidum* por PCR. A sensibilidade e concordância dos métodos de extração PureLink, sonicação e LGC foram 100% (K=1,0), 96,5% (K=0,96) e 72,4% (K=0,694), respectivamente. A especificidade foi de 100% com os três métodos. A sensibilidade e especificidade da detecção de *T. pallidum* por PCR a partir de SFC de recém-nascidos foram 63,3% e 100%, respectivamente com concordância substancial (K=0,619) o que pode auxiliar no diagnóstico neonatal. A genotipagem de *T. pallidum* pelo método *Multilocus Sequence Typing* (MLST) de 20/26 amostras positivas para sífilis em PCR mostrou quatro perfis alélicos distintos (o perfil mais encontrado foi o 27.3.1), dentro de dois complexos clonais (SS-14 e o Nichols). Além disso, a mutação A2058G no gene 23SrDNA que confere resistência aos antibióticos macrolídeos (azitromicina) só não foi identificada em uma amostra. Nossos resultados demonstram que a detecção do *T. pallidum* por PCR é viável, e que a forma de extração do DNA tem muita influência no resultado do teste. Verificamos que algumas cepas do *T. pallidum* tem circulação

mundial, mas que na nossa região não existe muita variabilidade, e encontramos a mutação que causa resistência aos antibióticos macrolídeos, na grande maioria das amostras avaliadas, o que aponta para a necessidade de adequar o tratamento de segunda escolha para essa doença.

Palavras-chave: *T. pallidum*, PCR, MLST, sífilis, diagnóstico.

ABSTRACT

Syphilis is a sexually transmitted infection (STI) of significant impact and importance on public health in Brazil and worldwide. Diagnosis of this disease is not always easy and in cases of congenital syphilis (CS) it is even more difficult and has been done by a combination of clinical and laboratory criteria. Molecular detection methods for *Treponema pallidum* began to be used to facilitate diagnosis at distinct stages of the disease, and for genotyping. The success of these methodologies also depends on pre-analytical steps such as collection, the type of sample, and DNA extraction in adequate quantity and quality. Our study aimed to detect *T. pallidum* from clinical samples by polymerase chain reaction (PCR) using the *tpp47* gene as target for amplification, to make a comparison between different methods of DNA extraction, to show the detection of this bacterium in fixed blood samples. on cardboard (CFS), collected from newborns, compared to cerebrospinal fluid (CSF) samples, and to define the circulating genotypes from DNA extracted from ulcer swab samples from patients with suspected syphilis. For DNA extraction, three methods were compared, one in house (sonication) and two commercial LGC (Brazil) and the PureLink® Mini Genomic DNA Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). PCR results were compared to the sequencing of these samples, which were used as a reference. Each method was evaluated based on the detection of *T. pallidum* by PCR. The sensitivity and agreement of the PureLink, sonication and LGC extraction methods were 100% (K=1.0), 96.5% (K=0.96) and 72.4% (K=0.694), respectively. Specificity was 100% with the three methods. The sensitivity and specificity of PCR detection of *T. pallidum* from newborn CFS were 63.3% and 100%, respectively, with substantial agreement (K=0.619) which may help in the neonatal diagnosis. Genotyping of *T. pallidum* by the multilocus sequence typing (MLST) method of 20/26 syphilis positive samples in PCR showed four distinct allelic profiles (the most common profile was 27.3.1), within two clonal complexes (SS- 14 and Nichols). In addition, the A2058G mutation in the 23S rDNA gene, which confers resistance to macrolide antibiotics (azithromycin), was not identified in only one sample. Our results demonstrated that the detection of *T. pallidum* by PCR is feasible, and that the way in which the DNA is extracted has a profound influence on the test result. We found that some strains of *T. pallidum* have worldwide circulation, but that in our region, there is not much variability, and we found the mutation that causes resistance to macrolide

antibiotics in the vast majority of the samples evaluated, which points to the need to adapt the second-line treatment for this disease.

Keywords: *T. pallidum*, PCR, MLST, syphilis, diagnosis.

1 INTRODUÇÃO

A sífilis é uma doença grave, infectocontagiosa, polimórfica, que intercala períodos sintomáticos e assintomáticos. Constitui uma patologia muito antiga conhecida desde o século XV, e que surgiu primariamente na Europa, disseminando-se para os outros continentes. A designação *syphilis* foi adotada no fim do século XVIII, resultante da analogia com *syphilus*, um pastor protagonista de um poema intitulado “*Syphilis vive morbus gallicus*”, publicado em 1530, e escrito por Hieronymus Fracastorius (1478-1553), um médico e filósofo de Verona. No poema, a doença sofrida pelo pastor é descrita. Já Jean Fernel (1506-1558) introduziu o termo mais habitualmente conhecido da doença - *lues venereum* (*lues* provém do latim que significa praga ou pestilência), que originariamente foi aplicada a qualquer doença venérea, tendo se tornado sinônimo de sífilis no início do século XX (Castro, 2004).

As principais vias de transmissão são a sexual e a vertical. Além das lesões cutaneomucosas das fases primária ou secundária que, em geral, apresentam completa remissão mesmo na ausência de tratamento, a sífilis adquirida pode acarretar manifestações graves e irreversíveis. A invasão do sistema nervoso é comum na sífilis secundária e por vezes, pode se apresentar com sinais meníngeos e comprometimento dos pares cranianos, onde a sífilis terciária tornou-se mais rara após o advento dos antibióticos. Neste estágio, as três manifestações mais comuns são: (a) gomas sífilíticas, (b) sintomas neurológicos e (c) alterações cardiovasculares. Além das consequências diretas, há extensa evidência que a sífilis facilita o risco de transmissão pelo HIV (Vírus da Imunodeficiência Adquirida), seja por representar um marcador de comportamentos de risco, seja pelo aumento da transmissibilidade decorrente da quebra da barreira cutânea e da presença de células inflamatórias ao nível das lesões cutaneomucosas (Lafond e Lukehart, 2006; Cohen et al., 2013; Taylor et al., 2014).

Em países de renda mais alta, também se identifica a ocorrência de casos de sífilis, ainda que em menor magnitude e com incidência preferencial em alguns subgrupos populacionais (ECDC, 2018). Na América do Norte há recrudescência da sífilis adquirida. Há uma evidente diferença na incidência entre homens (9.3 casos por 100.000 habitantes) e mulheres (0.9 casos por 100.000 habitantes) (USA, 2012). Além disso, nem todos os subgrupos populacionais são afetados com a mesma intensidade. Em 2011, 72% das

notificações eram de homens que fazem sexo com homens (HSH), especialmente os jovens. Nas periferias de grandes áreas metropolitanas, os negros heterossexuais de baixo nível socioeconômico são os mais atingidos (Cohen et al., 2013). Também na Europa a população de HSH é afetada desproporcionalmente (ECDC, 2018).

A prevalência da sífilis em gestantes e seus desfechos desfavoráveis, com dados coletados mundialmente em 97 países, são de aproximadamente 1,36 milhões de casos de mulheres que apresentaram sífilis ativa durante a gestação, sendo que uma grande proporção delas não recebeu tratamento, ou se recebeu, foi de maneira inadequada (Newman et al., 2013). Prevalências de sífilis na gestação foram aferidas conforme referenciadas em estudo de validação de testes rápidos para o diagnóstico da sífilis em gestantes, obtendo os seguintes resultados: Amazonas, Brasil, 1,36% (64/4695); Guangdong, China, 1,9% (109/5272); Lima, Peru, 1,0% (146/15.985); Geita, Tanzânia, 10,9% (6.345/58.249); Kampala, Uganda, 5,3% (690/13.131); Lusaka, Zâmbia, 9,2% (1050/11.460) (Newman et al., 2013).

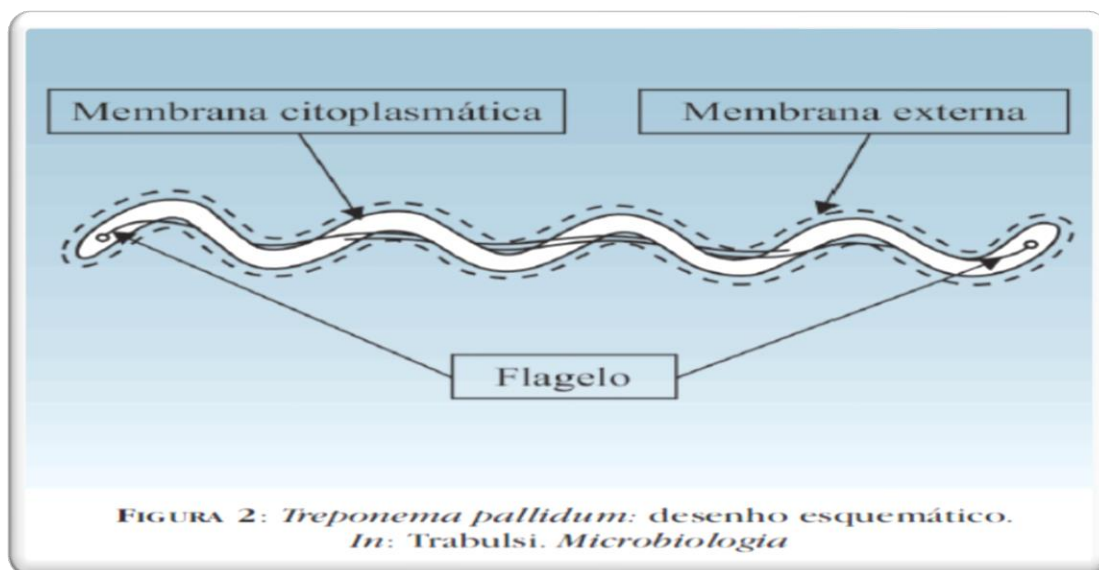
O Brasil apresenta um estado de hiperendemia de sífilis e, por conseguinte, de sífilis congênita. O país atualmente pode ser considerado um país de média renda com um sistema de saúde pública sem custo para o usuário e dito universal. Entretanto, a população enfrenta graves dificuldades para acesso. A sífilis congênita é um agravo de notificação compulsória desde 1986. No boletim epidemiológico do Brasil de 2021, observa-se que a sífilis adquirida, agravo de notificação compulsória desde 2010, teve uma taxa de detecção de 54,5 casos por 100.000 habitantes, em 2020. Também em 2020, a taxa de detecção de sífilis em gestantes foi de 21,6/1.000 nascidos vivos; a taxa de incidência de sífilis congênita, de 7,7/1.000 nascidos vivos; e a taxa de mortalidade por sífilis congênita, de 6,5/100.000 nascidos vivos. Embora se observe uma diminuição dos casos de sífilis em quase todo o país, cabe ressaltar que parte dessa redução pode estar relacionada à identificação de problemas de transferência de dados entre as esferas de gestão do SUS. Esta diminuição também pode estar relacionada a uma subnotificação dos casos no Sinan, devido à mobilização local dos profissionais de saúde ocasionada pela pandemia de covid-19 (Brasil, 2021).

O boletim epidemiológico oficial de sífilis congênita de 2021 apresenta uma incidência de 7,7 por 1.000 nascidos vivos no ano de 2020, sendo que o estado do Rio Grande do Sul, no mesmo período apresentou incidência de 12,9 casos por 1.000 nascidos

vivos (Brasil, 2021). A subnotificação existe e sua dimensão é desconhecida. Um estudo em um hospital que atende 60% dos partos na região centro-oeste do país, apresentou a incidência de 9,9 casos por 1.000. Quando comparado com os dados epidemiológicos oficiais do município, apenas 36% haviam sido notificados (Araujo et al., 2012). Há, portanto, um longo caminho para atingir os níveis de “eliminação para fins de saúde pública”. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabelece como aceitável para fins de eliminação a ocorrência de até 0,5 casos por 1.000 nascidos vivos (WHO, 2019). Apesar do Brasil ter obtido avanços significativos no controle da transmissão vertical do HIV, ainda existe ineficácia das medidas de controle da sífilis congênita (Benzaken et al., 2020).

1.1 AGENTE ETIOLÓGICO

A sífilis é causada pelo agente etiológico *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* (Carlson et al., 2011; Luo et al., 2021).



O gênero *Treponema* pertence à ordem das *Spirochaetales* que está subdividida em duas famílias: *Spirochataceae* e *Leptospiraceae*. Possui sete gêneros, mas apenas três de interesse na medicina, o *Treponema*, a *Borrelia* e a *Leptospira* (Castro, 2004; Castro et al., 2009; Brasil, 2016). O *T. pallidum* apresenta uma membrana citoplasmática associada à outra membrana mais externa. São anaeróbios estritos ou microaerófilos, em forma de uma espiroqueta, bacilos helicoidais, móveis, com movimentos de rotação e translação e

com flagelos periplasmáticos inseridos em suas extremidades, com dimensões que variam entre 5 e 20 µm de comprimento e 0,1 a 0,2 µm de espessura (Castro, 2004; Fraga et al., 2014). Caracteriza-se por ser um microrganismo espiralado e fino, que gira em torno do seu maior comprimento e que faz movimentos característicos para frente e para trás, o que facilita a sua penetração nos tecidos do organismo hospedeiro. A motilidade, a capacidade de aderir às células e a quimiotaxia contribuem para a virulência desse patógeno, resultando na extrema capacidade de invasão, rápida fixação em superfícies celulares e penetração nas junções endoteliais e nos tecidos (Brasil, 2016). É um microrganismo com impossibilidade de cultivo em meios de cultura, tem baixa resistência ao meio ambiente e é sensível ao sabão e a desinfetantes, ressecando rapidamente ao ar livre (Brasil, 2016).

O *T. pallidum* tem um único cromossomo circular de 1.138.006 pb (pares de base), com 1.041 sequências codificadoras e com um conteúdo de 52.8% de C/G (Fraga et al., 2014). Os dois genes de maior interesse para realizar o diagnóstico por biologia molecular são o da DNA polimerase, conhecido como *polA*, cujo tamanho é 2.994 pb. O segundo é o *tpp47*, um gene que codifica uma proteína de membrana envolvida na síntese da parede celular (Liu et al., 2001; Ageron 1 et al., 2015; Thell et al., 2020).

1.2 A DOENÇA

Durante a evolução natural da doença ocorrem períodos de atividade com características clínicas, imunológicas e histopatológicas distintas e períodos de latência, nos quais não se observa a presença dos sinais ou sintomas (Castro, 2004, Lou et al., 2020).

A sífilis pode ser classificada pelo método de transmissão, sendo assim sífilis adquirida ou congênita. Na adquirida, a forma mais comum é a sexual, porém existem casos de transmissão por transfusão sanguínea ou por inoculação acidental. Na congênita, ocorre a transmissão da mãe para o filho durante a gestação (Passos et al., 2004; Brasil, 2016).

A sífilis pode também ser classificada conforme suas fases:

- Primária: O período de incubação da doença nesta fase é de 2 a 3 semanas. Normalmente forma uma pápula nos órgãos genitais, que aos poucos se transforma numa úlcera não dolorosa. Geralmente chamada de cancro duro, costuma desaparecer depois de 3 a 6 semanas mesmo sem tratamento, o que leva a uma sensação de cura, porém a bactéria continua se multiplicando neste período (Castro, 2004; Brasil, 2016).
- Secundária: Ocorre em cerca de 25% a 35% dos pacientes não tratados, passa do cancro duro para a sífilis disseminada pelo organismo. Essa forma da doença se manifesta com erupções na pele, palmas das mãos e solas dos pés. Também pode aparecer febre, mal-estar, perda de apetite, dor nas articulações, queda de cabelo, lesões oculares e aparecimento de linfonodos difusamente pelo corpo. Outra lesão típica da sífilis secundária é a condiloma lata, que é uma lesão com aspecto de verruga que surge normalmente próximo do local da lesão da sífilis primária. Porém, há casos em que o paciente quase não apresenta lesão aparente, tendo apenas alguns incômodos e não procure ajuda médica. Assim como na sífilis primária, os sintomas desaparecem espontaneamente sem qualquer tratamento, e pode evoluir ou não para outras formas de sífilis (Castro, 2004; Brasil, 2016).
- Latente: É uma fase em que não existem sintomas, mas os exames sorológicos fornecem resultados positivos. Essa fase latente pode ainda ser dividida em precoce, quando a contaminação ocorreu a menos de um ano, e tardia quando a infecção foi há mais de um ano (Castro, 2004; Brasil, 2016).
- Terciária: Nesta fase a doença é grave. Costuma se apresentar por grandes lesões ulceradas que podem acometer pele, ossos e órgãos internos. Também é chamada de goma sífilítica. Pode ainda atingir a artéria aorta, causando aneurismas e lesões da válvula aórtica. Neste caso, denomina-se de sífilis cardiovascular. Também é possível que atinja o sistema nervoso central, causando a neurosífilis, levando a demência, acidente vascular cerebral (AVC), meningite e problemas motores por lesão da medula e dos nervos (Castro, 2004; Castro et al., 2016; Brasil, 2016).
- Congênita: Causada pela infecção do *T. pallidum* adquirido pela mãe em qualquer fase da gestação ou até durante o parto. É confirmado por testes sorológicos feitos na mãe e na criança. A sífilis congênita pode ser dividida em etapa precoce, onde o diagnóstico é realizado até os dois anos de idade, incluindo os natimortos, e etapa tardia, com o diagnóstico após os dois anos, onde ela se manifesta normalmente na puberdade, afetando

ossos, dentes e sistema nervoso. Os sintomas clínicos variam entre prematuridade, baixo peso ao nascer, hepatomegalia, com ou sem esplenomegalia, erupções cutâneas e alterações ósseas, apesar de que a maior parte dos recém-nascidos nasce sem qualquer sintomatologia. Na gestação, a sífilis congênita se manifesta com abortamento, nascimentos prematuros ou nascimentos seguidos de morte. Ao nascer, a criança com sífilis congênita pode apresentar lesões bolhosas, ricas em treponemas, na palma das mãos, planta dos pés, ao redor da boca e do ânus (Castro, 2004; Maurissa, 2009; Brasil, 2016).

O tratamento para a sífilis é bastante simples, mas nem sempre utilizado. Na fase primária ou recente, o tratamento é penicilina benzatina 2.400.000 UI dose única. Na sífilis recente, mas já secundária ou latente, com menos de um ano – penicilina benzatina 4.800.000 UI em duas doses semanais de 2.400.000 UI. Na sífilis tardia, terciária ou latente, com mais de um ano, e na sífilis com tempo desconhecido – penicilina benzatina 7.200.000 em três doses semanais de 2.400.000 UI. Para a sífilis congênita deve-se primeiro verificar se a mãe foi tratada ou não, e então seguir algoritmos preparados pelo Ministério da Saúde (MS), onde se leva em conta a sintomatologia no recém-nascido e seus exames sorológicos, entre outros. Outras drogas também foram testadas recentemente, mas não demonstraram atividade superior à da penicilina, devendo ser mantidas como drogas de segunda linha (Brasil, 2015). Drogas alternativas foram utilizadas em pacientes alérgicos a penicilina, e dentre elas a azitromicina (macrolídeos) tem a vantagem de ser administrada dose única, sendo assim apresentando alta adesão. Porém foram relatadas falhas no tratamento, que indicam uma resistência a essa classe de antibióticos, e Lukehart et al. (2004) identificou uma mutação no gene que codifica para RNA ribossomal 23S do *T. pallidum*. Essa mutação A→G na posição 2058 (A2058G), que é uma troca de adenina (A) por guanina (G), em testes *in vivo*, confirmaram a resistência induzida pela mutação no gene 23SrRNA.

1.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico da sífilis, diferente de outras infecções bacterianas, não é feito por isolamento ou cultura do agente etiológico, sendo realizado por um combinado de achados clínicos e exames laboratoriais (Ageron 2 et al., 2009; Theel et al., 2020).

Para o diagnóstico laboratorial da sífilis é de extrema importância que se considere cada estágio da doença, pois eles possuem particularidades que podem interferir na escolha dos testes (Brasil, 2016, Theel et al., 2020).

O diagnóstico presuntivo depende de testes, que podem ser divididos em sorológicos ou indiretos, e os diretos. Dentre os sorológicos temos os treponêmicos (são específicos para o *T. pallidum*), e os não treponêmicos. Os testes diretos são aqueles que pesquisam o agente, que nesse caso pode ser a microscopia de campo escuro, a imunofluorescência direta e os testes moleculares. Usualmente três testes não-treponêmicos são utilizados: o VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*) em lâmina, o teste RPR (*Rapid Plasmatic Reagin*) e o TRUST (*Toluidine Red Unheated Serum Test*), como forma de rastreamento no primeiro e terceiro trimestres e no momento do parto. Em caso de sorologia não-treponêmica reagente, idealmente, são utilizados os testes treponêmicos como testes confirmatórios. A maior parte deles utiliza anticorpos recombinantes do tipo IgM e IgG: TPHA (*T. pallidum Haemagglutination Test*), MHA-TP (*Micro-Haemagglutination Assay for T. pallidum*), TPPA (*T. pallidum Passive Particle Agglutination Test*), FTA-abs (*Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Test*), EIA (*Treponemal Enzyme Immunoassay*), CIA (*Chemiluminescence Immunoassay*) e IgG *Immunoblot Test* para *T. pallidum* (Janier et al., 2014; Lou et al., 2021). Laboratórios, especialmente os com grande volume de amostras, tem iniciado o rastreamento com testes treponêmicos automatizados do tipo *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) seguidos de confirmação e titulação pelos testes não treponêmicos. Esse sistema tem sido denominado “fluxograma reverso”. Nessa situação, ainda é importante a realização de teste não treponêmico quantitativo para o seguimento da evolução pós-tratamento. Mais recentemente foram disponibilizados os testes rápidos, sendo usados como exames de rastreamento. Esse método tem a grande vantagem de ser realizado no momento do atendimento, sem necessidade de refrigeração ou de equipamentos. Desta maneira é possível que se evite a perda de seguimento e, conseqüentemente, a ausência de tratamento (Tsang et al., 2011; Mabey et al., 2013; Morshed et al., 2014, Yi et al., 2018).

No recém-nascido, em especial na ausência de sintomas, o que representa 60% dos recém-nascidos com sífilis, o diagnóstico da sífilis congênita depende exclusivamente de testes diagnósticos e pode ser bastante difícil (Herremans et al., 2010; Benzaken et al., 2020). Não existe teste ideal que, isoladamente, ofereça o diagnóstico da sífilis neste contexto. Os testes definitivos são aqueles que identificam o agente etiológico *T. pallidum* (diretos). O *Rabbit Infective Test* (RIT), utilizado tradicionalmente em pesquisa, não é utilizado no contexto clínico (Tsang et al., 2011). A microscopia de campo escuro e a imunofluorescência direta podem ser utilizadas (Buffet et al., 2007; Lou et al., 2021), mas um resultado negativo não indica obrigatoriamente a ausência de infecção, uma vez que sua sensibilidade é variável. A interpretação dos testes sorológicos do recém-nascido é prejudicada pela presença de anticorpos maternos que atravessam passivamente a barreira placentária (Herremans et al., 2010). O seguimento sorológico do recém-nascido também pode oferecer o diagnóstico *a posteriori*. No entanto, postergar o tratamento de um recém-nascido em risco para sífilis congênita, enquanto aguarda a evolução sorológica, é uma prática indesejável e arriscada. Dos testes sorológicos, os mais sensíveis são os de detecção de IgM específica anti-*T. pallidum*. Três técnicas são utilizadas para essa detecção: 19S FTA-ABS, IgM *Immunoblots* e IgM ELISA. A sensibilidade e especificidade desses testes aumentaram muito com o advento das duas últimas técnicas (Tsang et al., 2011).

A incidência de neurosífilis vem aumentando em todos os países, incluindo os Estados Unidos (Marra et al., 2018), que se observa esse incremento na atividade clínica diária nos serviços públicos e privados. O VDRL no líquido segue sendo o padrão ouro para diagnóstico, mas não é sempre positivo na presença de doença neurológica (Berger et al., 2014). As alterações na celularidade e bioquímica no líquido dos pacientes com neurosífilis são encontradas em outras doenças, em especial na infecção pelo HIV que se apresenta frequentemente superposta. Assim, fica estabelecida a carência de testes diagnósticos confiáveis para o diagnóstico de neurosífilis em pacientes sintomáticos e assintomáticos. Essa carência foi reconhecida como um *gap* em recente reunião internacional para estabelecer prioridade de pesquisa em sífilis, e deve ser corrigido por meio de pesquisa operacional (Kersh et al., 2018).

Nos últimos anos houve uma verdadeira explosão de novas técnicas para o diagnóstico de diversas patologias através da análise do DNA, sendo estas cada vez mais simples, acessíveis e eficientes. Atualmente podemos analisar sequências de DNA

simultaneamente, permitindo fazer um perfil dos genes de um tipo celular. Se comparadas as técnicas iniciais da biologia molecular, as utilizadas na atualidade são mais poderosas e sensíveis (Brischetto et al., 2018; Theel et al., 2020).

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ainda é a técnica mais usada, apesar de estar sendo aperfeiçoada a cada dia, já está praticamente toda automatizada e realizada em tempo real. Esta plataforma faz diminuir o tempo e riscos de contaminações, e ainda pode ser associada a outras técnicas (Theel et al., 2020; Lou et al., 2021). Os métodos de detecção de DNA associados ao PCR mais relatados envolvem a eletroforese em gel de agarose, utilizando brometo de etídio ou fluoróforos, tendo como inconveniente a instabilidade e os riscos associados a utilização de materiais radioativos ou mutagênicos.

Com a falta de um método de diagnóstico rápido, confiável e específico principalmente na fase primária da sífilis, isto se torna um sério problema de Saúde Pública. A detecção da doença na sua fase inicial é de vital importância para o início efetivo do tratamento, evitando assim a utilização inadequada de medicamentos potencialmente tóxicos, como também para interromper a cadeia de transmissão (Brasil, 2016; Theel et al., 2020).

No entanto, para o diagnóstico da sífilis, ainda não temos uma técnica padrão. Existem vários artigos publicados que divergem sobre as técnicas e as sequências dos *primers*, como a *tp0105*, *tpp15*, *tpp47* e *tp1016*, e sobre os diferentes métodos de extração do DNA da amostra. A quantidade de alvos utilizados tende a variar de um a três genes. A maior parte desses testes utilizam *primers* para genes que codificam lipoproteínas de membranas, o que se torna favorecido pelo fato de o *T. pallidum* ter regiões geneticamente conservadas (Castro, 2004; Ageron1 et al., 2015; Theel et al., 2020; Shukalek et al., 2021).

A detecção da doença na sua fase inicial é de vital importância para o começo efetivo do tratamento, como também para interromper a cadeia de transmissão e dos danos por elas causados (Lou et al., 2021).

O diagnóstico definitivo da infecção pelo *T. pallidum* por meio da biologia molecular foi um grande avanço. É sabido que o agente etiológico da sífilis não é cultivável e vale mencionar que os testes utilizados na prática clínica oferecem um diagnóstico presuntivo. Os testes definitivos, até então, eram utilizados exclusivamente na pesquisa (inoculação em testículo de coelho), ou apresentavam exigências técnicas

elevadas, ou sensibilidade aquém do ideal (microscopia de campo escuro ou imunofluorescência direta) (Lou et al., 2021).

Para todas as síndromes clínicas causadas por esses agentes: úlceras genitais, corrimentos uretrais e vaginais, verrugas genitais e doença inflamatória pélvica, foram desenvolvidos testes de biologia molecular, seja para um agente isoladamente, seja para um conjunto de agentes fazendo uso dos testes denominados multiplex, onde o DNA alvo dos diferentes microrganismos causadores de determinada síndrome são pesquisados simultaneamente (Ageron 2 et al., 2015).

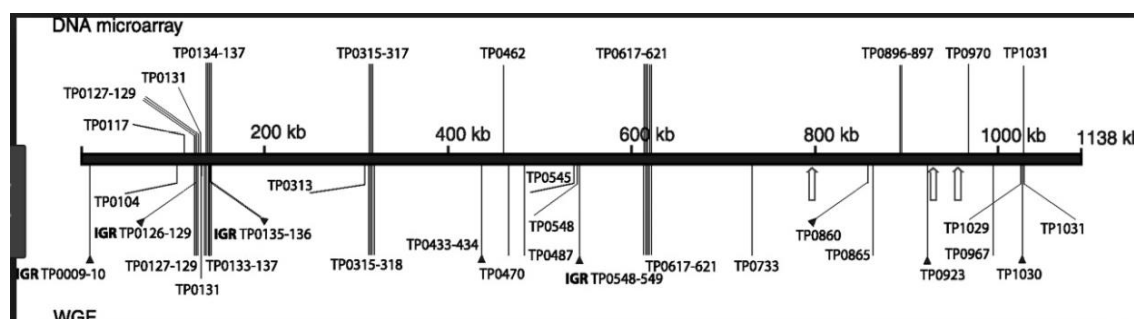
Em Alberta, Canadá, foram examinados 87 espécimes de 68 pacientes atendidos em duas clínicas urbanas de infecções sexualmente transmissíveis. A PCR foi utilizada para amplificar os principais genes do *T. pallidum*, bem como uma região específica do gene 23S rRNA ligada a susceptibilidade a antibióticos macrolídeos. Nos casos de sífilis primária, a PCR foi positiva com uma sensibilidade de 75% em *swabs* com material obtido de úlceras, mas não em amostras de sangue, enquanto em casos de sífilis secundária, 50% das amostras de sangue foram positivas por PCR. Quatro casos de sífilis PCR-positivos foram causados por uma cepa resistente à azitromicina. Os resultados confirmaram que os *swabs* das úlceras primárias são os espécimes de escolha para fins de diagnóstico laboratorial (Tsang et al., 2011).

Outro estudo revelou o uso da PCR para a detecção do *T. pallidum* como sendo um método válido para diagnosticar a sífilis através da análise de uma coorte de 273 pacientes na França e Suíça. O método molecular foi comparado a uma combinação de microscopia de campo escuro, como método de referência e testes sorológicos, onde foi verificado que a acurácia diagnóstica da PCR foi maior que a da microscopia (Ageron 2 et al., 2015). Também se tem observado a aplicação do ensaio *nested* PCR para detecção do DNA de *T. pallidum* no sangue de pacientes com diferentes estágios de sífilis. Na pesquisa de Wang et al. (2018), foi desenvolvido um *nested* PCR com os genes *tpp47* e *polA* para identificar a presença da sífilis em sangue total das amostras coletadas de 262 pacientes com diferentes estágios de sífilis (84 sífilis primária, 97 sífilis secundária e 81 pacientes com sífilis latente). O ensaio de PCR detectou DNA de *T. pallidum* em 53,6% e 62,9% dos pacientes com infecção primária e sífilis secundária, respectivamente. Os resultados indicaram que o *nested* PCR é um método sensível para detectar o *T. pallidum* no sangue e é especialmente útil para detectar sífilis precoce, incluindo primária e

secundária. Os resultados também sugerem que o ensaio de PCR pode ser usado para complementar outros métodos para melhorar o diagnóstico da sífilis. Todas essas comparações sobre qual a melhor técnica molecular para a detecção do *T. pallidum*, estão mais bem explicadas no artigo de revisão que foi publicado e está apresentado nos resultados como capítulo 1.

1.4 GENOTIPAGEM DE *T. pallidum*

Nas últimas décadas a biologia molecular vem obtendo papel cada vez mais importante no diagnóstico das doenças infecciosas. Isso é verdadeiro também no caso das infecções de transmissão sexual (IST). No caso da sífilis, estudos sobre o *T. pallidum* são bem complexos e, ferramentas moleculares se tornam muito úteis para a determinação da diversidade e epidemiologia das infecções. Além de ter o potencial de aprimorar o tratamento clínico, os métodos de prevenção e controle, também podem contribuir para o melhor entendimento sobre aquisição e transmissão da sífilis (Shukalek et al., 2021).



Outra ferramenta bastante útil no entendimento da dinâmica epidemiológica da infecção é a genotipagem do *T. pallidum*. Isso é importante para a estimativa do impacto da doença, monitoramento das tendências epidemiológicas e para a avaliação das atividades de controle, além da identificação de tipos com maior potencial de doença invasiva ou resistência aos macrolídeos. Portanto, considerando as dificuldades diagnósticas e a factibilidade e as vantagens do uso da biologia molecular no diagnóstico da sífilis, estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar os tipos de *T. pallidum* presentes em lesões primárias de pacientes atendidos em clínicas especializadas de doenças sexualmente transmissíveis (Peng et al., 2011; Gomes et al., 2013; Grillova et al., 2018).

Em 1998, Fraser e colaboradores realizaram o sequenciamento completo do genoma do *T. pallidum* (cepa Nichols – GenBank AE000520.1), o que forneceu dados para o desenvolvimento de sequências alvo para os protocolos de PCR. Também no ano de 1998, pesquisadores do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), publicaram o primeiro método molecular para distinguir os subtipos de *T. pallidum*. O método se baseava (a) na determinação do número de repetições de 60 pb do gene *arp* e (b) na análise do polimorfismo por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) do gene *tpr* (Fraser et al., 1998; Pillay et al., 1998; Casal et al., 2011; Ho e Lukehart, 2011). Este método de caracterização do *T. pallidum* introduzido por Pillay e colaboradores (1998) é designado como esquema de CDC-Typing (CDCT), que usa o número de repetições de 60 pb no gene *arp* (TP0433) juntamente com o polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição da *tprE* (TP0313), *tpr L* (TP0317), e de *trp J* (TP0621). Posteriormente, o CDCT foi complementado incluindo o número de repetições no gene *rps A* (TP0279) (CDCT- *rps A*) ou por análise de sequência adicional do locus TP0548, que era conhecido como o sistema de Enhanced *CDC Typing* - tipagem CDC Aprimorado (ECDCT) (Grillova et al., 2018).

Esses métodos foram questionados devido a uma possível variabilidade intra-estirpe dos locos *arp* e *tpr*, e assim foi introduzida a tipagem molecular baseada em sequenciamento – *Sequencing Based Molecular Typing* (SBMT), que determinou as sequências de rDNA TP0136, TP0548 e 23S. Recentemente, o sistema SBMT foi suplementado com sequenciamento adicional de TP0705 e designado como o sistema *Multilocus Sequence Typing* (MLST). A mudança aumentou o poder de resolução genotípica de amostras clínicas semelhantes a *T. pallidum* SS14, que são as amostras mais comuns entre amostras clínicas na Europa e nos EUA. Como os dois dos alvos (TP0136 e TP0548) codificam proteínas de membrana externa, que provavelmente estão sob pressão imune do hospedeiro, esses loci representam excelentes alvos para avaliar a diversidade de deformação (Pospisilova et al., 2018).

Uma grande variedade de subtipos de *T. pallidum* tem sido encontrada mundialmente. O subtipo 14d é o mais prevalente em várias partes do mundo, seguido pelos subtipos 14f, 14a, 13d e 15d.

A tipagem molecular de *T. pallidum* foi estudada em pacientes de cinco clínicas da Carolina do Norte e do Sul (EUA), sendo que as lesões sugestivas de sífilis primária

ou secundária foram analisadas por técnicas moleculares para a diferenciação de cepas de *T. pallidum*. As amostras de lesões foram rastreadas quanto à presença de DNA de *T. pallidum* usando PCR para o gene *polA* e os resultados mostraram que, das 154 amostras de lesões que continham o *T. pallidum*, sete subtipos foram identificados, sendo que de um a quatro subtipos foram detectados em cada clínica. Os dados foram considerados promissores para as primeiras análises de tipagem do *T. pallidum* (Pope et al., 2005).

Na China, também tem sido desenvolvida pesquisas envolvendo a investigação dos genótipos de *T. pallidum*. Um dos estudos realizado em Xangai, durante um período de cinco anos (2007 a 2011), analisou *swabs* genitais de pacientes com sífilis do Hospital de Doenças da Pele de Xangai. No total, 304 dos 372 pacientes apresentaram o DNA do *T. pallidum* e foram identificados dezoito tipos, dentre os três genes estudados, e mais 12 subtipos com uma combinação de dois dos três genes. Os dados obtidos estão de acordo com os dados de outras áreas da China (Dai et al., 2012).

No Brasil, existem poucos estudos moleculares sobre *T. pallidum*, e estes se restringem ao diagnóstico da infecção sífilítica e não a sua genotipagem. Logo, os poucos dados que existem sobre a epidemiologia molecular não permitem identificar as principais cepas circulantes no país. Os dados obtidos através da caracterização molecular do *T. pallidum* possibilitam um maior entendimento sobre a fisiologia bacteriana (metabolismo), sobre a patogênese da sífilis (virulência, motilidade, invasão e evasão imune), avaliação da eficácia do tratamento, e dados importantes sobre a resistência bacteriana aos macrolídeos (Fraser et al., 1998; Casal et al., 2011; Oliveira, 2016).

Pacientes atendidos no Ambulatório Souza Araújo – IOC/FIOCRUZ foram investigados através de um estudo transversal descritivo para a presença de infecção por *T. pallidum*, com a finalidade de verificar se ferramentas moleculares são úteis para o diagnóstico e tipificação da sífilis. O DNA treponêmico foi encontrado em 31 (87%) pacientes; 46,6% das amostras testadas foram positivas para o gene 23S rRNA e foram examinadas para resistência a macrolídeos. Os resultados demonstraram a boa eficácia do diagnóstico molecular da sífilis e na prevalência de subtipos, além de demonstrar a existência de cepas mutantes que são resistentes aos macrolídeos. Diferentes genótipos de *T. pallidum* podem ser identificados em um mesmo paciente o que pode significar reinfecção ou coinfeção (Oliveira, 2016).

2 JUSTIFICATIVA

O diagnóstico laboratorial existente para ISTs serve para muitos propósitos, está repleto de vários desafios e ainda permanece como uma das questões críticas para o controle das doenças. Mesmo com todos os avanços científicos na área, grande proporção de ISTs é assintomática ou subclínica e, portanto, não é diagnosticada e nem tratada.

As ISTs são frequentes, têm múltiplas etiologias e apresentações clínicas, e causam impacto na qualidade de vida das pessoas, nas relações pessoais, familiares e sociais. O diagnóstico e tratamento das pessoas com ISTs e de seus parceiros sexuais interrompe a cadeia de transmissão e previne outras infecções e possíveis complicações. Se não forem diagnosticadas e tratadas, essas doenças podem causar sérios problemas em longo prazo.

A sífilis ainda é uma doença bastante negligenciada no Brasil, bem como as outras ISTs, e facilita o contágio com o HIV e outras infecções. Somado com a falta de um método de diagnóstico rápido, confiável e específico, principalmente nas fases primária e secundária da sífilis, torna-se um sério problema de saúde pública. A detecção desta doença na fase inicial é de vital importância para o início efetivo do tratamento, evitando assim a utilização inadequada de medicamentos potencialmente tóxicos, como também para interromper a cadeia de transmissão.

Atualmente é usado um combinado de dois testes sorológicos, um treponêmico e um não treponêmico, para poder fornecer um diagnóstico, principalmente na fase primária da doença. A introdução das ferramentas moleculares tornou-se cada vez mais importante no diagnóstico das ISTs, como é o caso da sífilis, onde o *T. pallidum* se mostra um patógeno complexo, pois esta é uma bactéria não cultivável. Outro aspecto a ser considerado é o potencial que o uso da biologia molecular trouxe em aprimorar o tratamento clínico, os métodos de prevenção e controle, além de poder contribuir para o melhor entendimento sobre aquisição e transmissão da sífilis. Desta forma, amostras retiradas de lesões suspeitas de sífilis poderão ser analisadas de forma mais específica, vale ressaltar que a amostra adequada, varia conforme a fase da doença, e o tipo de extração do DNA também varia conforme a amostra. No Brasil existem poucos estudos sobre a caracterização e diferenciação dos genótipos do *T. pallidum*, e novas caracterizações permitirão elucidar dúvidas sobre a evolução e tratamento da doença. A

capacidade de diferenciar estirpes de *T. pallidum* é importante, para conhecer a diversidade de cepas circulantes, monitorizar as alterações na prevalência e distribuição geográfica destas ao longo do tempo, e assim determinar que novas estirpes foram introduzidas em um determinado local.

Diante do exposto acima, nota-se que esta situação faz com que os custos fiquem extremamente elevados para os sistemas de saúde. Além disso, o conhecimento limitado sobre as ISTs em relação às possíveis consequências está sendo identificado como uma das barreiras à implementação de programas de prevenção, impossibilitando a realização de políticas de saúde pública para educação e orientação da população.

3 OBJETIVO GERAL

Identificar e genotipar *T. pallidum* isolados de amostras clínicas no sul do Brasil. Além disso, analisar métodos de extração de DNA para otimizar o diagnóstico da sífilis por PCR.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Padronizar a técnica de detecção do *T. pallidum* por PCR.
2. Detectar a presença de DNA do *T. pallidum* em lesões sugestivas de sífilis primária e secundária em homens atendidos no Ambulatório de Dermatologia Sanitária da Secretaria Estadual de Saúde do RS.
3. Comparar métodos de extração na detecção do *T. pallidum*.

4. Detectar *T. pallidum* em amostras de líquido e sangue de crianças com ou sem suspeita de sífilis.
5. Identificar os genótipos de *T. pallidum* na população estudada.

4 METODOLOGIA E RESULTADOS

A metodologia, bem como os resultados, serão apresentados na forma de 4 capítulos, conforme informações abaixo:

Capítulo 1 - Artigo: “Uma revisão das técnicas de detecção molecular de *Treponema pallidum*, qual a mais eficaz”.

Situação: Publicado na Revista *Research, Society and Development*, v. 10, n. 9, 2021 | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i9.18478>.

Capítulo 2 - Artigo: “Analysis of DNA extraction methods for detection of *Treponema pallidum*: a comparison of three methods”.

Situação: Publicado na Revista *Journal of Microbiological Methods*, v. 192, 2022 | ISSN 0167-7012 | DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106383>.

Capítulo 3 - Artigo: “Detecção de *Treponema pallidum* em amostras de sangue fixadas em cartão para diagnóstico da sífilis congênita”.

Situação: Publicado na Revista *Research, Society and Development*, v. 10, n. 10, 2021 | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i10.19151>.

Capítulo 4 - Artigo: “Detection and Molecular typing of *Treponema pallidum* isolates from southern Brazil: Frequent high of macrolide resistance”.

Situação: Em elaboração.

O artigo relacionado ao tema publicado durante o período do doutorado está em anexo.

Anexo A: Artigo Publicado na Revista *Brazilian Journal of Development*. ISSN: 2525-8761 54921, Curitiba, v.7, n.6, p. 54921-54934 jun. 2021. “Análise da infecção por *Chlamydia trachomatis* e fatores associados em mulheres portadoras do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e alto índice de coinfeção por Papilomavírus humano (HPV) no Maranhão”. DOI:10.34117/bjdv7n6-069.

4.1 CAPÍTULO 1 - ARTIGO: “UMA REVISÃO DAS TÉCNICAS DE DETECÇÃO MOLECULAR DE *Treponema pallidum*, QUAL A MAIS EFICAZ”.

Uma revisão das técnicas de detecção molecular de *Treponema pallidum*, qual a mais eficaz

A review of *Treponema pallidum* Molecular Detection Techniques, which is the most effective

Una revisión de las técnicas de detección molecular de *Treponema pallidum*, que es la más efectiva

Recebido: 20/07/2021 | Revisado: 26/07/2021 | Aceito: 27/07/2021 | Publicado: 03/08/2021

Vera Mileide Trivellato Grassi

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0987-5084>

Universidade Luterana do Brasil, Brasil

E-mail: vmgrassi@hotmail.com

Liliane Trivellato Grassi

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0768-943X>

Universidade Brasil, Brasil

E-mail: lilianegrassi@hotmail.com

Maria Lucia Rosa Rossetti

Universidade Luterana do Brasil, Brasil

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9672-9394>

E-mail: maria.rossetti@ulbra.br

Resumo:

A sífilis é uma doença polimórfica, infectocontagiosa e sistêmica, causada pela bactéria *T. pallidum*, considerada um agravo de notificação compulsória. O diagnóstico precoce é um fator importante no seu controle, este é realizado combinando achados clínicos e exames laboratoriais. As técnicas moleculares ajudam no diagnóstico, no entanto, não se tem um consenso sobre qual técnica é a mais adequada, estudos apresentam divergências como, qual gene deve ser usado como alvo, qual sequência dos primers, método de extração e tipo de amostra. Esta revisão procurou investigar com base nas evidências científicas, as técnicas moleculares mais eficazes na detecção de DNA de *Treponema pallidum*. Para tanto, realizou-se uma revisão sistemática da literatura realizada nas bases de dados PubMed, Science Direct e Lilacs, através dos descritores “sífilis” and “PCR and “diagnóstico” and “biologia molecular”, selecionando trabalhos publicados nos últimos dez anos. A amostra foi composta por 10 artigos. Quanto ao desenho de estudo, o ensaio clínico foi 100% prevalente. Quanto ao método utilizado foi evidenciado variações, 6 utilizaram PCR Nested, 5 PCR em tempo real e 4 PCR convencional, 5 utilizam mais de uma variação. A diferença entre elas, como, tempo para avaliar uma reação, chance de contaminação, reprodutibilidade, especificidade, sensibilidade, precisão e acurácia diagnóstica, mostrou que os dois genes de maior interesse são o *pol A* e o *tpp47*. Os testes moleculares em especial o PCR nested demonstrou ser promissor tendo boa sensibilidade e especificidade no diagnóstico da sífilis em conjunto com a sorologia para evitar complicações clínicas e transmissão da doença.

Palavras-chave: Sífilis; PCR; Diagnóstico; Biologia molecular.

Abstract:

Syphilis is a polymorphic, infectious and systemic disease, caused by the bacteria *T. pallidum*, considered a disease of compulsory notification. Early diagnosis is an important factor in its control, this is performed by combining clinical findings and laboratory tests. Molecular techniques help in the diagnosis, however, there is no consensus on which technique would be the most appropriate, because studies present divergences such as which gene should be used as target, what sequence of primer, extraction method and type of sample. This review sought to investigate, based on scientific evidence, the most effective molecular techniques in the detection of *T. pallidum* DNA. Therefore, a systematic review of the literature was conducted in the PubMed, Science Direct and Lilacs databases, using the descriptors "syphilis" and "PCR" and "diagnosis" and "molecular biology", selecting works published in the last ten years. The sample consisted of 10 articles. As for the study design, the clinical trial was 100% prevalent. As for the method used, variations were evidenced, 6 used Nested PCR, 5 real-time PCR and 4 conventional PCR, 5 used more than one variation. The difference between them, such as time to evaluate a reaction, chance of contamination, reproducibility, specificity, sensitivity, precision and diagnostic accuracy, showed that the two genes of greatest interest are *pol A* and *tpp47*. Molecular tests, in particular nested PCR, proved to be promising, with good sensitivity and specificity in the diagnosis of syphilis together with serology to avoid clinical complications and disease transmission.

Keywords: Syphilis; PCR; Diagnosis; Molecular biology.

Resumen:

La sífilis es una enfermedad polimórfica, infecciosa y sistémica, causada por la bacteria *T. pallidum*, considerada una enfermedad de notificación obligatoria. El diagnóstico precoz es un factor importante en su control, que se realiza combinando hallazgos clínicos y pruebas de laboratorio. Las técnicas moleculares ayudan en el diagnóstico, sin embargo, no existe consenso sobre qué técnica es la más adecuada, los estudios muestran divergencias como qué gen debe usarse como diana, qué secuencia de cebador, método de extracción y tipo de muestra. Esta revisión buscó investigar, con base en evidencia científica, las técnicas moleculares más efectivas para detectar el ADN de *T. pallidum*. Por ello, se realizó una revisión bibliográfica sistemática en las bases de datos PubMed, Science Direct y Lilacs, utilizando los descriptores "sífilis" y "PCR" y "diagnóstico" y "biología molecular", seleccionando trabajos publicados en los últimos diez años. La muestra estuvo formada por 10 artículos. En cuanto al diseño del estudio, el ensayo clínico tuvo una prevalencia del 100%. En cuanto al método utilizado, se evidenciaron variaciones, 6 utilizaron PCR anidada, 5 PCR en tiempo real y 4 PCR convencional, 5 utilizaron más de una variación. La diferencia entre ellos, como el tiempo para evaluar una reacción, la probabilidad de contaminación, la reproducibilidad, la especificidad, la sensibilidad, la precisión y la exactitud diagnóstica, mostró que los dos genes de mayor interés son *tpA* y *tp47*. Las pruebas moleculares, en particular la PCR anidada, demostraron ser prometedoras, teniendo buena sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la sífilis junto con la serología para evitar complicaciones clínicas y la transmisión de la enfermedad.

Palabras clave: Sífilis; PCR; Diagnóstico; Biología Molecular.

1. Introdução

A sífilis adquirida é uma doença polimórfica, infectocontagiosa e sistêmica, causada pela bactéria *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*. Suas principais vias de transmissão são a sexual e a vertical. Sinais clínicos comuns como as lesões cutaneomucosas das fases primária ou secundária, a sífilis adquirida pode acarretar manifestações graves e irreversíveis. Além das consequências diretas, há extensa evidência que a sífilis facilita o risco de transmissão do HIV, seja por representar um marcador de comportamentos de risco para sua transmissão, seja pelo aumento da transmissibilidade decorrente da quebra da barreira cutânea e da presença de células inflamatórias ao nível das lesões cutaneomucosas (Lafond & Lukehart, 2006; Carlson & Dabiri & Cribier & Sell, 2011; Cohen & Klausner & Engelman & Philip, 2013; Taylor & Li & Skinner & Mickey, 2014).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), com base nos dados de prevalência de 2009 a 2016, estimou o total de 376,4 milhões de Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs) curáveis, sendo que desses 6,3 milhões de casos eram de sífilis (WHO, 2020). No Boletim Epidemiológico de 2019, pode-se observar que a sífilis adquirida é considerada como agravamento de notificação compulsória desde 2010, teve sua taxa de detecção aumentada de 59,1 casos (por 100.000 habitantes) em 2017, para 75,8 casos em 2018. A prevalência da doença em gestantes e seus desfechos desfavoráveis, baseadas em dados coletados em 97 países, é de aproximadamente 1,36 milhão de casos de mulheres que apresentaram sífilis ativa durante a gestação, sendo que, uma grande proporção delas não recebeu tratamento ou se recebeu, foi de maneira inadequada (Brasil, 2019; Korenromp et al., 2019).

O *T. pallidum* pertence ao gênero *Treponema*, da ordem das *Spirochaetales* que se subdivide em duas famílias: *Spirochaetaceae* e *Leptospiraceae*. A Família das *Spirochaetaceae* possui sete gêneros, mas apenas com três de interesse na medicina, o *Treponema*, a *Borrelia* e a *Leptospira* (Castro, 2004; Castro et al., 2009; Brasil, 2016). O *T. pallidum* é um microrganismo não cultivável o que impossibilita o seu isolamento e dificulta o diagnóstico laboratorial (Ageron et al., 2009). Assim, o diagnóstico da sífilis é realizado combinando achados clínicos e exames laboratoriais que variam conforme cada fase da doença (Brasil, 2016).

Os métodos mais utilizados para diagnóstico são divididos em métodos sorológicos também conhecidos como indiretos, baseados na detecção de anticorpos (métodos não treponêmicos e treponêmicos) e métodos diretos, baseados na detecção da bactéria como a Microscopia de Campo Escuro (MCO), a imunofluorescência direta e os testes moleculares (Brasil, 2015; Brasil, 2016; Castro et al., 2016; Pereira et al., 2019).

Esta bactéria, tem um único cromossomo circular de 1.138.006 pb, com 92,2% do genoma que apresenta 1.041 sequências codificadoras e com um conteúdo de 52.8% de C/G (Fraga & Goldini, 2014). Os dois genes mais utilizados como alvo, para realizar o diagnóstico por biologia molecular são o *pol A* e o *tpp47*, que codificam a DNA polimerase e uma proteína de membrana envolvida na síntese da parede celular respectivamente (Liu & Rodes & Chen & Steiner, 2001; Ageron et al., 2015; Theel & Katz & Pillay, 2020).

Nos últimos anos houve uma verdadeira explosão de novas técnicas para o diagnóstico de diversas patologias através da análise do Material Genético, e a biologia molecular está tendo cada vez mais um papel importante no diagnóstico. Atualmente, pode-se analisar sequências de DNA simultaneamente, ou seja, fazer um perfil dos genes de um tipo celular (Brischetto & Gassiep & Whiley & Norton, 2018; Theel et al., 2020).

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica muito usada, apesar de estar sendo aperfeiçoada a cada dia, existem várias metodologias, algumas são praticamente toda automatizada e pode ser realizada em Tempo Real. Esta PCR em tempo real é uma plataforma que diminui o tempo e os riscos de contaminações e ainda pode ser associada a outras técnicas (Theel et al., 2020; Lou & Xie & Liao, 2021).

No caso da sífilis, estudos sobre o *T. pallidum* são bem complexos, e ferramentas moleculares se tornam muito úteis para a determinação da diversidade e epidemiologia das infecções. Além de ter o potencial de aprimorar o tratamento clínico, os métodos de prevenção e controle também podem contribuir para o melhor entendimento sobre aquisição e transmissão da sífilis (Shukalek et al., 2021).

No entanto, ainda não se tem uma técnica padrão, existem vários artigos publicados que divergem sobre as diferentes técnicas moleculares, qual gene deve ser usado como alvo, hoje os principais são **tp0105*, **tpp15*, **tpp47* e **tp1016* e quais as sequências de primers para cada gene. Também não há consenso sobre quais os métodos de extração do DNA devem ser utilizados e sobre o tipo de amostra a ser utilizada. A quantidade de alvos utilizados tende a variar de 1 a 3 genes. A maior parte desses testes utilizam sequências iniciadoras para genes que codificam lipoproteínas de membranas, e visam as regiões geneticamente conservadas, os quais têm sido clonados e sequenciados (Castro, 2004; Ageron et al., 2015; Theel et al., 2020; Shukalek et al., 2021).

O presente trabalho tem como objetivo investigar com base nas evidências científicas, as técnicas moleculares mais eficazes na detecção de DNA de *Treponema pallidum*.

Para o alcance do objetivo proposto buscou-se identificar os métodos e os genes que são categóricos na detecção do DNA de *Treponema pallidum* e apresentar a sensibilidade e especificidade dos melhores métodos a fim de se conhecer o mais eficaz para o diagnóstico molecular da sífilis pois até o momento não se tem uma técnica padrão.

2. Metodologia

2.1 Tipo de Estudo

O presente estudo trata-se de uma revisão sistemática da literatura científica. Segundo Galvão & Sawada & Trevizan (2004) e Galvão & Pereira (2014) este tipo de estudo é um dos muitos recursos metodológicos utilizados para integrar as informações de estudos independentes, realizados separadamente, sendo uma forma de sintetizar as informações disponíveis em dado momento, sobre uma questão específica, de forma objetiva e reproduzível, trabalham com a mesma base temática, uma vez que identifica, analisa e reúne dados sobre um determinado assunto.

2.2 Etapas do Estudo

2.2.1 Problema

Qual das variações na técnica de PCR é mais eficaz na detecção de DNA de *Treponema pallidum*?

2.2.2 Locais de busca

2.2.2.1 Seleção das fontes

Para seleção e coleta de material bibliográfico a pesquisa foi conduzida nas bases de dados eletrônicas: Literatura Latino-Americana do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) e Scientific Electronic Library Online (SCIELO), US National Library of Medicine National Institutes of Health (PUBMED) e SCIENCE DIRECT. As buscas para a coleta de dados secundários, foram realizadas no período de junho de 2021.

2.2.2.2 Definição dos descritores / Palavras-chaves / Strings

A coleta de dados secundários, triagem e seleção do material bibliográfico foram realizadas por mais de dois pesquisadores, para evitar possíveis vieses de seleção. Foram eleitos artigos com relevância clínica e científica, usando o operador lógico “AND” para combinação dos descritores utilizados para rastreamento das publicações. Os campos utilizados para a pesquisa foram: título, resumo e assunto. Para literatura nacional foram utilizados os Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) e para o internacional o Medical Subject Headings (MeSH). Os descritores utilizados respectivamente foram: DeCS: sífilis, PCR, diagnóstico e biologia molecular; MeSH: syphilis, PCR, diagnosis e molecular biology.

A combinação dos termos utilizados como DeCS e MeSH para busca dos artigos foram: a) Sífilis and PCR; b) Sífilis and biologia molecular; c) Sífilis and PCR and diagnóstico; d) Sífilis and PCR and diagnóstico and biologia molecular; e) Syphilis and PCR; f) Syphilis and molecular biology; g) Syphilis and PCR and diagnosis; h) Syphilis and PCR and diagnosis and molecular biology.

2.2.2.3 Critérios de inclusão e exclusão

Para a seleção das fontes, foram considerados como critério de inclusão:

1. Artigos indexados nas bases de dados a partir dos descritores (DeCS): sífilis, PCR, diagnóstico e biologia molecular e MeSH: syphilis, PCR, diagnosis e molecular biology;
2. Foram selecionados os artigos publicados nos idiomas português, espanhol e inglês que dissertam sobre a patologia sífilis e as técnicas moleculares utilizadas;
3. Estudos disponíveis em texto completo e originais, publicados nos últimos dez anos.

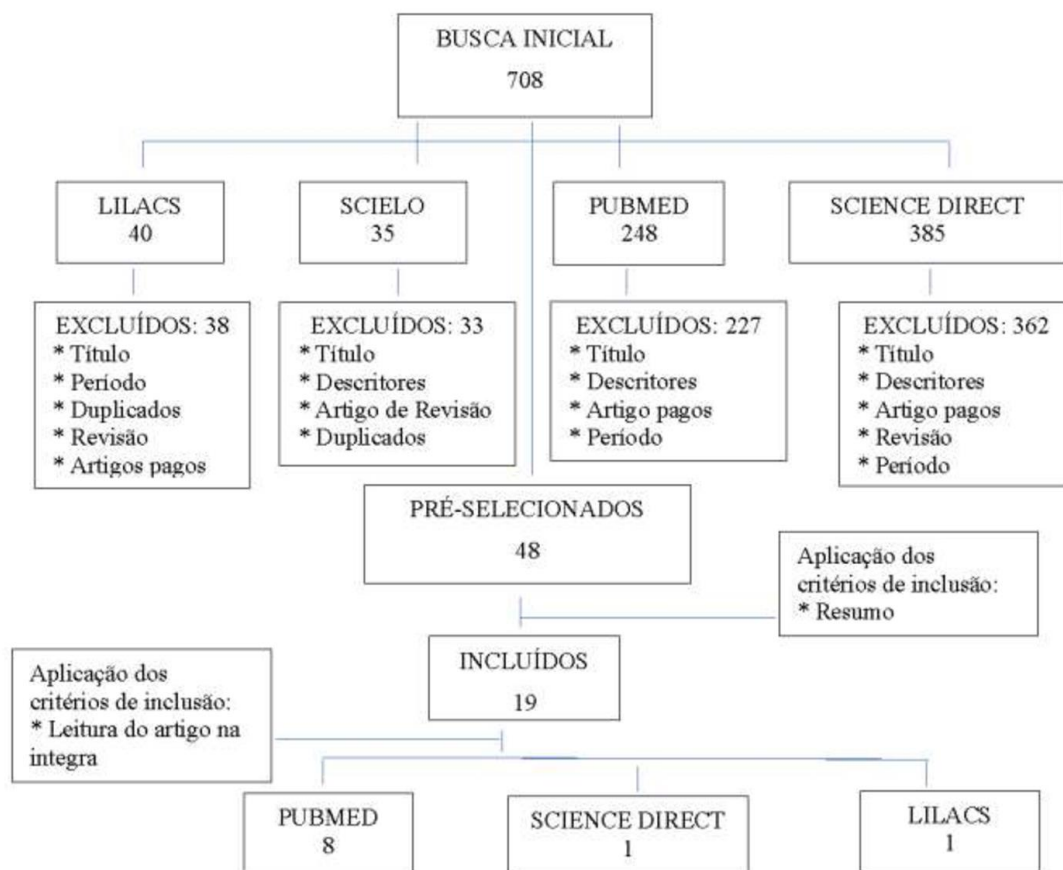
Como critérios de exclusão foram: artigos que após a leitura e análise crítica não atendam a questão norteadora; artigos que não atendam o período estimado de busca de dados; publicações não disponíveis em texto completo; artigo em duplicidade, revisões e outros formatos (tese, manuais, protocolo etc.).

2.2.2.4 Estratégia de busca e seleção e análise dos artigos

Após a realização da estratégia de busca nas referidas bases de dados, foram encontrados 708 estudos por meio de uma leitura analítica dos títulos. Optou-se por não incluir artigos de revisão, teses, dissertações e monografias, buscando contemplar maior nível de evidência. Do total de artigos científicos, 40 artigos (LILACS), 35 artigos (SCIELO), 248 artigos (PUBMED) e 385 artigos (SCIENCE DIRECT). Após a discriminação dos qualitativos pelas bases de dados, foi feita uma análise do resumo, adequação ao tema da revisão, exclusão de artigos pagos ou de revisão, exclusão dos que não estavam no período selecionado e que não se enquadravam dentro dos descritores e foram então selecionados 48 artigos científicos. Após organização das ideias e leitura dos artigos na íntegra, a amostra final consistiu em 10 artigos científicos que atenderam aos critérios de elegibilidade propostos, sendo 8 da PUBMED, 1 da SCIENCE DIRECT e 1 da LILACS. O resumo do processo de coleta, análise e seleção dos artigos incluídos na amostra desta pesquisa segue apresentado na Figura 1.

Todos os trabalhos escolhidos nesta etapa obtiveram ordem de importância conforme os critérios pré-determinados, na sequência foi realizada a sintetização dos resultados da pesquisa.

Figura 1 – Fluxograma de coleta, análise e seleção dos artigos para o desenvolvimento da pesquisa, Cáceres - Mato Grosso, Brasil, 2021.



Fonte: Autores.

3. Resultados e Discussão

Na Tabela 1, está apresentado o perfil dos artigos selecionados para esta análise. O perfil descrito refere-se às variáveis: ano de publicação; revista/periódico; local da pesquisa e caracterização do delineamento/desenho de estudo. Conforme observado na Tabela 1 entre os dez artigos analisados, a PUBMED teve maior destaque como base de dados tendo 80% das publicações indexadas (Tabela 1).

Quanto ao desenho de estudo, todos os estudos selecionados eram de ensaio clínico, sendo 3 prospectivo, 2 retrospectivo e 1 observacional. Observou-se que, em relação ao qualis 70% são A e 20% B, mostrando excelente nível de qualidade nos artigos relacionados com objeto de pesquisa, somente 1 não possui qualis significativo.

Quanto ao segmento temporal das publicações foi de 2012 a 2021, tendo os anos de 2019 e 2020 os maiores destaques (40%) e os demais anos todos com apenas 10% de publicação cada. Ainda conforme dados da tabela 1, constatou-se que 40% das publicações foram originadas da França e China, e as demais publicações também são de fora do Brasil, mostrando que ainda temos muito que evoluir nas tecnologias moleculares.

Tabela 1 – Perfil dos artigos analisados segundo ano de publicação, autores, revista, base de dados, Qualis, local (Estado/região) e desenho de estudo, Cáceres-Mato Grosso, Brasil, 2021.

nº	Ano	Autores	Revista/Periódico	Base de dados	Qualis	País	Ensaio Clínico
A1	2012	Grange et al	Journal of Clinical Microbiology	PubMed	A2	Paris - França	Prospectivo
A2	2014	Glatz et al	Clinical Microbiology and Infection	Sicenc Ditect	A1	Zurique - Suíça	Prospectivo
A3	2015	Pinilla & Chaverro & Moreno & Navarrete & Muñoz	Nova	Lilacs		Bogotá- Colômbia	Ensaio clínico
A4	2016	Castro et al	Journal of Clinical Laboratory Alalysis	PubMed	B1	Lisboa - Portugal	Ensaio clínico
A5	2018	Wang et al	Emerging Microbes & Infections	PubMed	A1	Shanghai - China	Ensaio clínico
A6	2019	Noda & Rodriguez & Grillová & Bosshard & Lienhard	International Journal of STD & AIDS	PubMed	B1	Havana - Cuba	Observacional / Prospectivo
A7	2019	Zhang et al	Sexually Transmitted Diseases	PubMed	A4	Guangzhou - China	Ensaio clínico
A8	2020	Grange et al	Journal Of Clinical Microbiology	PubMed	A2	Paris – França	Ensaio clínico
A9	2020	Vrbova et al	Plos One	PubMed	A1	Brno – República Tcheca	Retrospectivo
A10	2021	Shukalek et al	Frontier in Cellular and Infection Microbiology	PubMed	A1	Alberta - Canadá	Retrospectivo

Fonte: Autores.

Comparando os anos de 2012 a 2021, notou-se um aumento dos números de pesquisas relacionadas às técnicas moleculares na detecção de DNA. De 2012 a 2019 havia mais estudos prospectivos, onde se trabalhava com o desfecho que ainda não ocorreu, quando comparado ao ano de 2020, que demonstra uma mudança passando a estudar o paciente a partir de um desfecho, o que enfatiza a credibilidade nos dados de registros do passado, em relação a exposição do fator e/ou a sua intensidade.

Na Tabela 2, foram incluídas as particularidades dos estudos referente ao método utilizado nas pesquisas, o público-alvo do estudo, o método de coleta, os genes utilizados e o principal desfecho.

Tabela 2 – Características dos artigos selecionados, segundo cenário, público-alvo, método de coleta, método utilizado e gene utilizado, e sensibilidade e especificidade encontrada.

n°	Cenário	Público-alvo	Tipo de Amostra	Método Utilizado	Gene Utilizado	Desfecho
A1	Dois centros de DST em Paris – França	População com suspeita de sífilis e indivíduos saudáveis	Swabs de lesão, soro, plasma e sangue total	Neste PCR	Gene <i>tpp47</i> – mas usou dois pares de primers KO5 e KO3B e o Tpe e Tps	Em Swabs 82% sensibilidade e 95% especificidade Em plasma (18 e 92), soro (14,7 e 93) e sangue total (24 e 97)
A2	Departamento de Dermatologia, do Hospital Universitário de Zurique (Suíça)	População adulta com úlceras na região genital	Swabs de úlceras genitais, anais e orofaríngea	PCR em tempo real comparado com Sorologia e Microscopia de campo escuro	Primers desenhados para o gene <i>16S rRNA</i>	100% Sensibilidade 100% especificidade
A3	Departamento de Imunopatologia da Sífilis da Universidade de Washington	Recém-nascidos	Cordão Umbilical	PCR Convencional, PCR Nested, e PCR em tempo real	<i>pol A</i> , <i>16S rDNA</i> , <i>tpN47</i>	Alvo <i>tpN47</i> teve melhor sensibilidade e especificidade que os outros
A4	Instituto de Higiene e medicina Tropical	População com amostras positivas para sífilis	LCR	PCR convencional	<i>pol A</i> e <i>tpp47</i>	Mostrou que o <i>tpp47</i> é mais sensível (75,8% vs 69,7% do <i>pol A</i>), é o <i>pol A</i> foi mais específico 92,3% vs 86,8 do <i>tpp47</i>
A5	Clínica de Doenças Sexualmente Transmissíveis do Hospital de Doenças da Pele de Shanghai	População em diferentes estágios da sífilis	Sangue total	PCR convencional e PCR Nested	<i>pol A</i> e <i>tpp47</i>	228 amostras concordaram entre os PCR Nested dos dois genes. Mas a detecção foi muito baixa na sífilis latente
A6	Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK) – Havana, Cuba	População com úlceras ano genitais	Swab de úlceras anais e genitais	3 PCR em tempo real, 1 para cada gene	<i>pol A</i> , <i>tpp47</i> e <i>16S rDNA</i>	Comparou os três PCR com os exames sorológicos. Concordância entre sorologia e PCR foi de 52,3.
A7	Departamento ambulatorial de dermatologia ou doenças sexualmente transmissíveis de sete hospitais em Guangzhou – China	População com suspeita de sífilis de qualquer fase e um grupo controle	Swabs de Úlcera, sangue total, LCR, soro e sangue do lóbulo da orelha	PCR Nested em tempo Real	<i>pol A</i> Novos primers	Detectou 71,7% das amostras positivas para sífilis. Todas as amostras controles foram negativas.
A8	Em seis Centros de DST na França. Centro de Referência Nacional para DST's bacterianas no Hospital Cochin em Paris	População com úlceras genitais	Swabs de úlceras genitais	Kit comercial Alplex (PCR em tempo real para 7 ISTs) PCR Nested para Treponema	<i>tpp47</i> (primers Ko5 e Ko3B) e TPA (primers Tpe e Tps)	Quando comparados os dois testes PCR com diagnósticos sorológicos e clínicos da sífilis, obteve 80% de sensibilidade, 98,8% especificidade e Kappa =0,85
A9	Departamento Dermatovenerologia (Hospital da Faculdade St. Anne);	População suspeita de sífilis	Swabs de úlceras cutâneas, úlceras	PCR Nested, com touchdown	Alvos: TP0136, TP0548;	Sensibilidade de 72,3% e especificidade de 100% comparada

	Departamento Dermatovenerologia (Hospital da Faculdade Brno, Universidade de Masaryk); Departamento Dermatovenerologia (Universidade Charles) e Laboratório de Referência Nacional para Diagnóstico de Sífilis (Instituto Nacional de Saúde Pública)		orofaríngeas, úlceras ano genitais, úlceras sem localização, sangue total		TP0705, 23SrDNA, TP0319(<i>trpC</i>) TP0105(<i>pol A</i>)	com o diagnóstico do CDC.
A10	Dois grandes centros especialistas em DST de Alberta – Canadá	População adulta com lesões ano genitais	Lesões ano genitais	PCR	<i>pol A</i> e <i>trp47</i>	Encontrou sensibilidade de 49,3 e especificidade de 99,9

Fonte: Autores.

A partir da análise das informações obtidas, foi possível identificar que os dois genes de maior interesse para realizar o diagnóstico de *T. pallidum* por biologia molecular são o *pol A* e o *tpp47*. Nota-se que estes são os dois genes mais utilizados, embora exista outros genes alternativos usados com menos frequência, por exemplo o *16S rDNA* e TP0319 (*tmpC*). O *pol A* codifica a DNA polimerase I que está relacionada com o reparo e replicação do DNA e o *tpp47* codifica uma proteína de membrana citoplasmática envolvida na síntese da parede celular, ambos os genes estão presentes nos genomas de *T. pallidum* (Ageron et al., 2015).

Dos artigos selecionados os estudos A1, A3, A4, A5, A6, A8 e A10 defendem a utilização do gene *tpp47*, enquanto nos estudos A3, A4, A5, A6, A7 e A10 fazem uso do gene *pol A* e poucos estudos (A2, A3 e A6) fazem uso do gene *16S rDNA*, e apenas um estudo o A9 faz uso do TP0319. No entanto, observa-se que a maioria dos estudos utilizam mais de um gene, isto ocorre devido a uma não padronização da técnica.

O estudo A1 usou o PCR Nested especificamente para gene *tpp47* de *T. pallidum* utilizando amostra de sangue total, plasma, soro e swabs de lesão, em 294 pacientes com suspeita de sífilis e 35 voluntários saudáveis. As análises de amostras de swabs de lesão de pacientes com diagnóstico de sífilis e de pacientes sem sífilis tiveram boa sensibilidade (82%) e especificidade (95%) para a detecção do genoma de *T. pallidum* em pacientes com sífilis primária e secundária. Já no sangue total o genoma do *T. pallidum* apresentou uma baixa sensibilidade de 24%, mas uma boa especificidade (97%), o mesmo ocorreu com o plasma e o soro sensibilidade de 18 e 14,7 e especificidade de 92 e 93 respectivamente. Esta diferença na sensibilidade pode resultar do uso de um gene alvo diferente *tpp47* versus *pol A* e as condições em que o sangue total foi armazenado, pois já foi demonstrado que o congelamento das amostras pode afetar a sensibilidade.

O estudo A2 avaliou diferentes amostras (swabs de úlceras genitais, anais e orofaríngeas) de pacientes com suspeita de sífilis, buscando a detecção do *T. pallidum*, utilizou o PCR em tempo real comparando com microscopia em campo escuro e sorologia, o gene pesquisado foi o *16S rRNA*, observou-se que a sensibilidade e especificidade do PCR em tempo real foi de 100% para *T. pallidum*, quando comparado ao teste referência que é a microscopia de campo escuro. O PCR parece superior à sorologia nas infecções iniciais por *T. pallidum*.

Na pesquisa A3 os alvos moleculares (*pol A*, *16S rDNA*, *tpN47*) de microrganismo foram amplificados por meio de PCR convencional, PCR Nested e PCR em tempo real em amostras de cordão umbilical de recém-nascido. Os três genes apresentam resultados semelhantes por PCR convencional; no caso de PCR nested e PCR em tempo real, o gene *tpN47* exibiu maior sensibilidade e especificidade em comparação aos genes *pol A* e *16Sr DNA*, mostrando que o gene *tpN47* pode ser utilizado como alvo molecular para o diagnóstico imediato da sífilis congênita. Corroborando com o estudo acima Grange et al. (2012) utilizou o gene *tpN47* para o diagnóstico de Neurosífilis (SN) no LCR, em comparação com os testes diagnósticos estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), onde comprovou a capacidade do microrganismo de invadir o SNC durante os estágios primários da doença.

Estudo feito com o gene *tpN47*, deu origem a resultados promissores e assim desenvolveu um qPCR para detectar *T. pallidum* subsp. *pallidum* sem reatividade cruzada com treponemas da flora comum da pele ou com patógenos associados a infecções sexualmente transmissíveis (ISTs), para ser usado para detectar e quantificar o microrganismo em diferentes lesões e estágios da doença, constatando que na sífilis primária existe um grande número de microrganismos nas úlceras, mas um número baixo de cópias no sangue; na sífilis secundária ocorre aumento da bacteremia, enquanto na fase latente a bacteremia e a carga treponêmica são detectadas com menor frequência (Tipple et al., 2011).

Em A4 os pesquisadores realizaram duas técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) uma para cada gene (*pol A* e *tpp47*), para a detecção de DNA de *T. pallidum* no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com sífilis. Mostrou que o *tpp47* é mais sensível (75,8% vs 69,7% do *polA*) e o *pol A* foi mais específico 92,3% vs 86,8 do *tpp47*. Porém ainda há

dificuldades de se determinar qual é a melhor técnica a ser usada pois os resultados variam de acordo com o estágio da sífilis em especial na sífilis latente.

Além disso, o estudo A5 investigou o método PCR nested e o PCR convencional para os genes (*pol A* e *tpp47*) em amostras de sangue total de pacientes com diferentes fases da sífilis (primária, secundária e latente). O ensaio de PCR nested com os dois alvos (*pol A* e *tpp47*), detectou DNA *T. pallidum* em 53,6% e 62,9% dos pacientes com sífilis primária e secundária, respectivamente, o que foi muito superior aos níveis de detecção em pacientes com sífilis latente (7,4%). Indicando que o PCR nested é um método sensível para detectar DNA *T. pallidum* no sangue, especialmente em pacientes com sífilis primária e sífilis secundária. A pesquisa feita por A4 vem amparar o estudo A5, quanto ao benefício do PCR utilizando dois genes alvos (*pol A* e *tpp47*) para detecção de DNA de *T. pallidum* em pacientes com sífilis primária e secundária.

Até o momento, nenhum gene específico foi recomendado como um alvo padrão-ouro para PCR do *T. pallidum*. No entanto, os genes *tpp47* e *pol A* são os alvos mais promissores atualmente.

A6 avaliou o desempenho de 3 PCR uma para cada gene (*pol A*, *tpp47* e *16S rDNA*) e o teste sorológico de pacientes adultos com úlceras ano genitais. Os testes moleculares e a sorologia não se correlacionaram bem, obteve concordância de 52,3%. As sensibilidades dos ensaios de PCR (*pol A*, *tpp47* e *16S rDNA*) e sorologia (VDRL) foram 71,6%, 57,5%, 57,5% e 67,2% e especificidade de 100%, 100%, 100% e 86,4% respectivamente. A combinação de PCR e sorologia pode oferecer informações valiosas para o diagnóstico de sífilis em pacientes que apresentam úlcera ano genital, evitando complicações clínicas adicionais e transmissão da doença.

Isto está em contraste com o estudo de Brischeto et al. (2018), que afirma que o PCR para detectar *T. pallidum* acrescenta pouco valor clínico sobre a sorologia e para o diagnóstico de sífilis em determinados contextos clínicos. Em seu estudo mostraram que a maioria dos pacientes com PCR positivo para o *T. pallidum* também tiveram resultado positivo na sorologia para sífilis.

O estudo A7 investigou a viabilidade do PCR nested (dois pares de primers para o gene *pol A*) para identificar DNA de *T. pallidum* em diferentes amostras (Swabs de úlcera, sangue total, LCR, soro e sangue do lóbulo da orelha) de pacientes com sífilis em qualquer fase. Entre os tipos de sífilis, a maioria das amostras testadas com PCR nested mostrou resultado positivo para 71,7%, incluindo sangue do lóbulo da orelha (92,0%), líquido cefalorraquidiano (LCR) (90,2%), esfregaços de lesão (74,3%), soro (66,9%) e sangue total (64,2%). Não foram observadas diferenças significativas em amostras positivas para sangue total, soro e esfregaços de lesão entre a sífilis primária e secundária, porém houve diferença entre sífilis terciária, latente e neurosífilis. O PCR nested pode ser usado para identificar o DNA de *T. pallidum* de diferentes amostras de pacientes sífilíticos, mas a limitações como diferentes tamanhos de amostras.

Em outro estudo, A8 analisou o desempenho de duas técnicas, um novo ensaio PCR em tempo real comercial comparando com o ensaio de PCR nested, o DNA foi extraído de esfregaços genitais e mucosas coletados de pacientes com lesões mucocutâneas. O PCR em tempo real detectou o *T. pallidum* com uma sensibilidade de 80% e uma especificidade de 98,8%. Em comparação com o ensaio de PCR nested (*tpp47*) que teve uma sensibilidade de 84% e uma especificidade de 100%, a concordância entre os dois ensaios foi muito boa (92,5%). A sensibilidade dependeu da localização da lesão. Este resultado foi comparado com o padrão ouro, ou seja, diagnóstico final de sífilis com base no exame clínico e testes sorológicos. Mostrou que o ensaio PCR em tempo real é adequado para detectar *T. pallidum* em uso de rotina e facilita a detecção rápida simultânea de patógenos relevantes em um contexto de lesões suspeitas de sífilis. As análises feitas pelos estudos A4 e A5 corroboram com a pesquisa mostrando que a PCR nested é relevante para detecção da sífilis pois mostrou uma boa sensibilidade e especificidade.

A análise do estudo A9 foi realizada em população suspeita de sífilis em diferentes amostras, swabs de úlceras cutâneas, úlceras orofaríngeas, úlceras ano genitais, úlceras sem localização e sangue total, comparando com os métodos

sorológicos (não treponêmicos – RPR e treponêmicos - TPPA, ELISA e análise de Western Blot (WB) de IgM e IgG e com DNA de PCR usando alvos TP0136, TP0548, TP0705, genes 23SrRNA, TP0319 (*tmpC*) e TP0105 (*pol A*). Houve concordância de 59,6% entre os testes de sorologia e PCR para todo o conjunto de amostras. A Sensibilidade, especificidade para a sorologia foi de 89,3% e 100% e para PCR 72,3% e 100% respectivamente.

Esses resultados são comparáveis com os resultados relatados por Noda et al (2019), os dados revelaram que PCR e sorologia não se correlacionaram bem (concordância = 52,3%), mostrou que a combinação de PCR e sorologia pode oferecer informações valiosas para o diagnóstico de sífilis, evitando complicações clínicas adicionais e transmissão da doença.

Por fim, o resultado do estudo A10 realizado em população adulta de pacientes com lesões ano genitais, utilizando o método PCR e dois genes alvos diferentes (*pol A*, *tpp47*) versus sorologia, mostrou que a PCR apresentou sensibilidade de 49,3% e especificidade de 99,9%. Apesar da baixa sensibilidade do teste molecular para sífilis primária este é um teste altamente específico e útil na confirmação do diagnóstico e poderia ser utilizado não como um teste de triagem, mas sim utilizar os testes de sorologias simultâneos com o PCR pois poderiam garantir que todos os casos sejam identificados para gerenciar o agravamento da epidemia. O estudo A9 contribui com o estudo mostrando que a PCR é vantajosa na confirmação do diagnóstico de sífilis e assim evitar a sua transmissão.

4. Considerações Finais

Em uma análise geral dos artigos, observam-se variações da mesma técnica, com a utilização de genes alvos e material de amostra diferenciado, o que demonstra que a pesquisa na biologia molecular tem evoluído e que os pesquisadores estão tentando padronizar um método mais adequado, válido para o diagnóstico de sífilis.

No que se refere aos genes mais empregados como alvo, destacam-se o *pol A* e o *tpp47* estes por serem de regiões conservadas no genoma do *T. pallidum*, dessa maneira, apresentam melhor aplicabilidade no diagnóstico da sífilis.

Em relação aos testes moleculares o ensaio PCR nested demonstrou ser promissor tendo boa sensibilidade e especificidade no diagnóstico da sífilis primária e secundária em conjunto com a sorologia para evitar complicações clínicas e transmissão da doença, dessa forma impedir o agravamento da epidemia.

Referências

- Ageron, A. G., Laurent, F., Schrenzel, J., Charton, B., Getaz, G. J., Tangomo, M., Tristan, B., Sednaoui, P., Lautenschlager, S., Trellu, L. T., Tejada, B. M., Cavassini, M., Emonet, S., Perneger, T., Salord H. (2015). Performance of the 47 kilodalton membrane protein versus DNA Polymerase I genes for detection of *Treponema pallidum* by PCR in ulcers. *Journal of Clinical Microbiology*. Mar;53(3):976-80. DOI: 10.1128/JCM.03444-14
- Ageron, A. G., Ninet, B., Trellu, L. T., Lautenschlager, S., Furrer, H., Piquet, V., Schrenzel, J., Hirschel, B. (2009). Assessment of a Real Time PCR to Diagnose Syphilis from diverse biological sample. *Sexually Transmitted Infections*. Ago;85(4):264-9. DOI: 10.1136/sti.2008.034314
- Brasil, M.d.S. (2016). Manual Técnico para o Diagnóstico da Sífilis. - PNCQ.
- Brasil, M.d.S. (2019). Boletim Epidemiológico da Sífilis.
- Brasil, M. D. S. (2015). Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecção Sexual Transmissível.
- Brischetto, A., Gassiep, I., Whiley, D., Norton, R. (2018). Retrospective review of *Treponema pallidum* PCR and serology results: are both tests necessary? *Journal of Clinical Microbiology*. p.1-7, v.56 n.5. 56:e01782-17. DOI: 10.1128/JCM.01782-17.
- Carlson, J.A., Dabiri, G., Cribier, S., Sell, S. (2011). The immunopathobiology of syphilis: the manifestations and course of syphilis are determined by the level of delayed-type hypersensitivity. *The American Journal of Dermatopathology*. Jul;33(5):433-460. DOI: 10.1097/dad.0b013e3181e8b587
- Castro MRTd. (2004). Contribuição para o estudo da infecção por *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*: Resposta sorológica, Diagnóstico Molecular e Genotipagem. Dissertação de Doutorado. Lisboa - Portugal (LISBOA): Universidade Nova Lisboa.
- Castro, R., Águas, M. J., Batista, T., Araújo, C., Mansinho, K., Pereira, F.d.L. (2016). Detection of *Treponema pallidum* Sp. *Pallidum* DNA in Cerebrospinal Fluid (CSF) by Two PCR Techniques. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. Sep;30(5):628-32. DOI: 10.1002/jcla.21913. Epub 2016 Feb 18. PMID: 26892231; PMCID: PMC6807054.
- Castro, R., Prieto, E., Águas, M. J., Manata, M. J., Botas, J., Pereira F. M. (2009). Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Lisbon,

- Portugal. Journal of Clinical Microbiology. Aug;47(8):2510-2. DOI: 10.1128/JCM.00287-08. Epub 2009 Jun 3. PMID: 19494073; PMCID: PMC2725690.
- Cohen, S. E., Klausner, J. D., Engelman, J., Philip, S. (2013). Syphilis in the modern era: an update for physicians. Infectious Disease Clinics of North America. Dec;27(4):705-22. DOI: 10.1016/j.idc.2013.08.005. PMID: 24275265.
- Fraga, D. D. ., & Goldini, L. Z. (2013). Detecção do *Treponema pallidum* em Líquido Cefalorraquidiano LCR pela reação em cadeia de polimerase PCR em pacientes HIV positivos assintomáticos com diagnóstico de sífilis latente. Dissertação para título de Mestre. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Galvão, C. M., Sawada, N. O., Trevizan, M. A. (2004). Revisão Sistemática: Recurso que proporciona a incorporação das evidências na prática da enfermagem. Revista Latino-americana Enfermagem, 12(3):549-56. DOI: 10.1590/S0104-11692004000300014
- Galvão, T. F., Pereira, M. G. (2014). Revisões sistemáticas da literatura: passos para sua elaboração. Epidemiologia e. Serviços de Saúde. 23 (1):183-184. DOI:10.5123/S1679-49742014000100018.
- Glatz, M., Juricevic, N., Altwegg, M., Bruisten, S., Komericki, P., Lautenschlager, S., Weber, R., Bosshard, P. P. (2014). 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. Clinical Microbiology Infection. Dec;20(12):O1020-7. DOI: 10.1111/1469-0691.12710. Epub 2014 Jul 25. PMID: 24909546.
- Grange, P. A., Gressier, L., Dion, P. L., Farhi, D., Benhaddou, N., Gerhardt, P., Morini, J. P., Deleuze, J., Pantoja, C., Bianchi, A., Lassau, F., Avril, M. F., Janier, M., Dupin, N. (2012). Evaluation of a PCR test for detection of *treponema pallidum* in swabs and blood. Journal of Clinical Microbiology. Mar;50(3):546-52. DOI: 10.1128/JCM.00702-11. Epub 2012 Jan 4. PMID: 22219306; PMCID: PMC3295187.
- Grange, P. A., Jary, A., Isnard, C., Burrell, S., Boutolleau, D., Touati, A., Bébér, C., Saule, J., Martinet, P., Robert, J. L., Moulène, D., Vermersch-Langlin, A., Benhaddou, N., Janier, M., Dupin, N. (2021). Use of a Multiplex PCR Assay To Assess the Presence of *Treponema pallidum* in Mucocutaneous Ulcerations in Patients with Suspected Syphilis. Journal of Clinical Microbiology. Jan 21;59(2):e01994-20. doi: 10.1128/JCM.01994-20. PMID: 33177120; PMCID: PMC8111117.
- Korenromp, E. L., Rowley, J., Alonso, M., Mello, M.B., Wijesooriya, N. S., Mahiné, S.G., Ishikawa, N., Le, L. V., Newman-Owiredo, N., Nagelkerke, N., Newman, L., Kamb, M., Broutet, N., Taylor, M. M. (2019). Global burden of maternal and congenital syphilis and associated adverse birth outcomes—Estimates for 2016 and progress since 2012. PLoS One. 14(7):1-17. DOI:10.1371/journal.pone.0219613.
- Lafond, R. E., Lukehart, S. A. (2006). Biological basis for syphilis. Clinical Microbiology Reviews. Jan;19(1):29-49. DOI: 10.1128/CMR.19.1.29-49.2006. PMID: 16418521; PMCID: PMC1360276.
- Liu, H., Rodes, B. Chen, C. Y., Steiner, B. (2001). 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. Journal of Clinical Microbiology. May;39(5):1941-6. DOI: 10.1128/JCM.39.5.1941-1946.2001. PMID: 11326018; PMCID: PMC88053.
- Luo, Y., Xie, Y., Xiao, Y. (2021). Laboratory diagnostic tools for syphilis: Current status and future prospects. Frontiers in cellular and infection microbiology. 8 de fevereiro de 2021;10:574806. DOI: 10.3389/fcimb.2020.574806. 33628742; PMCID: PMC7897658.
- Noda, A. A., Rodríguez, I., Grillová, L., Bosshard, P. P., Lienhard, R. (2019). Accuracy of PCR and serological testing for the diagnosis of primary syphilis: Both tests are necessary. International Journal of STD & AIDS. 30: 1087–1094. DOI:10.1177/0956462419859764
- Pereira, J. B., Barbosa Júnior, W. L., Silva, E. D., Aquino, A. E. C. A., Oliveira, P. M. S., Melo, F. L. (2019). Comparação de técnicas de extração de DNA de *Treponema Pallidum* para o diagnóstico molecular da sífilis. Brazilian Journal of Health Review. Curitiba, v. 2, n. 4, p. 3681-3697. DOI:10.34119/bjhrv2n4-131
- Pinilla, G. B., Chavarro, B. P., & Moreno, M. A., Navarrete, J. O., Muñoz, L. M. (2015). Determinación de los genes, *16S ADNr*, *polA*, y *TpN47*, em la detección de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* para el diagnóstico de sífilis congénita. NOVA. 13 (23): 17-25.
- Shukalek, C. B., Lee, B., Fathima, S., Chu, A., Fonseca, K., Somayaji, R. (2021). Comparative Analysis of Molecular and Serologic Testing for Primary Syphilis: A Population-Based Cohort Study. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 11:579660. DOI: 10.3389/fcimb.2021.579660
- Taylor, M. M., Li, W. Y., Skinner, J., Mickey, T. (2014). Viral loads among young HIV-infected men with early syphilis. Journal of the International Association Providers AIDS Care. Nov-Dec;13(6):501-5. DOI: 10.1177/2325957414536229. Epub 2014 Jun 4. PMID: 24899260; PMCID: PMC6754093.
- Theel, E. S., Katz, S. S., Pillay, A. (2020). Molecular and direct detection Tests for *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*: A review of the literature, 1964-2017. Clinical Infectious Diseases. Jun 24;71(Suppl 1):S4-S12. DOI: 10.1093/cid/ciaa176. 32578865; PMCID: PMC7312206.
- Tipple, C., Hanna, M. O. F., Hill, S., Daniel, J., Goldmeie, D., McClure, M., Taylor, G. P. (2011). Getting the measure of syphilis: qPCR to better understand early infection. Sexually Transmitted Infections p. 479-485, v. 87, n.6. DOI:10.1136/sti.2011.049494
- Vrbová, E., Mikalová, L., Grillová, L., Pospíšilová, P., Strnad, R., Dastychová, E., Kojanová, M., Kreidlová, M., Vačousová, D., Rob, F. & Procházka, P., Krchěáková, A., Vaško, V., Woznicová, V., Dvořáková Herová, M., Kuklová, I., Zákoucká, H., Šmajš, D. (2020). A retrospective study on nested PCR detection of syphilis treponemes in clinical samples: PCR detection contributes to the diagnosis of syphilis in patients with seronegative and serodiscordant results. PLoS One. Ago 20;15(8):e0237949. DOI: 10.1371/journal.pone.0237949. 32817658; PMCID: PMC7446855.
- Wang, C., Cheng, Y., Liu, B., Wang, Y., Gong, W., Qian, Y., Guan, Z., Lu, H., & Gu, X., Shi, M., Zhou, P. (2018). Sensitive detection of *Treponema pallidum* DNA from the whole blood of patients with syphilis by the nested PCR assay. Emerging Microbes & Infections. May 9;7(1):83. DOI: 10.1038/s41426-018-0085-2. Erratum in: Emerging Microbes & Infections. 2020 Dec;9(1):1174. PMID: 29739928; PMCID: PMC5940865.
- World Health Organization Global adult estimates of chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis including maternal and congenital syphilis, 2016, Geneva, WHO; 2020, 76p.
- Zhang, Y., Dai, X., Ren, Z., Lin, H., Cao, W., Ye, X. (2019). A Novel Nested Real-time Polymerase Chain Reaction for *Treponema pallidum* DNA in Syphilis Biospecimens. Sexually Transmitted Diseases. Jan;46(1):41-46. DOI: 10.1097/OLQ.0000000000000908. PMID: 30247262.

4.2 CAPÍTULO 2 - ARTIGO: “ANALYSIS OF DNA EXTRACTION METHODS FOR
DETECTION OF *Treponema pallidum*: A COMPARISON OF THREE METHODS”.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmethAnalysis of DNA extraction methods for detection of *Treponema pallidum*: A comparison of three methodsVera Mileide Trivellato Grassi^{a,*}, Mauro Cunha Ramos^{b,f}, Liliane Trivellato Grassi^c,
Marcia Susana Nunes Silva^{d,g}, Maria Lucia Rosa Rossetti^e^a PhD student of Cellular and Molecular Biology Applied to Health in the Post-Graduate Health Program (PPGBiosáude), Lutheran University of Brazil (ULBRA), Canoas, Brazil^b Master's degree in Public Health, University of California, San Francisco, United States of America^c PhD student of Biomedical Engineering, Brazil University, Brazil^d PhD in Biological Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil^e PhD in Biological Sciences and Professor of the Cellular and Molecular Biology Applied to Health in the Post-Graduate Health Program (PPGBiosáude), Lutheran University of Brazil (ULBRA), Canoas, Brazil^f PhD in Dermatology, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil^g DNTech-Development of New Technologies LTDA, FINEP/FAPERGS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

DNA

Extraction

Treponema pallidum

ABSTRACT

Syphilis is a sexually transmitted disease caused by *Treponema pallidum*. DNA amplification methods have started to be used to facilitate diagnosis at different stages of the disease. The success of such methodologies depends on obtaining DNA from clinical samples in adequate quantity and quality for molecular reactions. There are many DNA extraction kits, but often the molecular analysis process is unfeasible due to its cost and access to imported products. Thus, this study aimed to analyze three methods of extracting DNA from *Treponema pallidum* from ulcers of patients investigated for syphilis. The three methods, an in house one (sonication) and two commercial ones (LGC, Brazil) and the PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) were compared to the sequencing of these samples, which were used as a reference. Each method was evaluated based on the detection of *T. pallidum* by PCR using the *tp47* gene as a target for amplification, DNA quantification and method execution time. When compared to the sequencing, the sensitivity and agreement of the PureLink, sonication and LGC methods to extracted DNA were 100% (K = 1.0), 96.5% (K = 0.96) and 72.4% (K = 0.694), respectively. Specificity was 100% with the three methods.

The sonication method was the closest in concentration of DNA to the PureLink method with a similar degree of purity, besides having the lowest cost-benefit ratio. It can be an interesting option for laboratories that work with reduced costs, since it is much more financially viable.

1. Introduction

Syphilis is a chronic, multisystemic and serious communicable sexually transmitted infection (STI) caused by *T. pallidum*. Transmission can be vertical (during pregnancy) (Carlson et al., 2011; Castro et al., 2016) or occur through sexual contact.

The World Health Organization (WHO), based on prevalence data from 2009 to 2016, estimated a total of 376.4 million curable STIs, of which 6.3 million were syphilis (WHO, 2020). The prevalence in pregnant women worldwide was approximately 988,000 cases, where the vast majority either received no treatment or inadequate ones

(Korenromp et al., 2019). In Brazil, some capitals (Recife and Porto Alegre) had incidence rates in 2018, with 29.3 and 28.3 cases/1000 live births, respectively (Brasil, Boletim Epidemiológico da Sífilis. Ministério da Saúde, 2019).

T. pallidum is a microorganism that cannot be readily and reliably grown in culture media, which makes its isolation and laboratory diagnosis difficult (Ageron et al., 2009). Thus, the diagnosis of syphilis is made by combining clinical findings and laboratory tests that vary according to each stage of the disease (Brasil, 2016). The most used methods of diagnosis can be divided into serological methods, based on the detection of antibodies (non-treponemal and treponemal methods)

* Corresponding author.

E-mail address: vera.grassi@rede.ulbra.br (V.M.T. Grassi).<https://doi.org/10.1016/j.jmicmeth.2021.106383>

Received 23 July 2021; Received in revised form 19 November 2021; Accepted 19 November 2021

Available online 23 November 2021

0167-7012/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

and direct methods, based on the detection of bacteria such as dark field microscopy direct immunofluorescence and molecular tests (Castro et al., 2016; Brasil, 2016; Brasil, M.d.S., 2015; Pereira et al., 2019).

In the last few years, there has been an increase in the development of techniques for diagnosing syphilis through nucleic acid amplification tests (NAATs) to increase the sensitivity and specificity of the tests. Among all available techniques, the amplification of DNA by polymerase chain reaction (PCR) is the most widely used method (Grange et al., 2012; Gama et al., 2017; Zondag et al., 2020). There are two distinct regions in the *T. pallidum* genome widely used as target for amplification by PCR: the gene that encodes DNA polymerase I (*polA*) and the *tp47* gene, which encodes a membrane protein involved in cell wall synthesis (Liu et al., 2001; Ageron et al., 2015; Wang et al., 2018; Guan et al., 2019).

Using NAATs tests, DNA can be detected from biological samples such as blood or material obtained from injury (usually ulcers) as well as elsewhere in the body in most forms of syphilis *T. pallidum* (Wang et al., 2018).

Studies evaluating blood samples and their derivatives (e.g., serum, plasma) showed a low sensitivity of PCR in this type of sample, ranging from 0% to 62% regardless of the clinical stage of patients (Castro et al., 2016; Grange et al., 2012; Ageron et al., 2015; Marfin et al., 2001; Cruz et al., 2010; Martin et al., 2009; Castro et al., 2007). Interestingly, capillary blood samples collected from the auricular lobe presented a slightly higher sensitivity compared to those of whole blood and serum, with values ranging from 54 to 66% when the *tp47* and *polA* genes were searched in this type of sample from patients diagnosed with latent syphilis. These results may be related to the hypothesis that *T. pallidum* resides in the capillary beds of patients with latent infection (Castro et al., 2007; Castro et al., 2009; Lu et al., 2017).

The samples with the highest sensitivity to PCR are swab samples collected from primary syphilis (chancre) lesions, which range from 72 to 95% (Ageron et al., 2015; Wang et al., 2018; Heymans et al., 2010), while swab or biopsy samples collected from secondary syphilis lesions showed much lower sensitivity (between 20% and 86%) (Grange et al., 2012; Heymans et al., 2010; Palmer et al., 2003).

In the case of neurosyphilis, the diagnosis is made through cytological and biochemical analysis of the Cerebrospinal Fluid (CSF) for antibodies against the microorganism, which may be specific or not (Castro et al., 2016; Ageron et al., 2009).

NAATs are highly dependent on the efficiency of the method of extracting the genetic material used (Farah, 2007). The extraction of genomic DNA method is of great importance for a reliable detection of *T. pallidum*. Therefore, the selected method must fulfil some criteria, such as: reliable performance, elimination of PCR inhibitors, and be implementable as a laboratory technique, resulting in nucleic acid samples with sufficient quality for molecular analyzes (Casaril et al., 2017).

Currently, there are several methods of DNA extraction that use different ways to lyse the cells and purify the DNA. High temperature lysis, chemical and enzymatic reagents are present in most techniques (Psifidi et al., 2015; Moura et al., 2016; Bierhals et al., 2020). Physical lysis, such as sonication (ultrasound), has also shown significant results in some studies such as Bello et al. (2020), who used sonication to detect *Mycobacterium tuberculosis*, and Moreira et al. (2010), who used this method to extract DNA from *Streptococcus*.

Purification of DNA with silica has been shown to be extremely efficient for obtaining quality DNA (Psifidi et al., 2015). The PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, California, USA) is already established in the market and is being used in other studies (Bierhals et al., 2020; Gama et al., 2021). However, its use in countries that need to import it is expensive, which results in a high cost per sample to be analyzed.

Due to the wide variety of methods for DNA extraction, establishing a method that is fast, inexpensive and that produces DNA in sufficient quantity and quality for PCR amplification is essential. As there is a large

variety of commercial and in-house techniques available for DNA extraction, it becomes relevant to evaluate alternatives to seek methods that are more appropriate to the reality of laboratories. In the present work we evaluated three methods of extracting *T. pallidum* DNA from clinical samples. The evaluation considered the in-house method (sonication) and a commercial method (LGC, São Paulo, Brazil), new to the market and still without an evaluation, and an extraction kit already validated and well established in the market, the PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific), and compared the results obtained to the sequencing of the samples.

2. Materials and methods

2.1. Samples

DNA was extracted from samples of genital ulcers in men, suggestive of primary or secondary syphilis. The samples were collected with swabs and soaked in a saline solution at the Sanitary Dermatology Clinic (SDC) in Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brazil), a municipal public health service from July 2019 to March 2020. These samples were kept refrigerated until they were taken to ULBRA (Lutheran University of Brazil) molecular biology laboratory, where they were manipulated.

To perform the comparative analysis between the three methods, samples from 51 patients were split in 3 equivalent aliquots (one for each method), totalling 153 analyzes. The result of DNA detection *T. pallidum* by sequencing was considered the standard to defining positive and negative samples.

• Inclusion criterion:

Men over 18 years old, with genital ulcers suggestive of primary or secondary syphilis seen at the SDC.

• Exclusion criterion:

Men with cognitive impairment that would prevent them from understanding informed consent.

2.2. Statistical analysis

The data were allocated to a database in the Microsoft Excel software and were processed and analyzed by the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 21.0 software (IBM Corp. Armonk, New York, USA). To assess the agreement between the PCR amplification results for detecting the pathogen performed by the different extractions, the Kappa index (in pairs) was calculated, where the Kappa agreement strength (K) was interpreted as follows: $K \leq 0.00$ (insignificant), $K = 0.00-0.19$ (poor), $K = 0.20-0.39$ (weak), $K = 0.40-0.59$ (moderate), $K = 0.60-0.79$ (important), $K = 0.80-0.99$ (almost perfect) and $K = 1.00$ (perfect) (Lared et al., 2018).

The Mann-Whitney test was used to evaluate the possible differences between the amounts of DNA.

2.3. Ethical considerations

The project started after the work proposal approbation by the Ethics Committee of the School of Public Health of Rio Grande do Sul, under number 3,232,889, according to Resolution 466 of 2012 of the National Health Council.

2.4. DNA extraction methods

2.4.1. Sonication (in-house method)

DNA extraction was performed by a sonication process, according to Moreira et al. (2010) with some modifications. Briefly, 500 μ l of Phosphate Saline buffer (PBS buffer: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4) were added to 200 μ l of the sample, shaken

and centrifuged. After removing the supernatant, 100 µl of ultrapure water was added and placed in the vortex. The samples were placed in a dry bath for 20 min at 95 °C and then placed in an ultrasound bath (sonication, Becosonic, Heili, Beco Technic & Co GmbH, Germany) for 10 min at 30 °C. After this step, the samples were centrifuged at 13,000 RPM for 10 min, and the supernatant containing the DNA was stored at −20 °C until the PCR technique had been performed.

2.4.2. LGC Biotechnology extraction kit

The extractions were performed according to the manufacturer's protocol. Briefly, 200 µl of each sample were used, which was lysed with guanidine thiocyanate and washed with specific buffers and then the extracted DNA was eluted from a silica column and stored at −20 °C until use.

2.4.3. PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific)

The extractions were performed according to the manufacturer's protocol. Briefly, 200 µl of sample were lysed using Digestion buffer, Proteinase K and RNase A. The samples were applied to a spin column, washed with specific Wash Buffers and the DNA was eluted using Elution Buffer, and stored at −20 °C until use.

2.4.4. Detection of *T. pallidum* by PCR

After DNA extraction, *T. pallidum* DNA was detected by the conventional PCR technique using KO3 and KO4 primers, which amplify a 260-bp segment of the *tpo47* gene as described by Palmer et al. (2003). The nucleotide sequence of the primers is listed below:

KO3: 5'-GAAGTTTGTCCAGTTGCGGTT-3'

KO4: 5'-CAGAGCCATCAGCCCTTTTCA-3'

The samples were prepared for DNA amplification as described by the author (Palmer et al., 2003). A mixture was prepared with 10× buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTPs, 25 pmol of each primer and 1.25 U of the enzyme Platinum™ Taq DNA Polymerase Kit (Thermo Fisher Scientific). The amplification reactions were performed with an initial denaturation step at 95 °C for 2 min, followed by denaturation at 95 °C for 20 s, 62 °C for 20 s and 72 °C for 20 s, for 35 cycles, and a final extension at 72 °C for 5 min using a MJ Research PTC 96 thermal cycler.

Controls were used in each reaction. As a positive control, DNA was used from a wisely from a known positive sample, already characterized, and genotyped for *T. pallidum* and as negative control all the compounds of the reaction with ultra-pure water in place of DNA were used.

The PCR result was analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel containing 0.05% ethidium bromide and visualized under ultraviolet light.

2.5. Sequencing

After the molecular detection of *T. pallidum*, the PCR positive samples went on to the step of molecular characterization and identification through the MLST method as described in Grillová et al. (2018) using TP0136, TP0548 and TP0705 as target genes. This characterization was carried out by the company ACTGene Analyses Molecular (Porto Alegre, Brazil), through DNA sequencing from PCR products using the ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) equipment.

2.6. DNA quantification

The quantification of the DNA obtained in the extractions was performed by spectrophotometry by using a *BioSpectrometer Basic* (Eppendorf, Hamburg, Germany) at 260 nm. Analyzes to check the purity of the nucleic acid in relation to the presence of proteins ($A_{260}/A_{280} \geq 1.8$) were also performed using the same device. The presence of other impurities or inhibitors in the PCR reaction was evaluated by the ratio $A_{260}/A_{230} = 2$. Furthermore, the samples were analyzed for their integrity in a 2% agarose gel with ethidium bromide and visualized under UV light in the transilluminator.

2.7. Practicality and cost assessment

In this parameter, the number of steps of each method, the time of execution of the entire procedure, laboratory reagents required, and the number of necessary equipment were evaluated. In addition, the cost per sample was estimated, considering only the reagents/kits.

3. Results

3.1. Evaluation of DNA detection of *T. pallidum* by PCR

Of the 51 patients, *T. pallidum* was identified by sequencing in 29, and 22 were negative. After DNA extraction of the 153 samples by the three methods (one sample aliquot for each method) and PCR, it was possible to detect the DNA band on the agarose gel corresponding to the amplified DNA fragments extracted by the three methods. The results are showed in Table 1.

3.2. DNA quality assessment

An assessment of the DNA concentration and purity degree after extraction was performed. The PureLink silica extraction technique, which was used as a reference, made it possible to obtain a greater amount of DNA (47.65 ng/µl, ±50.05), significantly different ($p < 0.01$) from the protocol of the other two methods, which was also visualized on the agarose gel considering the band intensity (Table 2). Regarding the degree of purity of the extracted DNA, no significant difference was found between the methods.

When the same DNA analysis was performed on samples with the divergent PCR results (9/51) shown in Table 3, we observed that DNA was not detected in sonication in one sample (sample 1) that had a higher DNA concentration than the LGC method (21.5 ng/µl vs 10.3 ng/µl). In the other eight LGC method negative samples, four (sample 3, 4, 7 and 8) had a DNA concentration equivalent to PureLink, but in the other four (sample 2, 5, 6 and 9) the concentration was much lower than the PureLink mean (47.6). And regarding the degree of purity in these samples, most of them in the two evaluated methods had better values than PureLink, although there was no significant difference, and they were not related to the PCR result (Table 3). All analyzes were performed in duplicate, always two reactions for each sample, but no sample dilution was performed.

Table 1
Comparison results of PCR after DNA extraction with the PureLink, Sonication and LGC methods with Sequencing.

Sequencing method (n = 51)					
	Positive (n = 29)	Negative (n = 22)	Sensitivity (CI 95%)	Specificity (CI 95%)	Kappa Index (CI 95%)
PureLink (n = 51)			100%	100%	1.0
Positive	29	0	(88,30–100,0)	(85,13–100,0)	(1,0–1,0)
Negative	0	22			
Sonication (n = 51)			96.5%	100%	0.96
Positive	28	0	(82,82–99,39)	(85,13–100,0)	(0,88–1,03)
Negative	1	22			
LGC (n = 51)			72.4%	100%	0.69
Positive	21	0	(54,28–85,30)	(85,13–100,0)	(0,49–0,88)
Negative	8	22			

Table 2

Average DNA concentration (ng/μl), purity ratios.

Method	DNA concentration (ng/μl) (SD)	260/280 nm (SD)	260/230 nm (SD)	Amplicon intensity band in agarose gel
PureLink	47.65 (±50.05)	1.00 (±0.17)	0.54 (±0.43)	+++
LGC	37.96 (±116.31) $p < 0.01$	1.50 (±2.11) $p = 0.79$	0.25 (±0.30) $p = 3.17$	++
Sonication	16.97 (±21.45) $p < 0.01$	1.22 (±0.31) $p = 1.47$	0.48 (±0.25) $p = 0.93$	++

3.3. Evaluation of practicality

Practicality assessment was based in relation to the execution time of the protocols. The time spent in the DNA extraction process (for 10 samples) for the three techniques evaluated was the same (60 min), regardless of the approach – sonication or silica column (PureLink, LGC).

We also compared the necessary equipment, reagents, steps and cost. The results found are in Table 4. Regarding the reagents until use, the sonication method uses water and only one buffer, whereas the silica methods use only absolute alcohol, since the other reagents are provided in the kit.

4. Discussion

The choice of the best method of extracting of *T. pallidum* DNA directly from clinical samples is important for the efficiency and success of the syphilis molecular diagnosis. Methods using a silica column such as PureLink have been widely used, however the cost of the product generally makes molecular analysis very costly. In this study, we compared an in-house method (sonication), the LGC method (a Brazilian commercial kit) and the PureLink method (Thermo Fisher – well established in the market) and compared results to those obtained with the sequencing of samples (Bierhals et al., 2020; Gama et al., 2021; Nobre et al., 2014). The results obtained by PCR amplification after DNA extraction from material obtained directly from ulcerated lesions by the three protocols with the reference method (sequencing) showed a sensitivity of 100% for PureLink as expected. However, the extraction with sonication was very satisfactory (96.5%) and higher than with the LGC (72.4%). The specificity was 100% in all methods, which implies that there were no false positives results. The agreement between sequencing and the PureLink method confirms the latter as a reference ($K = 1$), but the sonication method showed very close results ($K = 0.965$).

Regarding the DNA concentration, the obtained results in this study showed that both the commercial kits were more successful; the

PureLink and LGC were shown to significantly get the highest concentration of DNA yield (47.65 ng/μl, 37.96 ng/μl respectively) when compared to the sonication method ($p < 0.01$). Similar results were also obtained by Moura et al. (2016) when they analyzed nine different DNA extraction techniques, and the commercial kits showed more successful results.

The purity of the DNA samples is extremely important and can be highly influenced by the different nature of other biomolecules, or even by the presence of reagent residues used during the technique (Pereira et al., 2019; Psifidi et al., 2015). In the present work, the degree of purity evaluated in both A260/280 nm and in A260/230 did not vary significantly between the two methods analyzed in relation to that obtained by the PureLink protocol. Despite the DNA extraction methodology, the average values of the A260/230 ratios obtained were below the appropriate range (Pereira et al., 2019; Bierhals et al., 2020).

Of the 51 samples tested there was a divergence in detection (PCR) of the DNA of nine samples. Of these, one sample (sample 1) was positive in the PureLink and in the LGC method, but negative in sonication. This may be a consequence of the purification step with the silica column used by the two techniques, which recovered purer DNA and with less inhibitors of the PCR reaction, despite having no significant difference in the assessment of the degree of purity. Silica columns act by an efficient and selective binding of nucleic acids, leading to reliable DNA purification (Esser et al., 2006). This mechanism is the affinity between the negatively charged nucleic acids and the positively charged silica material, resulting in selective binding of nucleic acids (Mutiu and Brandl, 2005). The other eight samples (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9) discordant in the PCR, which were negative in the LGC method and positive in the other two, show that despite the yield with variable concentrations, these negative PCRs may have been products of inhibition of the Taq DNA polymerase enzyme due to the presence of interfering agents, since the degree of purity, especially that evaluated in the 260/230 ratio, was well below the desirable level.

The use of commercial kits is generally preferred because they provide greater reproducibility, quality control and automation potential (Psifidi et al., 2015). However, the use of the in-house sonication method has shown very promising results (Bello et al., 2020). Furthermore, Granger et al. (2004) reported that the use of sonication would

Table 4List of time, steps, equipment, and reagents used in each extraction method¹.

Methods	Runtime	Steps	Necessary equipment	Reagents (from laboratory)	Cost/sample (US\$)
PureLink	50 min	5	3	1	75.00
LGC	60 min	6	2	1	2.00
Sonication	60 min	4	3	2	0.20

¹ Cost without equipment.

Table 3

DNA concentration values and purity ratio of the divergent samples.

DNA Samples	PureLink			LGC			Sonication		
	DNA concentration (ng/μl)	260/280 nm	260/230 nm	DNA concentration (ng/μl)	260/280 nm	260/230 nm	DNA concentration (ng/μl)	260/280 nm	260/230 nm
Positive samples in the PureLink Kit, but negative in the other two methods									
1	29.0	1.11	0.9	10.3	1.21	0.01	21.5	1.25	0.37
2	54.3	1.09	0.92	13.3	1.24	0.38	11.6	1.36	0.33
3	26.0	1.06	0.99	23.5	1.15	0.42	57.7	1.27	0.65
4	46.4	1.23	0.48	33.9	1.05	0.78	14.4	1.39	0.38
5	136.2	1.12	0.84	33.5	1.08	0.32	68.6	0.92	0.11
6	19.8	1.14	0	7.8	1.7	0.05	10.4	0.97	0.77
7	26.2	1.08	0	21.4	1.07	0	20.9	1.14	0.58
8	16.0	1.11	0	60.0	1.01	1.07	14.7	1.09	0.58
9	69.6	1.16	0	7.8	1.01	0.05	10.6	0.96	0.79

minimize the risk of cross-contamination between samples (Pchelintsev et al., 2016). Dai et al. (2016) concluded that the sonication-based technique would be considered more promising and efficient for homogeneous cell decomposition in a short period. Our study showed that sonication can obtain enough DNA for the detection of the pathogen and similar purity level to the reference technique, which could indicate a more accessible extraction method option, since it is available in the national market, which has only a few options.

As in our study, Krinitsina et al. (2015) demonstrated that the purity values and some concentrations of DNA are different from those seen in PCRs, and depending on the extraction method, the purification of DNA molecules is known to be influenced by their specificity of size, nucleotide composition, topology and association with proteins (Psifidi et al., 2015). We believe that the absorbance reading may have been influenced by residues from the products used, or the need for more washing during the execution of the technique. It shows that a quantitative evaluation of extracted DNA should not be evaluated as an absolute parameter.

Another assessment carried out was that of practicality. Our study showed that the time spent for the execution of both analyzed methodologies (sonication and LGC) was the same to process 10 samples, taking 10 min more than the PureLink. Regarding the steps of each protocol, sonication had the fewest steps, which are just device changes. Conversely, the silica methods have more steps, and all include manipulation of the tubes. Such characteristic makes sonication the best method in this category.

Comparing the equipment needed for the execution of each analyzed methodology, the sonication method used more equipment (centrifuge, dry bath and sonicator) when compared to the LGC and PureLink methods. However, all such equipment is common to every molecular biology laboratory. Also, the only reagent to be used is the PBS buffer, which is easy to access and handle. The commercial kits do not require much equipment, only a centrifuge, a vortex and dry bath (in a specific case), which are also basic equipment of a laboratory. In relation to the evaluated costs, both analyzed methods are much cheaper when compared to the PureLink kit (US\$ 75.00/sample). Moreover, although the nationally produced LGC kit is cheaper (US\$ 2.00/sample) than the reference kit, it is still about 10 times more expensive than the sample cost when use the sonication methodology (US\$ 0.20/sample). However, all these comparisons on practicality are different from those found by Pereira et al. (2019), where in-house analyzed methods were less practical and used several reagents that needed prior preparation, which made the technique difficult to use.

Based on the techniques analyzed in this work, sonication is an in-house method, through which it is possible to obtain DNA in a quick, practical, and affordable way, different from the techniques using silica columns. Such commercial methods are more expensive but result in purer DNA and often in more concentrated samples. So, the commercial kits are the most prevalent, as they provide better reproducibility and better-quality control and may lead to automation (Psifidi et al., 2015).

Our study had some limitations, such as a small number of samples and no known DNA was used with the sample to see any PCR inhibition

5. Conclusion

The comparison between the three extraction methodologies, showed that the PureLink method is the best, but that the sonication method was able to extract DNA in sufficient quantity for detection, and with a degree of purity similar to the one in the other techniques. In addition, when we analyzed the practicality, it also proved to be better, simpler, and more practical, it has the best cost-benefit ratio, and may become an attractive option for low-cost laboratories.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial

interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was carried out with the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) funding code 001. This project was funded by the Ministry of Health of Brazil through a PAHO Agreement Letter Number SCON00400/2019; and to all the evaluators who voluntarily made themselves available to carry out the evaluation of the guidelines under study.

References

- Ageron, A.G., Ninet, B., Trellu, L.T., Lautenschlager, S., Furrer, H., Piguet, V., Schrenzel, J., Hirschel, B., 2009. Assessment of a real time PCR to diagnose syphilis from devers biological sample. *Sex. Transm. Infect.* 85 (4), 264–269. <https://doi.org/10.1136/sti.2008.034314>.
- Ageron, A.G., Laurent, F., Schrenzel, J., Charton, B., Getaz, G.J., Tangomo, M., Tristant, B., Sednaoui, P., Lautenschlager, S., Trellu, L.T., Tejada, B.M., Cavassini, M., Emonet, S., Perneger, T., Salord, H., 2015. Performance of the 47 kilodalton membrane protein versus DNA polymerase I genes for detection of *Treponema pallidum* by PCR in ulcers. *J. Clin. Microbiol.* 53 (3), 976–980. <https://doi.org/10.1128/JCM.03444-14>.
- Bello, G.L., Morais, F.C.L., Wolf, J.M., Gehlen, M., Soares, T.D.S., Halon, M.L., Barcellos, R.B., Rossetti, M.L.R., 2020. Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* detection in sputum using DNA extracted by sonication. *Braz. J. Infect. Dis.* 24, 398–404. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.08.006>.
- Bierhals, N.D., Brixner, B., Silva, K.D., Oliveira, C.F., Renner, J.D.P., 2020. Extração de DNA genômico bacteriano: uma comparação de métodos comerciais e in house. *Revista Saúde Santa Maria.* 46 (2) <https://doi.org/10.5902/2236583441122>.
- Brasil, et al., 2016. Manual Técnico para o Diagnóstico da Sífilis. Ministério da Saúde - PNCQ.
- Brasil, Boletim Epidemiológico da Sífilis. Ministério da Saúde, 2019.
- Brasil, M.d.S., 2015. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecção Sexual Transmissível.
- Carlson, J.A., Dabiri, G., Cribier, B., Sell, S., 2011. The immunopathology of syphilis: The manifestation and course of syphilis are determined by the level of delayed – Type hypersensitivity. *Institutes National of health. Am. J. Dermatopathol.* 33 (5), 433–460. <https://doi.org/10.1097/dad.0b013e3181e8b587>.
- Casari, A.E., Oliveira, L.P., Alonso, D.P., Oliveira, E.F., Barrios, G., Petilim, S., Infran, J. O.M., Fernandes, W.S., et al., 2017. Experimental parasitology standardization of DNA extraction from sand flies: application to genotyping by next generation sequencing. *Exp. Parasitol.* 177, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.04.010>.
- Castro, R., Prieto, E., Aguas, M.J., Manata, M.J., Botas, J., Santo, I., Azevedo, J., Pereira, F.L., 2007. Detection of *Treponema pallidum* sp pallidum DNA in latent syphilis. *Int. J. STD & AIDS.* 18 (12), 842–845. <https://doi.org/10.1258/095646207782716901> (PMID: 18073019).
- Castro, R., Prieto, E., Aguas, M.J., Manata, M.J., Botas, J., Pereira, F.M., 2009. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subsp. pallidum in Lisbon, Portugal. *J. Clin. Microbiol.* 47 (8), 2510–2512. <https://doi.org/10.1128/JCM.00287-08> (Epub 2009 Jun 3. PMID: 19494073; PMCID: PMC2725690).
- Castro, R., Aguas, M.J., Batista, T., Araujo, C., Mansinho, K., Pereira, FdLM, 2016. Detection of *Treponema pallidum* Sp. Pallidum DNA in Cerebrospinal Fluid (CSF) by to PCR Techniques. *J. Clin. Lab. Anal.* 30, 628–632. <https://doi.org/10.1002/jcla.21913>.
- Cruz, A.R., Pillay, A., Zuluaga, A.V., Ramirez, L.G., Duque, J.E., Aristizabal, G.E., Fiel-Gan, M.D., Jaramillo, R., Trujillo, R., Valencia, C., Jagodzinski, L., Cox, D.L., Radolf, J.D., Salazar, J.C., 2010. Secondary syphilis in Cali, Colombia: new concepts in disease pathogenesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4 (5), e690 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000690> (PMID: 20502522; PMCID: PMC2872645).
- Dai, X., Chen, S., Li, N., Yan, H., 2016. Quantitative and qualitative validations of a sonication-based DNA extraction approach for PCR-based molecular biological analyses. *Anal. Biochem.* 501, 44–46. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.01.003>.
- Esser, K.H., Marx, W., Lisowsky, T., 2006. MaxBbond: first regeneration system for DNA Binding silica matrices. *Nat. Methods* 3, 2005–2006. <https://doi.org/10.1038/nmeth845>.
- Farah, S.B., 2007. DNA Segredos e Misterios. Sarvier, São Paulo.
- Gama, A., Carrillo-Casas, E.M., Hernández-Castro, R., Vázquez-Aceituno, V.A., Toussaint-Caire, S., Xicohtencatl-Cortes, J., Fernández-Martínez, R., Moreno-Coutinho, G., 2017. *Treponema pallidum* ssp. pallidum identification by real-time PCR targeting the polA gene in paraffin-embedded samples positive by immunohistochemistry. *Int. J. STD AIDS* 28 (13), 1299–1304. <https://doi.org/10.1177/0956462417704123>.
- Gama, A.R., JrMAB, Carvalho, Wastowski, L.J., Rodrigues, S.O., Souza, M.F.B., Botacin, L.S., Avelino, M.A.G., Carneiro, L.C., 2021. HPV detection in oral mucosa samples in pediatric patients. *Brazilian J. Pathol. Lab. Med.* 57 n1.
- Grange, P.A., Gressier, L., Dion, P.L., Farhi, D., Benhaddou, N., Gerhardt, P., Morini, J.P., Deleuze, J., Pantoja, C., Bianchi, A., Lassau, F., Avril, M.F., Janier, M., Dupin, N., 2012. Evaluation of a PCR test for detection at *Treponema pallidum* swabs and blood. *J. Clin. Microbiol.* 50 (3), 546–552. <https://doi.org/10.1128/JCM.00702-11>.

- Granger, K., Moore, R.J., Davies, J.K., Vaughan, J.A., Stiles, P.L., Stewart, D.J., et al., 2004. Recovery of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from the natural host for the extraction and analysis in vivo-derived RNA. *J. Microbiol. Methods* 57 (2), 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.01.010>.
- Grillová, L., Bawa, T., Mikalová, L., Gayet-Ageron, A., Nieselt, K., Strouhal, M., Sednaoui, P., Ferry, T., Cavassini, M., Lautenschlager, S., Dutly, F., Pla-Díaz, M., Krützen, M., González-Candelas, F., Bagheri, H.C., Šmajš, D., Arora, N., Bosshard, P., 2018. Molecular characterization of *Treponema pallidum* subsp. pallidum in Switzerland and France with a new multilocus sequence typing scheme. *PLoS One* 13 (7), e0200773. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200773> (PMID: 30059541; PMCID: PMC6066202).
- Guan, Y., Ding, R., Zhou, Y., Chen, X., Miao, X., Zhang, Y., Luo, D., Cui, S.J., 2019. Sensitivity of nPCR for four types of membrane protein DNA and of two pairs of primers for Tpp47 DNA of *Treponema pallidum* in whole blood of congenital syphilis newborns. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 32 (2), 229–235. <https://doi.org/10.1080/14767058.2017.1378321>.
- Heymans, R., Van Der Helm, J.J., de Vries, H.J., Fennema, H.S., Coutinho, R.A., Bruisten, S.M., 2010. Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. *J. Clin. Microbiol.* 48 (2), 497–502. <https://doi.org/10.1128/JCM.00720-09> (Epub 2009 Dec 9. PMID: 20007388; PMCID: PMC2815629).
- Iared, W., Puchnick, A., Bancovsky, E., Bettini, P.R., Vedolin, L.M., Chammas, M.C., 2018. Reproducibility of a quantitative system for assessing the quality of diagnostic ultrasound. *Radiol. Bras.* 51 (3), 172–177. <https://doi.org/10.1590/0100-3984.2017.0021> (PMID: 29991839; PMCID: PMC6034735).
- Korenromp, E.L., Rowley, J., Alonso, M., et al., 2019. Global burden of maternal and congenital syphilis and associated adverse birth outcomes—Estimates for 2016 and progress since 2012. *PLoS One* 14 (7), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219613>.
- Krinitina, A.A., Sizova, T.V., Zaika, M.A., et al., 2015. Um método rápido e econômico para extração de DNA de espécimes de herbário arquivado. *Bioquímica Moscou* 80, 1478–1484. <https://doi.org/10.1134/S0006297915110097>.
- Liu, H., Rodes, B., Chen, C.Y., Steiner, B., 2001. 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.* 39 (5), 1941–1946. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.5.1941-1946.2001>.
- Lu, Y., Wu, Q., Wang, L., Ji, L., 2017. Molecular epidemiological survey of *Treponema pallidum* in pregnant women in the Zhabei District of Shanghai. *J. Med. Microbiol.* 66 (4), 391–396. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000441> (Epub 2017 Apr 6. PMID: 28126049).
- Marfin, A.A., Liu, H., Sutton, M.Y., Steiner, B., Pillay, A., Markowitz, L.E., 2001. Amplification of the DNA polymerase I gene of *Treponema pallidum* from whole blood of persons with syphilis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 40 (4), 163–166. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(01\)00275-9](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(01)00275-9) (PMID: 11576788).
- Martin, I.E., Tsang, R.S., Sutherland, K., Tilley, P., Read, R., Anderson, B., Roy, C., Singh, A.E., 2009. 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.* 47 (6), 1668–1673. <https://doi.org/10.1128/JCM.02392-08> (Epub 2009 Apr 1. PMID: 19339468; PMCID: PMC2691066).
- Moreira, M., Noschang, J., Neiva, I.F., Carvalho, Y., Higuti, I.H., Vicente, V.A., 2010. Methodological variations in the isolation of genomic from *Streptococcus* bacteria. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53 (4), 845–849. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000400013>.
- Moura, A., Moura, A.M., Hodon, M.A., Soares Filho, P.M., Issa, M.A., de Oliveira, A.P.F., Fonseca Júnior, A.A., 2016. Comparison of nine DNA extraction methods for the diagnosis of bovine tuberculosis by real time PCR. *Ciência Rural* 46 (7), 1223–1228. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20151489>.
- Mutiú, A.L., Brandl, C.J., 2005. Isolamento de RNA de levedura usando matrizes de sílica. *J. Biomol. Tech.* 16 (4), 316–317 (PMID: 16522851; PMCID: PMC2291748).
- Nobre, A.F.S., Sousa, R.C.M., Santos, M.C., Barbagelata, L.S., Costa Jr., E., Lima, D.F., Souza, E.M.A., Mello, W.A., 2014. First detection of human coronaviruses associated with acute respiratory infection in Northern Brazil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 5 (2). <https://doi.org/10.5123/S2176-62232014000200005>.
- Palmer, H.M., Higgins, S.P., Herrington, A.J., Kingston, M.A., 2003. Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. *Sex. Transm. Infect.* 79, 479–483. <https://doi.org/10.1136/sti.79.6.479>.
- Pchelintsev, N.A., Adams, P.D., Nelson, D.M., 2016. Critical parameters for efficient sonication, and improved chromatin immunoprecipitation of high molecular weight proteins. *PLoS One* 11 (1), e0148023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148023>.
- Pereira, J.B., Barbosa Júnior, W.L., Silva, E.D., Aquino, A.E.C.A., Oliveira, P.M.S., Melo, F.L., 2019. Comparação de técnicas de extração de DNA de *Treponema Pallidum* para o diagnóstico molecular da sífilis. *Brazilian J. Health Rev.* 2 (4), 3681–3697. <https://doi.org/10.34119/bjhrv2n4-131>.
- Psifidi, A., Dovas, C.I., Bramis, G., Lazou, T., Russel, C.L., Arsenos, G., et al., 2015. Comparison of eleven methods for genomic DNA extraction suitable for large-scale whole-genome genotyping and long-term DNA banking using blood samples. *PLoS One* 10, e0115960. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115960>.
- Wang, C., Cheng, Y., Liu, B., Wang, Y., Gong, W., Qian, Y., Guan, Z., Lu, H., Gu, X., Shi, M., Zhou, P., 2018. Sensitive detection of *Treponema pallidum* DNA from the whole blood of patients with syphilis by the nested PCR assay. *Emerg. Microbes Infect.* 7 (1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0085-2t>.
- WHO, 2020. World Health Organization Global adult estimates of chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis including maternal and congenital syphilis, 2016. WHO, Geneva (76 p.).
- Zondag, H.C.A., Cornelissen, A.R., Van Dam, A.P., Bruisten, S.M., 2020. Molecular diversity of *Treponema pallidum* subspecies pallidum isolates in Amsterdam, the Netherlands. *Sex. Transm. Infect.* 96 (3), 223–226. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2019-054044>.

4.3 CAPÍTULO 3 - ARTIGO: “DETECÇÃO DE *Treponema pallidum* EM AMOSTRAS DE SANGUE FIXADAS EM CARTÃO PARA DIAGNÓSTICO DA SÍFILIS CONGÊNITA”.

Detecção de *Treponema pallidum* em amostras de sangue fixadas em cartão para diagnóstico da sífilis congênita

Detection of *Treponema pallidum* in blood samples fixed on card for diagnosis of congenital syphilis

Detección de *Treponema pallidum* en muestras de sangre fijadas en tarjeta para diagnóstico de sífilis congénita

Recebido: 06/08/2021 | Revisado: 13/08/2021 | Aceito: 15/08/2021 | Publicado: 17/08/2021

Vera Mileide Trivellato Grassi

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0987-5084>

Universidade Luterana do Brasil, Brasil

E-mail: vmgrassi@hotmail.com

Rafaela Caroline Clarinda Melo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1945-4072>

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Brasil

E-mail: rafaelacm@gmail.com

Liliane Trivellato Grassi

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0768-943X>

Universidade Brasil, Brasil

E-mail: lilianegrassi@hotmail.com

Marcia Susana Nunes Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8854-582X>

DNTech – Desenvolvimento de Novas Tecnologias LTDA, Brasil

E-mail: marcia_susana@hotmail.com

Maria Lucia Rosa Rossetti

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9672-9394>

Universidade Luterana do Brasil, Brasil

E-mail: maria.rossetti@ulbra.br

Resumo

A sífilis congênita (SC) é uma doença de transmissão vertical causada pelo *Treponema pallidum* provocando uma infecção do bebê ainda no útero. O diagnóstico da SC é difícil e tem sido feito por uma combinação de critérios clínicos e laboratoriais, o que torna necessário a busca por novos métodos de diagnóstico para auxiliar a tomada de decisão. Os testes moleculares, apesar de ainda não serem rotina nos laboratórios, estão sendo cada vez mais utilizados. A etapa pré-analítica de coleta da amostra, extração e preservação do DNA é fundamental. O uso de sangue fixado em cartão (SFC) tem sido uma alternativa no diagnóstico de várias doenças pela facilidade na execução da etapa pré-analítica. Nosso trabalho teve como objetivo detectar *T. pallidum* por reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir de SFC de recém-nascidos que tiveram resultado positivo no PCR com a amostra de líquido cefalorraquidiano (LCR). Foram analisadas 82 amostras pareadas (sangue e LCR) de 41 RN na do Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA), de Porto Alegre, RS, Brasil, sendo 22 positivas e 19 negativas. A sensibilidade e especificidade foram 63,3% e 100%, respectivamente. A concordância entre os métodos foi substancial (K=0,619), mostrando que a PCR diretamente de SFC pode ser promissora, desde que aperfeiçoada sendo uma possibilidade de diagnosticar a SC e facilitar a triagem neonatal.

Palavras-chave: Sífilis congênita; PCR; Diagnóstico; *Treponema pallidum*.

Abstract

Congenital syphilis (CS) is a vertically transmitted disease caused by *Treponema pallidum* causing an infection of the baby in the uterus. Diagnosis of CS is difficult and has been made by a combination of clinical and laboratory criteria, which makes it necessary to search for new diagnostic methods to aid decision making. Molecular tests, despite not being routine in laboratories, are being used more and more. The pre-analytical stage of sample collection, DNA extraction and preservation is essential. The use of fixed blood on a card (SFC) has been an alternative in the diagnosis of various diseases due to the ease of carrying out the pre-analytical stage. Our study aimed to detect *T. pallidum* by polymerase chain reaction (PCR) from CFS of newborns that had a positive PCR result with the cerebrospinal fluid (CSF) sample. Eighty-two paired samples (blood and CSF) were analyzed from 41 NB at the Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA), in Porto Alegre, RS, Brazil, 22 positive and 19 negative. Sensitivity and specificity were 63.3% and 100%, respectively. The agreement between the methods was substantial (K=0.619),

showing that PCR directly from CFS can be promising, as long as it is improved, it is a possibility to diagnose CS and facilitate neonatal screening.

Keywords: Congenital syphilis; PCR; Diagnosis; *Treponema pallidum*.

Resumen

La sífilis congénita (SC) es una enfermedad de transmisión vertical causada por *Treponema pallidum* que causa una infección del útero en el bebé. El diagnóstico de SC es difícil y se ha realizado mediante una combinación de criterios clínicos y de laboratorio, lo que hace necesaria la búsqueda de nuevos métodos diagnósticos que ayuden a la toma de decisiones. Las pruebas moleculares, a pesar de no ser una rutina en los laboratorios, se utilizan cada vez más. La etapa preanalítica de recolección de muestras, extracción y preservación del ADN es esencial. El uso de sangre fijada en tarjeta (SFC) ha sido una alternativa en el diagnóstico de diversas enfermedades debido a la facilidad para realizar la etapa preanalítica. Nuestro estudio tuvo como objetivo detectar *T. pallidum* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de SFC de recién nacidos que tuvieron un resultado de PCR positivo con la muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR). Se analizaron 82 muestras pareadas (sangre y LCR) de 41 RN del Hospital da Criança Santo Antônio (HCSA), en Porto Alegre, RS, Brasil, 22 positivas y 19 negativas. La sensibilidad y la especificidad fueron 63,3% y 100%, respectivamente. La concordancia entre los métodos fue sustancial ($K = 0,619$), lo que demuestra que la PCR directamente del SFC puede ser prometedora, siempre que se mejore, es una posibilidad para diagnosticar el SC y facilitar el cribado neonatal.

Palabras clave: Sífilis congénita; PCR; Diagnóstico; *Treponema pallidum*.

1. Introdução

A sífilis é uma infecção sexualmente transmissível (IST), grave, infectocontagiosa e sistêmica, causada pelo *Treponema pallidum* (Macedo et al., 2015).

Em 2016, a ocorrência da sífilis em gestantes no mundo foi de quase um milhão de casos. Entre estes casos, houve 143 mil abortamentos ou mortes fetais, 14 mil mortes neonatais, 41 mil prematuros ou com baixo peso ao nascer, por fim, 109 mil recém-nascidos (RN) infectados desenvolveram complicações clínicas. Nos países onde o investimento em saúde é menor, o acesso aos serviços de saúde também é mais difícil, incluindo os cuidados pré-natais. (WHO, 2020).

Existe uma tendência mundial para redução nas taxas de sífilis congênita (SC) nos últimos anos, mas esta tendência não está sendo observada nas Américas e no Mediterrâneo Oriental, que apresentaram aumento destas taxas. O aumento observado nas Américas vem ao encontro do aumento no número de casos de sífilis adquirida identificado na população geral desta região nos últimos anos (Ghanem, Ram & Rice, 2020).

No Brasil, de 1988 a junho de 2018, foram notificados no Sistema de Informações de Agravos de Notificação (Sinan) 188.445 casos de SC em menores de um ano. (Brasil, 2019)

As manifestações clínicas da SC podem surgir logo após o nascimento, ou nos primeiros dois anos de vida. A neurosífilis é observada em 40% a 60% das crianças nessa fase podendo evoluir para óbito (Focaccia et al., 2015).

O diagnóstico precoce da SC é importante para um melhor prognóstico. No entanto, o diagnóstico muitas vezes é difícil e não consegue definir com clareza uma infecção ativa, seja pela impossibilidade de cultivo do *T. pallidum*, ou pela falta de precisão dos testes sorológicos (treponêmicos ou não). (Sec. Est. de São Paulo, 2016).

Ao verificarmos as recomendações do CDC e das diretrizes europeias, identifica-se a multiplicidade de situações maternas e nos recém-nascidos que podem ser encontradas na avaliação clínico-laboratorial de casos suspeitos. A multiplicidade de testes a serem solicitados indica que a sensibilidade e a especificidade dos testes se encontram aquém do ideal, e tal fato também se reflete na interpretação sempre relativa dos resultados. É plenamente justificada, portanto, a busca por testes com maiores sensibilidade e especificidade e que possam auxiliar a tomada de decisão clínica. (Janier et al., 2014, Workowski & Bolan, 2015).

O sequenciamento genético do *T. pallidum* em 1998 (Weinstock, Hardham, McLeod & Sodergreen, 1988; Fraser et al., 1988) impulsionou o desenvolvimento de testes moleculares, principalmente os baseados na amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar regiões específicas desta bactéria (Fraga et al., 2014). Os dois genes mais utilizados

para amplificação tem sido o *polA* (DNA polimerase) e o *tpp47*, gene que codifica uma proteína de membrana envolvida na síntese da parede celular com sensibilidade e especificidade semelhantes. As amostras mais utilizadas para detecção do *T. pallidum* são líquido cefalorraquidiano (LCR), soro, sangue total e até sangue de cordão umbilical (Pinilla, Chavarro, Moreno, Navarrete & Muñoz, 2015; Pinilla, Campos, Duran, Navarrete & Muñoz, 2018; Theel, Katz & Pillay, 2020).

O uso de sangue fixado em cartão (SFC) para coletar, transportar e extrair DNA de amostras fixadas tem sido relatado para diagnóstico de várias doenças como a tuberculose, a leishmaniose, sarampo e rubéola (Ali, Bello, Rossetti, Krieger & Costa, 2020; Mota, Venazzi, Zanzarini, Aristides, Lonardoní & Silveira, 2020; Bankamp et al., 2019). Este método é ideal para diagnosticar infecções com custos baixos, e volumes mínimos de sangue envolvidos e capacidade de armazenamento e transporte à temperatura ambiente. (Iroh Tam et al., 2018).

No Brasil, esses cartões também são utilizados para coleta de sangue de RN para a triagem neonatal (teste do pezinho) que inclui o diagnóstico de doenças metabólicas, congênicas e infecciosas (Brasil, 2021).

Nosso trabalho abordará a utilidade da coleta de sangue do recém-nascido e este ser fixado em cartão para detecção de DNA de *T. pallidum* para verificar a presença de sífilis congênita, comparando com o mesmo procedimento em amostras de LCR e testes sorológicos de recém-nascidos de mães com e sem sífilis.

Desta forma o objetivo deste trabalho foi detectar a sífilis congênita através da presença de DNA do *T. pallidum* por PCR em amostras de sangue total fixadas em cartão e comparar com o LCR de recém-nascidos. Avaliar o comportamento da reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do genoma de *T. pallidum* nas diferentes amostras de recém-nascidos em diferentes situações de risco para sífilis congênita, determinar a concordância entre as duas técnicas e determinar a sensibilidade e especificidade, do método de PCR para diagnóstico de sífilis congênita.

2. Metodologia

Este é um estudo experimental e transversal. Foram coletadas 41 amostras de sangue total de recém-nascidos, sendo 22 amostras de recém-nascidos de mães com diagnóstico de sífilis, (segundo os critérios do CDC e das diretrizes europeias (Janier et al., 2014; Workowski et al., 2015) e com PCR de LCR positivo, e 19 amostras de sangue total de recém-nascidos, com indicação de coleta de sangue e líquido para investigação de seps neonatal precoce, ou TORCH (Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus, e vírus Herpes simples), de mães sem suspeita de sífilis (usados como controle), na maternidade do Hospital da Criança Santo Antônio, de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. O diagnóstico de sífilis nas mães foi realizado por testes laboratoriais sorológicos (RPR), e clínicos realizados por equipe de profissionais do próprio hospital. Todos os RN fizeram o teste RPR (rapid plasma reagin) no sangue.

As amostras foram enviadas para o laboratório de biologia molecular da Ulbra Canoas, onde foram realizados de agosto de 2019 a junho de 2020 os testes de PCR.

O projeto foi aprovado pela CEP da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (2.547.348) e do HCSA (3.432.633).

Extração de DNA

Foi distribuído 40 µl de sangue no cartão FTA Elute® (Whatman™) e secado à temperatura ambiente. A extração de DNA do cartão foi realizada com dois discos de seis mm removidos do cartão (conforme instruções do fabricante).

O DNA de LCR foi extraído com Kit PureLink® Genomic (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific, EUA), conforme instruções do fabricante.

Detecção do *T. pallidum* por PCR

A detecção de *T. pallidum* foi realizada pela técnica de PCR convencional utilizando os primers KO3 (5' GAAGTTTGTCCAGTTGCGGT-3') e KO4 (5'CAGAGCCATCAGCCCTTTCA 3') que amplificam um segmento de 260 pb do gene *tp47* conforme descrito por Palmer & Higgins & Herring & Kingston, 2003.

A amplificação do DNA foi realizada com uma mistura com tampão 10X, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTPs, 25 pmol de cada *primer* e 1,25 U da enzima *Taq platinum* DNA polimerase. Foi feita uma desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de uma desnaturação a 95°C por 20 segundos, 62°C por 20 segundos e 72°C por 20 segundos, durante 35 ciclos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. A amplificação em aparelho termociclador MJ Research PTC 96.

O resultado da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2% contendo 0,05% de brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

O controle positivo foi DNA de *T. pallidum* e como controle negativo, uma reação somente com a mistura de reagentes, livres de DNA.

RPR

O teste de RPR foi realizado nos RN foram conforme recomendado no guideline europeu (Janier et al.,2014)

Análises Estatísticas

Os dados foram alocados em uma base de dados no programa Microsoft Excel, e foram processados e analisados pelo programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) v21. Para avaliar a concordância entre os resultados de PCR para detecção do patógeno, realizados pelas diferentes extrações, foi calculado o índice Kappa (em pares), onde a força de concordância Kappa (K) foi interpretada da seguinte maneira: K= <0,00 (insignificante), K=0,00-0,19 (ruim), K=0,20-0,39 (fraca), K=0,40- 0,59 (moderada), K=0,60-0,79 (importante), K=0,80-0,99 (quase perfeita) e K=1,00 (perfeita) (Iared et al.,2018).

3. Resultados

Os 22/41 RN considerados positivos para a infecção por *T. pallidum*, quando o PCR foi realizado do SFC foi possível amplificar 14/22 (63,6%) e em oito não houve amplificação. Os PCRs de SFC dos RN controles não amplificaram *T. pallidum* (Tabela 1). A sensibilidade foi de 63,3% e a especificidade foi de 100% do PCR com SFC.

Tabela 1: Resultados de PCR de LCR e do SFC para *Treponema pallidum*.

	Positivo (n=22)	Negativo (n=19)	Sensibilidade	Especificidade	Kappa
SFC (n=41)			63,3%	100%	0,619
Positivo	14	0			
Negativo	8	19			

LCR (n= 41). Fonte: Autores.

A concordância entre os métodos de PCR (LCR e SFC) foi considerada substancial (Kappa =0,619). Os resultados da comparação do PCR com o teste RPR estão na tabela 2.

Tabela 2: Comparação entre os resultados de PCR/LCR, PCR/Sangue e RPR.

	Positivo (n=15)	Negativo (n=26)	Sensibilidade	Especificidade	Kappa
PCR/LCR (n=41)			100%	73,0%	0,66
Positivo	15	7			
Negativo	0	19			
PCR/Sangue (n=41)			66,6%	84,0%	0,52
Positivo	10	4			
Negativo	5	22			

RPR (n=41). Fonte: Autores.

4. Discussão

A possibilidade de detecção de *T. pallidum* por PCR confirmando que este pode auxiliar na definição de infecção ativa, tem sido relatado (Castro et al., 2016; Theel et al., 2020). Nosso estudo analisou a detecção de *T. pallidum* por PCR para o diagnóstico da SC em RN a partir de SFC e comparou com RN com suspeita de SC e com PCR de LCR positivo (padrão de referência) e controles. A sensibilidade encontrada foi de 63% e está dentro do que tem sido relatado (14% a 63%) em PCRs com sangue e derivados (soro, plasma) independentemente do estágio clínico em que os pacientes se encontravam (Wang et al., 2018). A concordância entre os testes foi de $K=0,619$ que é considerada substancial, mostrando que o SFC pode ser usado para detectar o *T. pallidum*. No entanto, a especificidade do PCR foi de 100%, o que o torna importante pois possibilita a exclusão de um falso positivo como caso de SC.

Quando comparamos os resultados de ambos os PCR com o de RPR observamos que a sensibilidade foi de 100%, e 66,6% e a especificidade de 73,0% e 84,0% no LCR e no SFC, respectivamente. A concordância foi avaliada como substancial ($K=0,665$) no LCR e moderada ($K=0,52$) no SFC. Quando consideramos o RPR como referência, os resultados falso positivos sugerem que pode não ter ainda transferência de anticorpos maternos ao feto, mas que a bactéria atravessou a barreira placentária. Já nos resultados falso negativos sugerem a transferência de anticorpos maternos, pois RN ainda não tem anticorpos próprios, mas que não houve transferência da bactéria, ou podem ser explicado por uma possível carga bacteriana baixa circulando no sangue, ou ainda pela não homogeneidade com que o DNA presente no sangue se espalha no cartão, assim algumas amostras só se mostraram positiva nas amostras de LCR (Michelow et al., 2002; Castro et al., 2016; Mota et al., 2021).

O teste Venereal Disease Research Laboratory (VDRL), teste amplamente utilizado para o diagnóstico de sífilis, possui uma sensibilidade em amostras de LCR de RN em torno de 50% e sua significância ainda não está clara, devido muitos falsos negativos e positivos, relacionados a janela imunológica e anticorpos maternos que cruzam a placenta (Michelow et al., 2002; Woods et al., 2005; Brasil, 2016). Assim apesar da sensibilidade encontrada no nosso estudo nas amostras de cartão ser de 63,3% ainda é melhor que os métodos atualmente utilizados.

Não foram encontrados estudos com SFC para detecção do *T. pallidum*, mas um tipo de papel filtro o cartão de Guthrie (teste do pézinho) já é utilizado com sucesso na triagem neonatal de várias doenças e o cartão Whatman (FTA- elute ou Classic) já faz parte da detecção de outros agentes biológicos (Bankamp et al., 2019; Ali et al., 2020; Mota et al., 2021).

5. Conclusão

Conclui-se com nosso estudo que apesar da sensibilidade do SFC ter sido de apenas 63,3% e a especificidade de 100%, mostrou que este pode ser um método de diagnóstico de SC em RN. O método de PCR diretamente de SFC é uma técnica que se aperfeiçoada pode ser muito promissora para a avaliação de casos suspeitos e proporcionar uma melhora no

diagnóstico desta doença tão negligenciada, mas ainda há a necessidade de continuar os estudos sobre a técnica e a importância do uso, pois coletar amostras de LCR de todos os RN é muito invasivo e as amostras de sangue fixadas em cartão é de fácil coleta e transporte. Por fim, este artigo lança luz sobre um tema muitas vezes negligenciado, que ainda tem poucos dados publicados e apresenta uma visão geral das variáveis clínicas de interesse.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) código de financiamento 001.

Referências

- Ali, N., Bello, G. L., Rossetti, M. L. R., Krieger, M. A., & Costa, A. D. T. (2020). Demonstração de um protocolo rápido e fácil de amostra para resposta para rastreamento de tuberculose em ambientes de ponto de cuidado: Uma prova de estudo conceitual. *PLoS ONE* 15(12): e0242408. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242408>
- Bankamp, B., Sein, C., Pukuta-Simbu, E., Anderson, R., Abernathy, E., Chen, M-H., Muyembe-Tamfum, J-J., Wannemuehler, K. A., Waku-Koumou, D., Lopareva, E. N., Icenogle, J. P., Rota, P. A., & Goodson, J. L. (2019). Use of FTA cards to transport throat swabs and oral fluid samples for molecular detection and genotyping of measles and rubella viruses. *Journal of Clinical Microbiology* 57:e00048-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.00048-19>
- Brasil, Boletim Epidemiológico da Sífilis. Ministério da Saúde, 2019
- Brasil, Governo do. (2021). Teste do Pezinho será ampliado e detectará até 50 novas doenças.
- Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis, Aids e Hepatites Virais. Manual Técnico para Diagnóstico da Sífilis: Ministério da Saúde, 2016.
- Castro, R., Aguas, M. J., Batista, T., Araujo, C., Mansinho, K., & Pereira, F. L. M. (2016). Detection of *Treponema pallidum* Sp. *Pallidum* DNA in Cerebrospinal Fluid (CSF) by to PCR Techniques. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 30: 628-632. DOI 10.1002/jcla.21913
- Focaccia R. Tratado de infectologia. (5a ed.), editora Atheneu; 2015.
- Fraga, D., Muller, A. L., Czykiel, M. S., De Armas, Y., Wissmann, G., & Goldani, L. Z. (2014). Detection of *Treponema pallidum* by semi-nested PCR in the cerebrospinal fluid of asymptomatic HIV-infected patients with latent syphilis. *Clinical Laboratory*. 60(12):2051-2054. 10.7754/clin.lab.2014.140605
- Fraser, C. M., Norris, S. J., Weinstock, G. M., White, O., Sutton, G. G., Dodson, R., & Sodergreen, E. (1988). Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science*. 281, 375-388. 10.1126/science.281.5375.375
- Ghanem, K. G., Ram, S., & Rice, P. A. (2020). The Modern Epidemic of Syphilis. *The New England Journal of Medicine*. 382(9):845-854. 10.1056/NEJMr1901593.
- Iared, W., Puchnick, A., Bancovsky, E., Bettini, P. R., Vedolin, L. M., & Chammas, M. C. (2018). Reproducibility of a quantitative system for assessing the quality of diagnostic ultrasound. *Radiologia Brasileira*. Mai/Jun;51(3):172-177. 10.1590/0100-3984.2017.0021.
- Iroh Tam, P-Y., Hernandez-Alvarado, N., Schleiss, M. R., Hassan-Hanga, F., Onuchukwu, C., Umoru, D., & Obaro, S. K. (2016) Molecular Detection of *Streptococcus pneumoniae* on Dried Blood Spots from Febrile Nigerian Children Compared to Culture. *PLoS ONE* 11(3): e0152253. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152253>
- Janier, M., Hegyi, V., Dupin, N., Unemo, M., Triplica, G. S., Potocnik, M., Frances, P., & Patel, R. (2014). European guideline on the management of syphilis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 28(12):1581-1593. 10.1111/jdv.12734
- Korenromp, E. L., Rowley, J., Alonso, M., Mello, M. B., Wijesooriya, N. S., Mahiané, S. G., Ishikawa, N., Le, L. V., Newman-Owiredo, M., Magalkerke, N., Newman, L., Broutet, N., & Taylor, M. M. (2019) Global burden of maternal and congenital syphilis and associated adverse birth outcomes, Estimates for 2016 and progress since 2012. *PLoS ONE* 14(2): e0211720. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211720>
- Macedo, E. M. (2005) Há 100 anos, a descoberta do *Treponema pallidum*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 80, 547-548. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962005000600017>
- Michelow, I. C., Wendel, G. D., Norgard, M. V., Zeray, F., Leos, N. K., Alsaadi, R., & Sánchez, P. J. (2002). Central Nervous System Infection in Congenital Syphilis. *The New England Journal of Medicine*. 346(23):1792-8. 10.1056/NEJMoa012684.
- Mota, C. A., Venazzi, E. A. S., Zanzarini, P. D., Aristides, S. M. A., Lonardon, M. V. C., & Silveira, T. G. V. (2021). Filter paper performance in PCR for cutaneous leishmaniasis diagnosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 54. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0047-2020>
- Palmer, H. M., Higgins, S. P., Herring, A. J., & Kingston, M. A. (2003). Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. *Sexually Transmitted Infections*. 79:479-83. DOI:10.1136/sti.79.6.479
- Pinilla, G., Campos, L., Durán, A., Navarrete, J., & Muñoz, L. (2018). Detección de *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* para el diagnóstico de sífilis congénita mediante reacción en cadena de la polimerasa anidada. *Biomedica*. 38(1):128-35. 10.7705/biomedica.v38i0.3740. PMID: 29676865.

Pinilla, G. B., Chavarro, B. P., Moreno, M. A., Navarrete, J. O., & Muñoz, L. M. (2015). Determinación de los genes, *16S ADNr*, *polA*, y *TpN47*, en la detección de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* para el diagnóstico de sífilis congénita. *NOVA*. 2015; 13 (23): 17-25. <https://doi.org/10.22490/24629448.1713>

Secretaria do estado de São Paulo. Guia de bolso- Manejo da sífilis em gestante e sífilis congênita. 2016. (2a ed.).

Theel, E. S., Katz, S. S., & Pillay, A. (2020). Molecular and Direct Detection Tests for *Treponema pallidum* Subspecies *pallidum*: A Review of the Literature, 1964–2017. *Clinical Infectious Diseases*. 71(Supplement_1):S4-S12. 10.1093/cid/ciaa176

Wang, C., Cheng, Y., Liu, B., Wang, Y., Gong, W., Qian, Y., Guan, Z., Lu, H., Gu, X., Shi, M., & Zhou, P. (2018). Sensitive detection of *Treponema pallidum* DNA from the whole blood of patients with syphilis by the nested PCR assay. *Emerging Microbes Infections*, 7:1, 1-7, 10.1038/s41426-018-0085-2 t.

Weinstock, G. M., Hardham, J. M., McLeod, M. P., Sodergren, E. J., & Norris, S. J. (1988). The genome of *Treponema pallidum*: New light on the agent of syphilis. *FEMS Microbiol Rev*. 1998;22(4):323-332.

Woods C. R. Syphilis in children: congenital and acquired. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*. 16(4):245-257. doi.org/10.1053/j.spid.2005.06.005

Workowski, K. A., & Bolan, G. A. (2015). Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports. 64(RR-03):1-137. Erratum in: *MMWR Recomm Rep*. 64(33):924.

World Health Organization Global adult estimates of chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis including maternal and congenital syphilis, 2016, WHO; 2020, 76p.

4.4 CAPÍTULO 4 - ARTIGO: “DETECTION AND MOLECULAR TYPING OF *Treponema pallidum* ISOLATES FROM SOUTHERN BRAZIL: FREQUENT HIGH OF MACROLIDE RESISTANCE”.

Detection and Molecular typing of *Treponema pallidum* isolates from southern Brazil: Frequent high of macrolide resistance

Vera Mileide Trivellato Grassi¹; Mauro Cunha Ramos²; Liliane Trivellato Grassi³; Maria Rita Castilhos Nicola⁴ Marcia Susana Nunes Silva⁵ Maria Lucia Rosa Rossetti⁶

¹ Doctorate Student in Cellular and Molecular Biology Applied to Health, Graduate Program in Health (PPGBiosaúde), Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, Brazil.

² Master's in public health, University of California, San Francisco; PhD in Dermatology, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

³ Doctorate Student in Biomedical Engineering, Universidade Brasil.

⁴ Master in Cellular and Molecular Biology Applied to Health, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, Brazil.

⁵ PhD in Biological Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), DNTech - Desenvolvimento de Novas Tecnologias LTDA. Company approved in the Spark Program/RS, financed by FINEP/FAPERGS.

⁶ PhD in Biological Sciences and Professor of Cellular and Molecular Biology Applied to Health in the Graduate Program in Health (PPGBiosaúde), Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, Brazil.

ABSTRACT

Syphilis is a sexually transmitted infection (STI) of great importance in public health in Brazil and worldwide. There is no precise diagnostic method yet, but molecular techniques have allowed the detection and genotyping of *Treponema pallidum*. In this work we detected and genotyped *T. pallidum* by the multilocus sequence typing (MLST) method we made from samples collected in a public clinic in Porto Alegre (southern Brazil). Of the 43 samples, 26 were PCR positive for syphilis, and in 20 it was possible to fully characterize the bacteria. We found four distinct allelic profiles MLST, the most common profile was 27.3.1 within only two clonal complexes (Nichols-like and SS14-

like). In addition, we also identified the A2058G mutation in the 23S rDNA gene that confers resistance to macrolide antibiotics. Of the 26 samples analyzed, only one did not have the mutation, which demonstrates a high rate of resistance to this class of antibiotic, where the best known is azithromycin. Our study showed that some strains that circulate worldwide also circulate here, such as ST 26, which has already been found in several other countries. This gives us perspectives for studies on the epidemiology of the disease, and shows that, in our region, secondary treatment option should be better evaluated.

Keywords: Genotyping, PCR, *Treponema pallidum*

INTRODUCTION

Acquired syphilis is a sexually transmitted disease, with a chronic, polymorphic and multisystemic evolution, caused by the bacterium *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. The disease can be asymptomatic, however, when clinical signs occur, they include cutaneous-mucous lesions in the primary or secondary phases, but severe and irreversible manifestations may also occur. In addition to the direct consequences, the disease is a behavioral risk marker and facilitates the transmission of HIV, mainly due to the increase in transmissibility resulting from the breakdown of the cutaneous-mucosal barrier and the presence of inflammatory cells at the level of the cutaneous-mucous lesions (Lafond & Lukehart, 2006; Carlson et al., 2011; Cohen et al., 2013; Taylor et al., 2014).

The World Health Organization (WHO), based on prevalence data from 2009 to 2016, estimated a total of 376.4 million curable Sexually Transmitted Infections (STIs), of which 6.3 million cases were syphilis (WHO, 2020).

There is an increase in incidence in high-income countries, however the impact of the disease is much greater in low- and middle-income countries. The analysis of epidemiological data on syphilis in Brazil reveals a serious situation. According to the epidemiological bulletin of the Ministry of Health, published in 2020, it is observed that acquired syphilis, a condition of compulsory notification since 2010, had its detection rate increased from 59.1 cases per 100,000 inhabitants, in 2017, to 75.8 cases per 100,000

inhabitants, in 2018. In the period from 2010 to 2018, the incidence rate of congenital syphilis increased 3.8 times, from 2.4 to 9.0 cases per 100,000 inhabitants (Brasil, 2020).

The identification of *T. pallidum* is difficult because it cannot be cultivated in usual culture media (Ageron et al., 2009), although there are advances in this sense (Edmondson et al., 2018). Thus, the diagnosis of syphilis is performed by a combination of clinical findings and laboratory tests, whose results vary according to the stage of the disease (Brasil, 2016). The most used methods can be divided into direct and serological assays (Castro et al., 2016; Brasil, 2015; Brasil, 2016; Pereira 2019).

In the last decade, molecular techniques that analyze genetic material have been used both for diagnosis and for genotyping (Brischetto et al., 2018; Theel et al., 2020). The Polymerase Chain Reaction (PCR) technique with its variations and DNA sequencing has been widely used for the detection and direct identification of *T. pallidum*, providing opportunities for genetic diversity studies to better understand the population dynamics of transmission, as well as identification of patterns of virulence and antibiotic resistance (Theel et al., 2020; Shukalek et al., 2021; Grassi et al., 2021).

Despite this, the available molecular tests are still scarce and even the lack of standardization as to the best molecular target makes its use in routine diagnosis difficult (Castro, 2004; Ageron et al., 2015; Theel et al., 2020; Shukalek et al., 2021; Grassi et al., 2021).

With the complete sequencing of *T. pallidum*, performed by Fraser et al. in 1998 (strain Nichols – GenBank AE000520.1), it was possible to evaluate new target sequences for PCR protocols and for *T. pallidum* genotyping. In recent years, the characterization of *T. pallidum* has been improved using genotyping techniques with greater discriminatory power between different genotypes, mainly related to the choice of targets with greater genomic variability. Among the loci analyzed are genes encoding outer membrane proteins (TP0136, and TP0548), virulence factors (*tpr* Genes), genes that tend to have multiple repeats (*arp* and *rpsA*), and the 23S rDNA gene related to resistance to macrolides, an alternative to the use of penicillin, the antibiotic of first choice in the treatment of syphilis (Grillova et al., 2018; Vrbova et al., 2019; Liu et al., 2021).

One of the first genotyping methods for *T. pallidum* was created in 1998 (CDC-Typing) and enhanced in 2010 (E-CDC) and is based on a combination of techniques for

analyzing regions of the *arp*, *tpr* (*tprE*, *tprG* and *tprJ*) and *tp0548* genes (Pillay et al., 1998; Marra et al., 2010; Grillova et al., 2018).

More recently, genotyping by the MLST (Multilocus Sequence Typing) method, which analyzes loci TP0136, TP0548, and TP0705 by sequencing, has obtained a better resolution in the discrimination of *T. pallidum* genotypes (Grillova et al., 2018; Liu et al., 2021). Information from MLST characterization studies of *T. pallidum* carried out in different regions of the world were used to create a database that allows epidemiological analysis to be carried out (<https://pubmlst.org/organisms/treponema-pallidum>) (Fraser et al., 1998; Pillay et al., 1998; Casal et al., 2011; Ho e Lukehart, 2011; Grillova et al., 2018; Pospisilova et al., 2018; Vrbova et al., 2019; Liu et al., 2021).

Thus, each different locus characterizes a distinct allele, and the combination of alleles defines an allelic profile and sequence type (ST). A clonal complex brings together *T. pallidum* strains with identical allelic or ST profiles (Maiden et al., 2013).

In addition to the loci analyzed by MLST, an analysis of the 23S rDNA gene can complement the identification of mutations (A2058G or A2059G) related to macrolide resistance (Molini et al., 2016).

In Brazil, molecular studies on *T. pallidum* are restricted to the diagnosis of the infection, not including genotypic studies, therefore, information on molecular epidemiology and the main strains circulating in the country is very scarce.

Thus, our study aimed to detect and genotypically analyze *T. pallidum* isolated from exudate samples from lesions suggestive of syphilis (primary or secondary) in men attending a public STI clinic.

MATERIALS AND METHODS

Men over 18 years of age with eroded or ulcerated lesions suggestive of primary or secondary syphilis treated at the STD Unit of the Sanitary Dermatology Ambulatory (SDA) were invited to participate. SDA is a public clinic that provides free care in the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul (southern Brazil). Samples of exudate from the lesions were collected between July 2019 and March 2020, using cotton swabs soaked in a 0.9% sodium chloride solution.

Data were allocated in Excel spreadsheets, processed, and analyzed. Bioinformatics analyzes were performed using the MEGA X (IGEM, Cambridge, UK) software and the online tool iTOL (Biobyte, Heidelberg, Germany).

The project was initiated after approval by the Ethics Committee of the Escola de Saúde Pública do Rio Grande do Sul under number 3,232,889, in accordance with Resolution 466 of 2012 of the National Health Council.

For extraction, the PureLink® Genomic Kit (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific, California, USA) was used according to the protocol provided by the manufacturer. Briefly, 200 µl of biological sample were used, in proteinase K and RNase A solution and buffers for cell lysis. After releasing the DNA, it was stored at a temperature of -20°C until use.

Detection of *T. pallidum* was performed using the conventional PCR technique using primers KO3 (5' GAAGTTTGTCCCAGTTGCGGTT-3') and KO4 (5'CAGAGCCATCAGCCCTTTTCA 3') which amplify a 260 bp segment of the *tpp47* gene as described by Palmer et al., 2003.

The samples were prepared and submitted to the conditions established by the author, for DNA amplification. A mixture was prepared with 10X buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTPs, 25 pmol of each primer and 1.25 U of *Taq platinum* DNA polymerase enzyme (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, California, USA). An initial denaturation was performed at 95°C for 2 minutes, followed by a denaturation at 95°C for 20 seconds, 62°C for 20 seconds and 72°C for 20 seconds for 35 cycles, and a final extension at 72° C for 5 minutes. Amplification was performed in a thermocycler device MJ Research PTC 96 (Bioer Technology, China).

The PCR result was analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel containing 0.05% ethidium bromide and visualized under ultraviolet light. Positive controls (*T. pallidum* DNA from already sequenced samples) and negative controls (ultrapure water) were used for each PCR reaction.

After the molecular detection of *T. pallidum*, the PCR positive samples went on to the molecular characterization and identification step using the MLST method as described by Grillova et al., 2018. The following target genes were used to verify macrolide resistance: TP0136, TP0548 eTP0705 and 23SrDNA.

Nested PCR was performed with the final mixture of 50 µl in two steps, with the first mixture consisting of 10X buffer, 2.0 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTPs, 1.2 µl of primer at 10 pmol and 1.25 U of *Taq platinum* DNA polymerase enzyme (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, California, USA) and 10 µl of extracted DNA. An initial denaturation was performed at 95°C for 5 minutes, followed by a denaturation at 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds and 72°C for 2 minutes, for 35 cycles, and a final extension at 72° C for 7 minutes. The second PCR contained the same mixture but using 5 µl of the amplified product from the first reaction. An initial denaturation was performed at 95°C for 5 minutes, followed by a denaturation at 95°C for 30 seconds, 62°C for 30 seconds and 72°C for 1 minute and 30 seconds, for 35 cycles, and a final extension at 72 °C for 7 minutes. All amplifications were performed in the MJ Research PTC 96 thermocycler.

The sequencing was performed by the company ACTGene Análises Moleculares (Porto Alegre – RS - BR) through DNA sequencing obtained from the final PCR products of each sample.

Analyzes of these contigs sequences were performed using the Bioedit software (Tom Hall, Ibis Biosciences, Calsbad, Ca, USA). Alignment was performed using the MEGA X software(IGEM, Cambridge, United Kingdom). The concatenation of the three sequences of the TP0136, TP0548 and TP0705 alleles were performed using the MEGA X software. The phylogenetic tree was constructed using the maximum likelihood method using the MEGA X software and editing of the tree was made using the online tool iTOL (Biobyte, Heidelberg, Germany).

RESULTS

Of the 43 samples analyzed, in 26 (60.46%) it was possible to detect *T. pallidum* by PCR. The age of the patients ranged from 19 to 66 years old, all living in the metropolitan region of Porto Alegre-RS.

Of the 26 positive samples, it was possible to sequence all for TP0705, 23 for TP0136 and 22 for TP0548. In 25 samples, the 23S rRNA gene was sequenced (Table 1).

Table 1: Typing of *T. pallidum* by MLST.

Sample	MLST – 136	MLST - 548	MLST-705	23S rRNA ¹	MLST ²	ST ³	Clonal complex
1	27	3	1	R	27.3.1	81	SS14-Like/undefined
8	9	7	3	R	9.7.3	26	Nichols-like
9	1	3	1 ou 7	R	1.3.7	1 ou 16	SS14-like
10	1		1	R	1,x,1		
11	27	3	1	R	27,3,1	81	SS14-Like/undefined
12	27	3	1	R	27.3.1	81	SS14-Like/undefined
13	27	3	1	R	27.3.1	81	SS14-Like/undefined
16	9	7	3	R	9.7.3	26	Nichols-like
18	27	3	1	R	27.3.1	81	SS14-Like/undefined
19	27	3	1	R	27.3.1	81	SS14-Like/undefined
20	27	3	1 ou 7	R	27.3.7	81 ou ?	SS14-Like/undefined
21		7	3	R	x,7,3		
22	9	7	3	R	9.7.3	26	Nichols-like
25			3	S			
27	27	3	1	R	27.3.1	81	SS14-Like/undefined
28	27	3	1	R	27.3.1	81	SS14-Like/undefined
29	9	7	3	R	9.7.3	26	Nichols-like
30	27	3	1	R	27.3.1	81	SS14-Like/undefined
32	27	3	1	R	27.3.1	81	SS14-Like/undefined
34	27		1		27,x,1		
35	27		1	R	27,x,1		
36	9	7	3	R	9.7.3	26	Nichols-like
38	27	3	1	R	27.3.1	81	SS14-Like/undefined
39	27	3	1	R	27.3.1	81	SS14-Like/undefined
40	27	3	1	R	27.3.1	81	SS14-Like/undefined
42		3	1	R	x.3.1		

¹ Macrolide antibiotic resistance coding locus: S = sensitive, R = resistant with A2058G mutation

² Allelic profiles based on sequences from TP0136, TP0548 and TP0705

³ ST: Sequence Type. According to the PubMLST database of *Treponema pallidum* subsp. *Pallidum*

Only 20 DNAs had an identification of MLST typing, ST (sequence type) and clonal complex, since they are only assigned when the three loci are characterized.

It was possible to identify only two clonal complexes or strains, 5 (25%) belonged to the Nichols-like clonal complex and 15 (75%) to the SS14-like.

Some approximations can be made in relation to the clonal complex using the results of two loci through the pubmlst.org database. In two samples (9 and 20) the region that distinguishes alleles 1 and 7 of the TP0705 gene was not sequenced with quality, so it was not possible to distinguish, and all samples classified as allele 27 in TP0136 had A>G in the position 634, which is a characteristic of allele 1. This mutation causes the MLST profile of these samples to be approximation based, and so they were classified as belonging to the clonal complex SS14 but could also belong to another undefined complex. To clarify these discrepancies, we would need to do a full sequencing of these samples. The two samples in which it was not possible to distinguish allele 1 from 7 were more similar to the SS14-Like strain, with sample 9 being ST 1 or 16 and sample 20 being ST 81 or a new ST. All 13 samples that we achieved complete characterization with the ST 81 were most similar to the SS14-Like strain.

Only one sample did not have the 2058 mutation in the 23S rRNA gene that causes macrolide resistance, precisely a sample that we were unable to complete the typing for the characterization of the clonal complex.

A phylogenetic tree of the allelic profiles found was assembled. The allelic profile 9.7.3 corresponds to the Nichols-like strain, all the other profiles found as the 27.3.1 corresponds to a strain with similarities to SS14 or to an undefined complex, whereas the profile sample 9, which can be 1.3.1 or 1.3.7, has a greater similarity to strain SS14. Sample 20, which has profile 27.3.1 or 27.3.7, also resembles strain SS14 or an indefinite complex, as shown Figure 1.

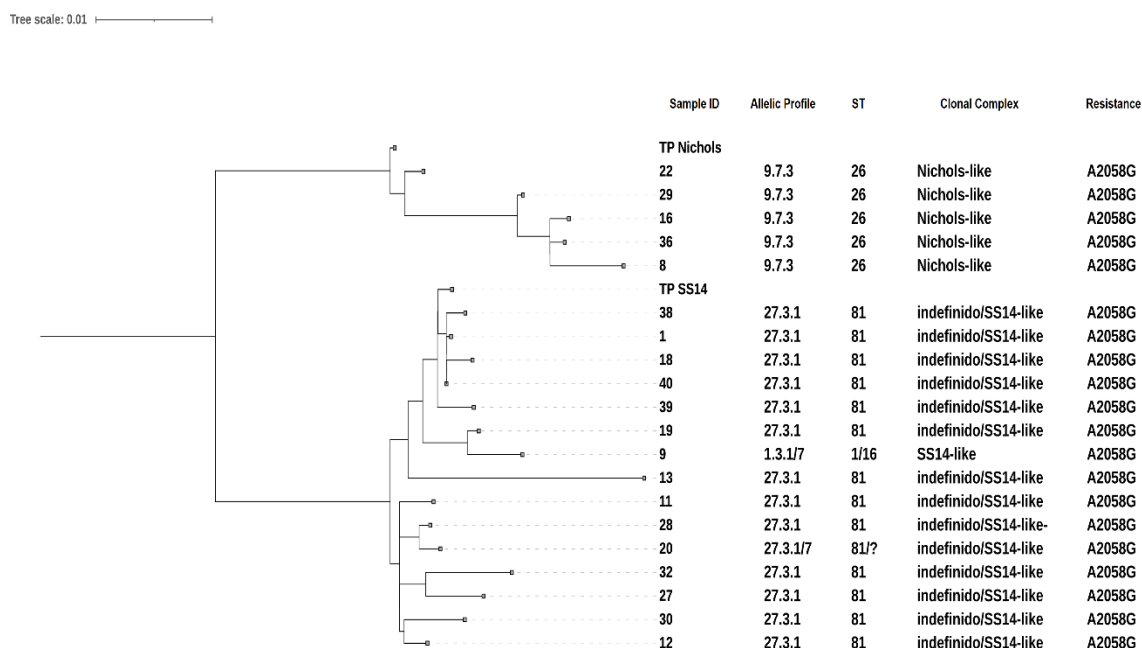


Figure 1: **Phylogenetic tree of genotyped allelic profiles.** The tree was built using the maximum likelihood method using the MEGA X software and the editing of the tree was done using the online tool iTOL. Partially typed genotypes were excluded.

The scale shows that samples 16, 36 and 8 are more related than samples 29 and 22, the latter more related to the Nichols strain. With the exception of sample 13, all others are more related to the SS14 strain.

DISCUSSION

The technique used in this study showed that detection of *T. pallidum* by PCR in a proportion of (26/43). The diagnosis of syphilis by clinical aspects and other methods is presumptive, which makes it difficult to interpret the presence of almost half of patients in whom DNA has not been identified. The establishment of specificity and sensitivity of the method was not part of the study objective. It is known that the use of tropical and systemic antibiotics before the moment of consultations is a frequent practice, which could decrease the presence of the microorganism in the exudate (Brasil, 2021). Since syphilis is a self-limited disease and, as the evolutionary status of the lesion's advances, there is also a reduction in the presence of *T. pallidum* and lesions. Finally, the unavailability of rapid immunochromatographic tests for all patients impairs the

diagnostic conclusion and, in addition, it is known that many patients with syphilis at the beginning of infection have negative results in these tests. Serological follow-up with non-treponemal tests could be useful, but it is known that many patients with syphilis do not return to services.

The SARS-COV2 pandemic has impaired care to people with STIs. Our service was not an exception and the impact on its operation justifies the limitation of the sample size. The usefulness of PCR for the diagnosis of primary and secondary syphilis has been extensively demonstrated. This higher positivity for cases of syphilis compared to serological tests has been found in other studies (Vrbova et al., 2020 and Wang et al., 2018). In ours, it was not possible to make a comparison between these two assays since few patients had the results of the available serological tests. Regarding the PCR results, these were all confirmed by sequencing at least some target locus.

In our study, two MLST profiles of *T. pallidum* were found (9.7.3 and 27.3.1), and in two samples we have an approximation profile (1.3.1/7 and 27.3.1/7), thus finding a total of four profiles in this study. The reduced number of analyzed *T. pallidum* DNAs makes a better understanding difficult, but it is likely that there are not many different strains circulating in this region. The MLST 9.7.3 profile was also found in studies with samples from the Czech Republic and France, showing that there is a worldwide dissemination of some strains of syphilis (Vrbova et al., 2019; Grillova et al., 2019). This allelic profile (9.7.3) that corresponds to the U3U6 genotype, based on the SBMT that was also found in Argentina (Vaulet et al., 2017), and to the subtype “g” ECDCT – TP0548 (Pospisilova et al., 2018), which also was found in Switzerland, France, Italy, and the United Kingdom (Grillova et al., 2018; Pospisilova et al., 2018; Giacani et al., 2018; Tipple et al., 2011). In Argentina, the most common subtype was the “f” ECDCT – TP0548 (Vaulet et al., 2017).

All *T. pallidum* samples found in this study belonged to the clonal complex SS14 (75%) and to Nichols-like (25%). The same clonal complexes have been found in other studies, such as in Argentina, a country that borders our state (Vaulet et al., 2017; Pospisilova et al., 2018; Grillova et al., 2018; Vrbova et al., 2019).

The absence of effectiveness of azithromycin has been repeatedly demonstrated clinical studies. The mutation that confers resistance to macrolides (A2058G) was identified in 96.15% , only one sample proved to be sensitive. The presence of this

mutation was previously demonstrated by Grillova et al. al., 2014; Grillova et al., 2017; Vrbova et al., 2018. These studies also demonstrated a significant increase in the proportion of this resistance. Has had a significant increase over the years. Similarly, resistance to macrolides is present in the United Kingdom (Tipple et al., 2011) and Cuba (Grillova et al., 2017). Vaulet et al., 2017 identified a lower proportion of resistance in Argentina.

CONCLUSIONS

This study showed that the detection of *T. pallidum* by PCR and its characterization by MLST can be important to help in clinical medicine, and in disease control.

Our study found four allelic profiles, belonging to the two best known clonal complexes, SS14 and Nichols. Allelic profiles that are also present in other regions of the world were also found (27.3.1 and 9.7.3), showing that the bacterium has a worldwide spread. Also, a high rate of *T. pallidum* (96.15%) was detected with the A2058G mutation in the 23SrDNA gene, which causes resistance to the macrolide class of antibiotics. This shows that we must be cautious in using this antibiotic in the treatment of syphilis

Due to the small number of samples used, it is necessary to complement these results with further work in the area.

ACKNOWLEDGMENT

This work was carried out with the support of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), funding code 001, for granting a study fee for the realization of the doctorate of VMT Grassi; This project was funded by the Ministry of Health of Brazil through a PAHO Agreement Letter Number SCON00400/; the team and management of the Sanitary Dermatology Ambulatory of Porto Alegre, for collecting the material, and all the evaluators who voluntarily made themselves available to carry out the assessment of the guidelines under study.

REFERENCES

Ageron AG, Laurent F, Schrenzel J, Charton B, Getaz GJ, Tangomo M, Tristan B, Sednaoui P, Lautenschlager S, Trelu LT, Tejada BM, Cavassini M, Emonet S, Perneger T, Salord H, Performance of the 47 kilodalton membrane protein versus DNA Polymerase I genes for detection of *Treponema pallidum* by PCR in ulcers. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015 Mar; 53(3): 976-80. DOI: 10.1128/JCM.03444-14

Ageron AG, Ninet B, Trelu LT, Lautenschlager S, Furrer H, Piguet V, Schrenzel J, Hirschel B. Assessment of a Real Time PCR to Diagnose Syphilis from diverse biological sample. *Sexually Transmitted Infections*. 2009 Aug; 85(4): 264-9. DOI: 10.1136/sti.2008.034314

Brasil et al., 2016. *Manual Técnico para o Diagnóstico da Sífilis*. Ministério da Saúde - PNCQ.

Brasil, Boletim Epidemiológico da Sífilis. Ministério da Saúde, 2020.

Brasil, M.d.S.-, 2015. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecção Sexual Transmissível.

Brischetto A, Gassiep I, Whiley D, Norton R. Retrospective review of *Treponema pallidum* PCR and serology results: are both tests necessary? *Journal of Clinical Microbiology*. 2018; v.56 n.5: p.1-7. DOI: 10.1128/JCM.01782-17. Doi.org/10.1128/JCM.01782-17.

Carlson JA, Dabiri G, Cribier B, Sell S. The immunopathology of syphilis: The manifestation and course of syphilis are determined by the level of delayed – Type hypersensitivity. *Institutes National of health – The American Journal of Dermatopathology*. 01, Jul, 2011; 33(5): 433-460. DOI: 10.1097/dad.0b013e3181e8b587

Casal, CAD, Silva, MOD, Costa, IB, Araujo, EDC, Corvelo TCO. Molecular detection of *Treponema pallidum* sp. *pallidum* in blood sample of VDRL seroreactive women with lethal pregnancy outcomes: a retrospective observational study in a northern Brazil, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2011; vol 44, no. 4: pp. 451-456. Epub 22 July 2011. ISSN 1678-9849. DOI/10.1590/S0037-86822011005000047

Castro MRTd. Contribuição para o estudo da infecção por *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*: Resposta sorológica, Diagnóstico Molecular e Genotipagem. Dissertação de Doutorado. Lisboa - Portugal (LISBOA): Universidade Nova Lisboa; 2004.

Castro R, Aguas MJ, Batista T, Araujo C, Mansinho K, Pereira FdLM. Detection of *Treponema pallidum* Sp. *pallidum* DNA in Cerebrospinal Fluid (CSF) by to PCR Techniques. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2016; 30: 628-632. DOI 10.1002/jcla.21913

Cohen SE, Klausner JD, Engelman J, Philip S. Syphilis in the modern era: an update for physicians. *Infectious Diseases Clinics of North America*. 2013 Dec; 27(4): 705-22. DOI: 10.1016/j.idc.2013.08.005. PMID: 24275265.

Fraser C M, Norris S J, Weinstock G M, White O, Sutton G G, Dodson R, Sodergreen E. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science*. 17 jul 1988; vol 281, no. 5375: pp. 375-388. DOI: 10.1126/science.281.5375.375

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. *Sexually Transmitted Diseases*. 2018; 45: 237–242. DOI.org/10.1097/OLQ.0000000000000741 PMID: 29465698

Naveca FG, Sabidó M, Almeida TAP, Veras EA, Mejía MDCC, Galban E, Benzaken AS. Etiology of genital ulcer disease in a sexually transmitted infection reference center in Manaus, Brazilian Amazon. *PLoS One*. 2013; 8(5). DOI.org/10.1371/journal.pone.0063953

Grassi VMT, Grassi LT, Rossetti MLR. Uma revisão das técnicas de detecção molecular de *Treponema pallidum*, qual a mais eficaz. *Research, Society and Development*. 2021; v. 10, n. 9: p. e59310918478, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i9.18478

Grillova L, Jolley K, S`majs D, Picardeau M. A public database for the new MLST scheme for *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*: surveillance and epidemiology of the causative agent of syphilis. *PeerJ*. 2019; 6: e6182. DOI.org/10.7717/peerj.6182 PMID: 30643682

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: e0200773. DOI.org/10.1371/journal.pone.0200773 PMID: 30059541

Grillova` L, Noda AA, Lienhard R, Blanco O, Rodrı́guez I, S`majs D. Multilocus sequence typing of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Cuba from 2012 to 2017. *The Journal of Infectious Diseases*. 2018. DOI.org/10.1093/infdis/jiy604 PMID: 30325448

Grillova` L, Pětros`ova` 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. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; 52: 3693–3700. DOI.org/10.1128/JCM.01292-14 PMID: 25100820

HO Emily L & Lukerhart Sheila A. Syphilis using modern approaches to understand an old disease. *The journal of clinical investigation*. 2011 Dez; 121(12): 4584-92. DOI: 10.1172/JCI57173. Epub 2011 Dez 1. PMID: 22133883; PMCID: PMC3225993

Lafond RE, Lukehart SA. Biological basis for syphilis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006 Jan; 19(1): 29-49. DOI:10.1128/CMR.19.1.29-49.2006. PMID: 16418521; PMCID: PMC1360276.

Liu D, He SM, Zhu XZ, Liu LL, Lin LR, Niu JJ, Yang TC. Molecular Characterization Based on MLST and ECDC Typing Schemes and Antibiotic Resistance Analyses of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Xiamen, China. *Frontiers in cellular and*

infection microbiology. 2021; 10: 618747. DOI: 10.3389/fcimb.2020.618747. 33680984; PMID: PMC7935548.

Luo Y, Xie Y, Xiao Y. Laboratory Diagnostic Tools for Syphilis: Current Status and Future Prospects. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021; 8;10:574806. DOI:10.3389/fcimb.2020.574806. PMID: 33628742; PMID: PMC7897658.

Maiden MCJ, Jansen van Rensburg MJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, McCarthy ND. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nature Reviews Microbiology*. 2013; 11:728–736 DOI 10.1038/nrmicro3093.

Marra, C., Sahi, S., Tantaló, L., Godornes, C., Reid, T., Behets, F., et al. Enhanced molecular typing of *Treponema pallidum*: geographical distribution of strain types and association with neurosyphilis. *The Journal of Infectious Diseases*. 2010; 202 (9): 1380–1388. DOI: 10.1086/656533

Molini BJ, Tantaló LC, Sahi SK, et al. Macrolide Resistance in *Treponema pallidum* Correlates With 23S rDNA Mutations in Recently Isolated Clinical Strains. *Sexually Transmitted Diseases*. 2016; 43(9): 579-583. DOI:10.1097/OLQ.0000000000000486

Oliveira P C B F. Sífilis: diagnóstico e identificação molecular de amostras clínicas de pacientes com apresentação atípica. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação Stricto Sensu em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal Fluminense. Universidade Federal Fluminense; 2016.

Palmer H M, Higgins S P, Herring AJ, Kingston M A. Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. *Sexually Transmitted Infections*. 2003;79:479-83. DOI.org/10.1136/sti.79.6.479

Peng RR, Wang AL, Li J, Tucker JD, Yin YP, Chen XS. Molecular typing of *Treponema pallidum*: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2011; 5(11):e1273. DOI.org/10.1371/ journal.pntd.0001273 PMID: 22087340

Pereira JB, Barbosa Júnior WL, Silva ED, Aquino AECA, Oliveira PMS, Melo FL, Comparação de técnicas de extração de DNA de *Treponema Pallidum* para o diagnóstico molecular da sífilis, *Brazilian Journal of Health Review*. 2019; Curitiba, v. 2, n. 4: p. 3681-3697. DOI:10.34119/bjhrv2n4-131

Pillay A, Liu H, Chen C Y, Holloway B, Sturm A W, Steiner B, Morse SA. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. *Sexually Transmitted Diseases*. 1998; 25 (8): 408–414. DOI: 10.1097/00007435-199809000-00004

Pospisilova´ P, Grange PA, Grillova´ L, Mikalova´ L, Martinet P, Janier M, Vermersch A, Benhaddou N, Del Giudice P, Alcaraz I, Truchetet F, Dupin N, Šmajš D. 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: e0201068. DOI.org/10.1371/journal.pone.0201068 PMID: 30024965

Shukalek CB, Lee B, Fathima S, Chu A, Fonseca K and Somayaji R. Comparative Analysis of Molecular and Serologic Testing for Primary Syphilis: A Population-Based

Cohort Study. *Frontiers in Cellular Infection Microbiology*. 2021;11:579660. DOI: 10.3389/fcimb.2021.579660

Taylor MM, Li WY, Skinner J, Mickey T. Viral loads among young HIV-infected men with early syphilis. *Journal of the International Association of Providers of AIDS Care*. 2014;13(6):501-5. DOI: 10.1177/2325957414536229. Epub 2014 Jun 4. PMID: 24899260; PMCID: PMC6754093.

Theel ES, Katz SS, Pillay A. Molecular and Direct Detection Tests for *Treponema pallidum* Subspecies *pallidum*: A Review of the Literature, 1964-2017. *Clinical Infectious Diseases*. 2020; 71(Suppl 1):S4-S12. DOI: 10.1093/cid/ciaa176. PMID: 32578865; PMCID: PMC7312206.

Tipple C, McClure MO, Taylor GP. High prevalence of macrolide resistant *Treponema pallidum* strains in a London centre. *Sexually Transmitted Infections*. 2011; 87: 486–8. DOI.org/10.1136/sextrans-2011-050082 PMID: 21917695

Valet LG, Grillova L, Mikalova L, Casco R, Rodríguez Fermepin M, Pando MA, Šmajš D. 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. DOI:10.1371/journal.pone.0172905

Vrbova E, Grillova L, Mikalova L, Pospíšilová, P., Strnadel, R., Dastychová, E., Kojanová, M., Kreidlová, M., Vaěousová, D., Rob, F., Procházka, P., Krchěáková, A., Vaška, V., Woznicová, V., Dvořáková Heroldová, M., Kuklová, I., Zákoucká, H., & Šmajš, D. MLST typing of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in the Czech Republic during 2004-2017: Clinical isolates belonged to 25 allelic profiles and harbored 8 novel allelic variants. *PLoS ONE*, 2019; 14(5): e0217611. [DOI.org/10.1371/journal.pone.0217611](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217611)

Wang C, Cheng Y, Liu B, Wang Y, Gong W, Qian Y, Guan Z, Lu H, Gu X, Shi M e Zhou P. Sensitive detection of *Treponema pallidum* DNA from the whole blood of patients with syphilis by the nested PCR assay. *Emerging Microbes & Infections*, 2018; 7:1, 1-7, DOI: 10.1038/s41426-018-0085-2 t.

World Health Organization Global adult estimates of chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis including maternal and congenital syphilis, 2016; Geneva, WHO; 2020, 76p.

5 DISCUSSÃO

Como ainda hoje não existe um método padrão ouro para o diagnóstico da sífilis e entre os testes moleculares também não existe um consenso, padronizamos um teste com PCR convencional utilizando como alvo o gene *tpp47*, com os *primers* KO3 e KO4, citados por Palmer et al., 2003. Como o sucesso dos métodos de detecção molecular depende da obtenção de DNA a partir de amostras clínicas em quantidade e qualidade adequadas para reações moleculares, o estudo teve como objetivo analisar três métodos de extração de DNA de *T. pallidum* de úlceras de pacientes investigados por sífilis. Os três métodos, um *in house* (sonicação) e dois comerciais, LGC (São Paulo, Brasil) e o PureLink® Mini Kit de DNA Genômico (Thermo Fisher Scientific, EUA) foram comparados ao sequenciamento dessas amostras, que foram utilizados como referência. Cada método foi avaliado com base na detecção de *T. pallidum* por PCR, na quantificação de DNA e tempo de execução do método. A sensibilidade e concordância dos métodos Purelink, sonicação e LGC ao DNA extraído foram de 100% (K=1,0), 96,5% (K=0,96) e 72,4% (K=0,694), respectivamente. A especificidade foi de 100% com os três métodos.

Em relação à concentração de DNA, os resultados obtidos neste estudo mostraram que ambos os kits comerciais tiveram um bom desempenho, sendo que o Purelink® e a LGC apresentaram significativamente maior concentração de DNA (47,65 ng/μl, 37,96 ng/μl, respectivamente) quando comparados ao método de sonicação ($p < 0,01$). Resultados semelhantes também foram obtidos por Moura et al., 2016 quando analisaram nove técnicas diferentes de extração de DNA, e os kits comerciais apresentaram resultados mais bem sucedidos.

O uso de kits comerciais geralmente proporcionam maior reprodutibilidade, controle de qualidade e potencial de automação. No entanto, o seu custo é alto para países em desenvolvimento, como o Brasil. O uso do método de sonicação tem sido utilizado para extração de DNA de outras bactérias e os resultados são muito promissores (Bierhals et al., 2020; Bello et al., 2020). Dai e colaboradores (2016) concluíram também que a sonicação seria considerada mais promissora e eficiente para a decomposição homogênea da célula em um curto período.

Quando avaliamos a praticidade, nosso estudo mostrou que os três métodos demoram quase o mesmo tempo, mas quando levamos em conta o custo, a sonicação é

muito mais vantajosa para o laboratório. Nossos achados são diferentes dos encontrados por Pereira et al. (2019), onde os métodos *in house* foram menos práticos pois utilizaram vários reagentes que necessitavam de preparação prévia, o que dificultou o uso da técnica.

O método de sonicação foi o mais próximo na concentração do DNA ao método purelink usado como método de referência, com grau de pureza semelhante, além de ter a menor relação custo-benefício. Pode ser uma opção interessante para laboratórios que trabalham com custos reduzidos, já que é muito mais acessível.

Uma das formas da sífilis é a congênita (SC), e seu diagnóstico é difícil e atualmente é feito por uma combinação de critérios clínicos e laboratoriais. O estudo analisou a detecção de *T. pallidum* por PCR para o diagnóstico da SC em recém-nascidos (RN) a partir de sangue fixado em cartão (SFC) e comparou com RN com suspeita de SC e com PCR de LCR (líquido cefalorraquidiano) positivo (padrão de referência) e controles. A sensibilidade encontrada foi de 63% e está dentro do que tem sido relatado (14% a 63%) em PCRs com sangue e derivados (soro, plasma), independentemente do estágio clínico em que os pacientes se encontravam (Wang et al., 2018). A concordância entre os testes foi substancial ($K=0,619$), mostrando que o SFC pode ser usado para detectar o *T. pallidum*. A especificidade do PCR foi de 100%, o que o torna importante para a exclusão de um falso positivo como caso de SC.

Não foram encontrados estudos com SFC para detecção do *T. pallidum*, mas um tipo de papel filtro, o cartão de Guthrie (teste do pezinho), já é utilizado com sucesso na triagem neonatal de várias doenças, e o cartão Whatman (FTA- *Elute* ou *Classic*) já faz parte da detecção de outros agentes biológicos (Bankamp et al., 2019; Ali et al., 2020; Mota et al., 2021).

Em outra etapa do nosso estudo detectamos a presença do *T. pallidum* em amostras coletadas no Ambulatório de Dermatologia Sanitária de Porto Alegre. De 43 amostras foi possível detectar a presença da bactéria em 26, sendo que essas amostras eram de lesões sugestivas de sífilis. Como não havia um teste sorológico comprovando a doença em todos os pacientes, dos dez pacientes com testes sorológicos (Teste rápido ou VDRL), sete eram positivos, e em seis desses pacientes foi possível a confirmação do diagnóstico pelo PCR. A única amostra que não se confirmou tinha teste rápido positivo, mas era negativo no VDRL, podendo ser então uma cicatriz sorológica, o que comprovaria que o

paciente não tinha a bactéria circulando no seu organismo, e sim apenas anticorpos por um contato anterior com a bactéria.

O estudo mostrou que a detecção de *T. pallidum* por PCR é um método viável, e ajuda no diagnóstico da sífilis nos casos de pacientes com úlceras. O presente estudo encontrou uma alta taxa da doença, o que já era esperado, visto que nossos pacientes tinham sintomatologia, porém nem todos tinham testes sorológicos positivos, o que também foi encontrado nos estudos de Vrbova et al., 2020 e Wang et al., 2018.

Neste estudo encontramos quatro perfis MLST de *T. pallidum*, dois perfis completos (9.7.3 e o 27.3.1), e em duas amostras o perfil foi feito por aproximação (1.3.1/7 e 27.3.1/7). O perfil MLST 9.7.3, também, foi encontrado em estudos com amostras da República Tcheca e França, mostrando que ocorre uma disseminação mundial de algumas cepas de sífilis (Vrbova et al., 2019; Grillova et al., 2019). Este perfil alélico (9.7.3) corresponde ao genótipo U3U6 baseado no SBMT que também foi encontrado na Argentina (Vaulet et al., 2017) e ao subtipo “g” ECDCT – TP0548 (Pospisilova et al., 2018), que também foi encontrado na Suíça, França, Itália e Reino Unido (Grillova et al., 2018; Pospisilova et al., 2018; Giacani et al., 2018; Tipple et al., 2011). Na Argentina o subtipo mais encontrado foi o “f” ECDCT – TP0548 (Vaulet et al., 2017).

Neste estudo, todas as amostras de *T. pallidum* pertenciam aos dois complexos clonais mais conhecidos: SS14-like (75%) e Nichols-like (25%). Os mesmos resultados foram encontrados em outros estudos, como na Argentina, Reino Unido, República Tcheca e outros (Vaulet et al., 2017; Pospisilova et al., 2018; Grillova et al., 2020; Vrbova et al., 2019).

Quanto a presença da mutação A2058 do gene 23S rDNA, que confere resistência a macrolídeos, detectamos que 96,15% de amostras avaliadas demonstraram resistência. Apenas uma amostra se mostrou sensível, o que mostra que a opção por tratamento com azitromicina é inviável, como encontrado em outros estudos (Grillova et al., 2014; Grillova et al., 2017; Vrbova et al., 2019), onde a porcentagem de amostras resistentes tem tido um aumento significativo ao longo dos anos. Vários outros estudos também mostraram que a resistência a macrolídeos está na maioria das amostras, como os estudos conduzidos no Reino Unido e Cuba, respectivamente (Tipple et al., 2011; Grillova et al.,

2017). Já no estudo de Vaulet et al., 2017, na Argentina, foi encontrada um maior número de amostras sensíveis aos macrolídeos.

6 CONCLUSÃO.

Os resultados do presente estudo permitiram concluir que a detecção do *T. pallidum* por PCR é viável, sendo uma alternativa para o diagnóstico de sífilis, tanto na forma adquirida quanto na congênita, e que a forma de extração do DNA tem muita influência no resultado do teste, além de que o método deve ser sempre o mais adequado ao material biológico que será investigado.

Mostramos também que algumas cepas do *T. pallidum* tem circulação mundial, mas que na nossa região não existe muita variabilidade. Quanto a resistência aos antibióticos macrolídeos, encontramos a mutação no DNA que causa a resistência, na grande maioria de *T. pallidum* extraído das amostras, o que aponta para a necessidade de adequar o tratamento de segunda escolha para essa doença, pois a presença da mutação indica que o uso desta classe de antibióticos é ineficaz no tratamento desta doença. E mostramos que a avaliação do genotípica da bactéria é importante para avaliar um caso de reinfecção ou coinfeção.

Neste estudo foram encontradas algumas limitações, como o pequeno número de amostras coletadas, isso em função da pandemia do Covid-19, que impossibilitou a continuidade das consultas, e não conseguimos avaliar a associação com informações clínico-epidemiológicas dos pacientes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ageron 1 AG, Laurent F, Schrenzel J, Charton B, Getaz GJ, Tangomo M, Tristan B, Sednaoui P, Lautenschlager S, Trelu LT, Tejada BM, Cavassini M, Emonet S, Perneger T, Salord H, Performance of the 47 kilodalton membrane protein versus DNA Polymerase I genes for detection of *Treponema pallidum* by PCR in ulcers. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015; 53(3):976-80. DOI: 10.1128/JCM.03444-14.

Ageron 2 AG, Sednaoui P, Lautenschlager S, Ferry T, Toutous-Trelu L, Cavassini M, Yasser F, Tejada BM, Emonet S, Combescure C, Schrenil J, Perneger T. Use of *Treponema pallidum* PCR in Testing of Ulcers for Diagnosis of Primary Syphilis. *Emerging Infectious Diseases*. 2015;21(1):127-129. DOI.org/10.3201/eid2101.140790

Ageron AG, Ninet B, Trellu LT, Lautenschlager S, Furrer H, Piguet V, Schrenzel J, Hirschel B. Assessment of a Real Time PCR to Diagnose Syphilis from devers biological sample. Sexually Transmitted Infections. 2009; Ago; 85(4):264-9. DOI:[10.1136/sti.2008.034314](https://doi.org/10.1136/sti.2008.034314)

Ali N, Bello GL, Rossetti MLR, Krieger MA, Costa ADT. Demonstration of a fast and easy sample-to-answer protocol for tuberculosis screening in point-of-care settings: A proof of concept study. PLoS ONE. 2020; 15(12): e0242408. DOI:[10.1371/journal.pone.0242408](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242408)

Araújo CL de, Shimizu HE, Sousa AIA de, Hamann EM. Incidence of congenital syphilis in Brazil and its relationship with the Family Health Strategy. Revista de Saúde Publica. 2012; 46(3):479-86. DOI: 10.1590/s0034-89102012000300010. PMID: 22635036.

Araújo CL de, Shimizu HE, Sousa AIA de, Hamann EM. Incidence of congenital syphilis in Brazil and its relationship with the Family Health Strategy. Revista de Saúde Publica. 2012; 46(3): 479-86. DOI:10.1590/s0034-89102012000300010. PMID: 22635036.

Bankamp B, Sein C, Pukuta- Simbu E, Anderson R, Abernathy E, Chen MH, Muyembe-Tamfum JJ, Wannemuehler KA, Waku-Kouomou D, Lopareva EN, Icenogle JP, Rota PA, Goodson JL. Use of FTA cards to transport throat swabs and oral fluid samples for molecular detection and genotyping of measles and rubella viruses. Journal of Clinical Microbiology. 2019; 57:e00048-19. DOI:[10.1128/JCM.00048-19](https://doi.org/10.1128/JCM.00048-19)

Benzaken AS, Fernando G, Pereira M, Moreno F, Souza A De. Adequacy of prenatal care , diagnosis and treatment of syphilis in pregnancy : a study with open data from Brazilian state capitals Adequação de atendimento pré-natal , diagnóstico e tratamento da sífilis gestacional : um estudo com dados abertos de capit. Cadernos de Saúde Pública. 2020; 36(1):1-13, e00057219. ISSN 1678-4464. DOI/10.1590/0102-311X00057219

Berger JR, Dean D. Neurosyphilis. In: Handbook of clinical neurology. 2014 p. 1461–72.

Bierhals, Nayanna D.; Brixner, Betina; Silva, Karoline D.; Oliveira, Caio F.; Renner, Jane DP. Extração de dna genômico bacteriano: uma comparação de métodos comerciais e in house. Revista Saúde Sta. Maria. 2020; 46 (2). DOI: 10.5902/2236583441122

Brasil, M.d.S. Boletim Epidemiológico da Sífilis.2021.

Brasil. Manual Técnico para o Diagnóstico da Sífilis. Ministério da Saúde-PNCQ; 2016.

Brasil. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecção Sexual Transmissível. 2015.

Brasil. Protocolo Clinico e Diretrizes Terapeuticas Para Prevencao Da Transmissão Vertical de HIV, Sífilis e Hepatites Virais. 2019.

Brasil. Sífilis – Estratégias para diagnóstico no Brasil. Apostila. Ministério da Saúde. 2010.

Brischetto A, Gassiep I, Whiley D, Norton R. Retrospective review of *Treponema pallidum* PCR and serology results: are both tests necessary? *Journal of Clinical Microbiology*. 2018; p.1-7, v.56 n.5. 56:e01782-17. Doi.org/10.1128/JCM.01782-17.

Buffet M, Grange P A, Gerhardt P, Carlotti A, Calvez V, Bianchi A, Dupin N. Diagnosing *Treponema pallidum* in secondary syphilis by PCR and immunohistochemistry. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007; v 127, Issue 10: p 2345-2350, ISSN 0022-202X, DOI/10.1038/sj.jid.5700888.

Carlson JA, Dabiri G, Cribier B, Sell S. The immunopathobiology of syphilis: the manifestations and course of syphilis are determined by the level of delayed-type hypersensitivity. *The American Journal of Dermatopathology*. 2011; 33(5):433-460. DOI: 10.1097/dad.0b013e3181e8b587.

Caruso G, Giammanco A, Virruso R, Fasciana T. Current and Future Trends in the Laboratory Diagnosis of Sexually Transmitted Infections. *International Journal of Environmental Research on public health*. 2021; 18(3):1038. DOI: 10.3390/ijerph18031038. 33503917; PMCID: PMC7908473.

Casal, CAD, Silva, MOD, Costa, IB, Araujo, EDC, Corvelo TCO. Molecular detection of *Treponema pallidum* sp. *pallidum* in blood sample of VDRL seroreactive women with lethal pregnancy outcomes: a retrospective observational study in a northern Brazil, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2011; vol 44, no. 4, pp. 451-456. Epub 22 July 2011. ISSN 1678-9849. DOI/10.1590/S0037-86822011005000047

Castro MRTd. Contribuição para o estudo da infecção por *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*: Resposta sorológica, Diagnóstico Molecular e Genotipagem. Dissertação de Doutorado. Lisboa - Portugal (LISBOA): Universidade Nova Lisboa; 2004.

Castro R, Águas MJ, Batista T, Araújo C, Mansinho K, Pereira F da L. Detection of *Treponema pallidum* Sp. *Pallidum* DNA in Cerebrospinal Fluid (CSF) by Two PCR Techniques. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2016; Sep;30(5): 628-32. DOI: 10.1002/jcla.21913. Epub 2016 Feb 18. PMID: 26892231; PMCID: PMC6807054.

Castro R, Prieto E, Aguas MJ, Manata MJ, Botas J, Pereira FM. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Lisbon, Portugal. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009; Aug;47(8):2510-2. DOI: 10.1128/JCM.00287-08. Epub 2009 Jun 3. PMID: 19494073; PMCID: PMC2725690.

Cohen SE, Klausner JD, Engelman J, Philip S. Syphilis in the modern era: an update for physicians. *Infectious Diseases Clinics of North America*. 2013; Dec;27(4):705-22. DOI: 10.1016/j.idc.2013.08.005. PMID: 24275265.

Wang C, Cheng Y, Liu B, Wang Y, Gong W, Qian Y, Guan Z, Lu H, Gu X, Shi M, Zhou P. Sensitive detection of *Treponema pallidum* DNA from the whole blood of patients with syphilis by the nested PCR assay. *Emerging Microbes and Infection*.

2018;7(1):83. DOI: 10.1038/s41426-018-0085-2. Errata em: Emerging Microbes Infection. 2020 Dez;9(1):1174. PMID: 29739928; PMCID: PMC5940865.

Dai X, Chen S, Li N, Yan H. Quantitative and qualitative validations of a sonication-based DNA extraction approach for PCR-based molecular biological analyses. *Analytical Biochemistry*. 2016; 501:44-6. [DOI.org/10.1016/j.ab.2016.01.003](https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.01.003)

Department of Health and Human Services USA. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2012. Atlanta; 2014:174.

European Centre for Disease Prevention and Control. Syphilis - Annual epidemiological report for 2016. Stockholm; 2018.

Fraga D, Muller AL, Czykiel MS, De Armas Y, Wissmann G, Goldani LZ. Detection of *Treponema pallidum* by semi-nested PCR in the cerebrospinal fluid of asymptomatic HIV-infected patients with latent syphilis. *Clinical Laboratory*. 2014; 60(12):2051-2054. DOI:10.7754/clin.lab.2014.140605

Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, White O, Sutton GG, Dodson R, Sodergreen E. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science*. 1988; vol 281, no. 5375: pp. 375-388. DOI: 10.1126/science.281.5375.375

Giacani L, Ciccarese G, Puga-Salazar C, Dal Conte I, Colli L, Cusini M, Ramoni S, Delmonte S, D'Antuono A, Gaspari V, Drago F. 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. *Sexually Transmitted Diseases*. 2018; 45: 237–242. DOI.org/10.1097/ OLQ.0000000000000741 PMID: 29465698

Naveca FG, Sabidó M, Almeida TAP, Veras EA, Mejía MDCC, Galban E, Benzaken AS. Etiology of genital ulcer disease in a sexually transmitted infection reference center in Manaus, Brazilian Amazon. *PLoS One*. 2013; 8(5). [DOI/10.1371/journal.pone.0063953](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063953)

Granger K, Moore RJ, Davies JK, Vaughan JA, Stiles PL, Stewart DJ, Tizard ML. Recovery of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from the natural host for the extraction and analysis in vivo-derived RNA. *Journal of Microbiological Methods*. 2004; 57(2):241-9. DOI: [10.1016/j.mimet.2004.01.010](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.01.010)

Grillová L, Bawa T, Mikalová L, Gayet-Ageron A, Nieselt K, Strouhal M, Sednaoui P, Ferry T, Cavassini M, Lautenschlager S, Dutly F, Pla-Diaz M, Krutzen M, Gonzalez-Candelas F, Bagheri HC, Smajs D, Arora N, Bossahard PP. Molecular characterization of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Switzerland and France with a new multilocus sequence typing scheme. *Plos One*. 2018; Jul 30;13(7):e0200773. DOI: 10.1371/journal.pone.0200773. PMID: 30059541; PMCID: PMC6066202.

Grillova L, Jolley K, Smajs D, Picardeau M. A public database for the new MLST scheme for *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*: surveillance and epidemiology of the causative agent of syphilis. *PeerJ*. 2019; 6: e6182. DOI.org/10.7717/peerj.6182

PMID: 30643682

Grillová L, Noda AA, Lienhard R, Blanco O, Rodríguez I, Šmajš D. Multilocus Sequence Typing of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Cuba De 2012 a 2017. *The Journal of Infectious Diseases*. 2019; 219(7):1138-1145. DOI:10.1093/infdis/jiy604. 30325448. PMID: 30325448

Grillova L, Pětrosťova 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014; 52: 3693–3700. DOI. org/10.1128/JCM.01292-14 PMID: 25100820

Herremans T, Kortbeek L, Notermans DW. A review of diagnostic tests for congenital syphilis in newborns. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2010; 29(5): 495-501. DOI/10.1007/s10096-010-0900-8. Epub 2010 Mar 25. 20336337

HO Emily L & Lukerhart Sheila A. Syphilis using modern approaches to understand an old disease. *The journal of clinical investigation*. 2011;121(12):4584-92. DOI: 10.1172/JCI57173. Epub 2011 Dez 1. PMID: 22133883; PMCID: PMC3225993

Janier M, Hegyi V, Dupin N, Unemo M, Tiplica GS, Poto M. 2014 European Guideline on the Management of Syphilis. 2014:1–29.

Kersh EN, Lukehart SA. Biomedical Research Priorities for Modern Syphilis Clinical Management, Diagnosis, and Vaccines. *Sexually Transmitted Diseases*. 2018; 45(9S Suppl 1):S7-S9. DOI: 10.1097/OLQ.0000000000000830. PMID: 29528993; PMCID: PMC6089653

Lafond RE, Lukehart SA. Biological basis for syphilis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006; 19(1):29-49. DOI: 10.1128/CMR.19.1.29-49.2006. PMID: 16418521; PMCID: PMC1360276.

Liu D, He SM, Zhu XZ, Liu LL, Lin LR, Niu JJ, Yang TC. Molecular Characterization Based on MLST and ECDC Typing Schemes and Antibiotic Resistance Analyses of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Xiamen, China. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2021;10:618747. DOI: 10.3389/fcimb.2020.618747. 33680984; PMCID: PMC7935548.

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. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39(5):1941-6. DOI: 10.1128/JCM.39.5.1941-1946.2001. PMID: 11326018; PMCID: PMC88053.

Lukehart SA, Godornes C, Molini BJ, Sonnett P, Hopkins S, Mulcahy F, Engelman J, Mitchell SJ, Rompalo AM, Marra CM, Klausner JD. Macrolide resistance in *Treponema pallidum* in the United States and Ireland. *New England Journal of Medicine*. 2004; v. 351, n. 2, p. 154-158. DOI: 10.1056/NEJMoa040216

Luo Y, Xie Y, Xiao Y. Laboratory Diagnostic Tools for Syphilis: Current Status and Future Prospects. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021; 8;10:574806. DOI: 10.3389/fcimb.2020.574806. PMID: 33628742; PMCID: PMC7897658.

Mabey DC, Sollis KA, Kelly HA, Benzaken AS, Bitarakwate E, Changalucha J, et al. Point-of-care tests to strengthen health systems and save newborn lives: the case of syphilis. *PLoS Med*. 2012; 9(6):e1001233.

Marra CM. Neurosyphilis. *Contin Lifelong Learn Neurol. Neuroinfectious Disease*. 2015; 21(6):1714–28. DOI: 10.1212/CON.0000000000000250

Martin IE, Tsang RS, Sutherland K, Tilley P, Read R, Anderson B, Roy C, Singh AE. Molecular characterization of syphilis in patients in Canada: azithromycin resistance and detection of *Treponema pallidum* DNA in whole-blood samples versus ulcerative swabs. *Journal of Clinical Microbiology* . 2009; 47(6):1668-73. DOI: 10.1128/JCM.02392-08. Epub 2009 Abr 1. PMID: 19339468; PMCID: PMC2691066.

Maurissa MI. Identificação e Genotipagem de *Treponema pallidum* subsp *pallidum* em amostras clínicas. Dissertação de Mestrado. Lisboa - Portugal: Universidade de Lisboa - Faculdade de Ciências; 2009.

Morshed MG. Current trend on syphilis diagnosis: issues and challenges. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2014; 808:51–64. DOI: 10.1007/978-81-322-1774-9_5. PMID: 24595610.

Mota CA, Venazzi EAS, Zanzarini PD, Aristides SMA, Lonardoni MVC, Silveira TGV. Filter paper performance in PCR for cutaneous leishmaniasis diagnosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2021; v. 54. Epub 21 Dec 2020. DOI.org/10.1590/0037-8682-0047-2020

Moura A, Moura AM, Hodon MA, Soares Filho PM, Issa MA, de Oliveira APF, Fonseca Júnior AA. Comparison of nine DNA extraction methods for the diagnosis of bovine tuberculosis by real time PCR. *Ciência Rural*. 2016; vol.46, no.7: p.1223-1228. [DOI.org/10.1590/0103-8478cr20151489](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20151489)

Newman L, Kamb M, Hawkes S, Gomez G, Say L, Seuc A, Broutet N. Global estimates of syphilis in pregnancy and associated adverse outcomes: Analysis of multinational antenatal surveillance data. *PLoS Med*. 2013;10(2):e1001396. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001396. Epub 2013 Feb 26. PMID: 23468598; PMCID: PMC3582608.

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. *International Journal of STD & AIDS*. 2019; 30: 1087–1094. DOI:10.1177/0956462419859764

Oliveira P C B F. Sífilis: diagnóstico e identificação molecular de amostras clínicas de pacientes com apresentação atípica. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação Stricto Sensu em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade

Federal Fluminense. Universidade Federal Fluminense. 2016.

Palmer H M, Higgins S P, Herring AJ, Kingston M A. Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. *Sexually Transmitted Infections*. 2003 Dec;79(6):479-83. DOI: 10.1136/sti.79.6.479. PMID: 14663125; PMCID: PMC1744778

Passos MRL, Benzaken AS, Coelho ICB, Rodrigues GHS, Junior JCD, Varella RQ, Tavares RR, Barreto NA, Marques BP, Figueiredo J. Estudo da equivalência entre azitromicina e penicilina G benzatina no tratamento da sífilis. DST. *Jornal Brasileiro de Doenças Sexuais Transmissíveis*. 2004;16(1):52-56.

Peng R-R, Wang AL, Li J, Tucker JD, Yin Y-P, Chen X-S. Molecular Typing of *Treponema pallidum*: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2011; 5(11):e1273. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001273. Epub 2011 Nov 8. PMID: 22087340; PMCID: PMC3210736.

Pereira JB, Barbosa Júnior WL, Silva ED, Aquino AECA, Oliveira PMS, Melo FL, Comparação de técnicas de extração de DNA de *Treponema Pallidum* para o diagnóstico molecular da sífilis, *Brazilian Journal of Health Review*. 2019; v. 2, n. 4: p. 3681-3697. DOI:10.34119/bjhrv2n4-131

Pillay A, Liu H, Chen C Y, Holloway B, Sturn W A, Steiner B, Morse S A. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*, Sexually transmitted diseases. 1988; vol 25, no. 8, pp. 408-414.

Pope V, Fox K, Liu H, Marfin AA, Leone P, Seña AC, Chapin J, Fears MB, Markowitz L. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* from North and South Carolina. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; Aug;43(8):3743-6. DOI: 10.1128/JCM.43.8.3743-3746.2005. PMID: 16081904; PMCID: PMC1233889.

Pospisilová P, Grange PA, Grillová L, Mikalová L, Martinet P, Janier M, Vermersch A, Benhaddou N, Del Giudice P, Alcaraz I, Truchetet F, Dupin N, Smajs D. Multi-locus sequence typing of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* present in clinical sample from France: Infecting treponemes are genetically diverse and belong to 19 allelic profiles. *PLoS One*. 2018; 13(7):e0201068. DOI: 10.1371/journal.pone.0201068. PMID: 30024965; PMCID: PMC6053231.

Ramos Júnior A, Matida L, Saraceni V, Veras M, Pontes R. Control of mother-to-child transmission of infectious diseases in Brazil: progress in HIV/AIDS and failure in congenital syphilis. *Caderno de Saúde Pública*. 2007; 23(supl.3):370-8.

Shukalek CB, Lee B, Fathima S, Chu A, Fonseca K and Somayaji R. Comparative Analysis of Molecular and Serologic Testing for Primary Syphilis: A Population-Based Cohort Study. *Frontiers in Cellular Infection Microbiology*. 2021; 11:579660. DOI: 10.3389/fcimb.2021.579660

Taylor MM, Li WY, Skinner J, Mickey T. Viral loads among young HIV-infected men with early syphilis. *Journal of the International Association of Providers of AIDS Care*. 2014; 13(6):501-5. DOI: 10.1177/2325957414536229. Epub 2014 Jun 4. PMID: 24899260; PMCID: PMC6754093.

Theel ES, Katz SS, Pillay A. Molecular and Direct Detection Tests for *Treponema pallidum* Subspecies *pallidum*: A Review of the Literature, 1964-2017. *Clinical Infectious Diseases*. 2020; 71(Suppl 1):S4-S12. DOI: 10.1093/cid/ciaa176. PMID: 32578865; PMCID: PMC7312206.

Tipple C, Hanna MOF, Hill S, Daniel J, Goldmeie D, McClure M, Taylor GP. Getting the measure of syphilis: qPCR to better understand early infection. *Sexually Transmitted Infectious*. 2011; v.87, n.6 : p. 479-485. DOI:10.1136/sti.2011.049494

Tsang RSW, Radons SM, Morshed M. Laboratory diagnosis of syphilis: A survey to examine the range of tests used in Canada. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*. 2011; 22(3):83-7. DOI: 10.1155/2011/627076. PMID: 22942884; PMCID: PMC3200370.

Valet LG, Grillova' L, Mikalova' L, Casco R, Rodríguez Fermepin M, Pando MA, Šmajš D. 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. DOI:10.1371/journal.pone.0172905

Vrbová E, Mikalová L, Grillová L, Pospíšilová P, Strnadel R, Dastychová E, Kojanová M, Kreidlová M, Vaěousová D, Rob F, Procházka P, Krchěáková A, Vaškø V, Woznicová V, Dvořáková Herová M, Kuklová I, Zákoucká H, Šmajš D. A retrospective study on nested PCR detection of syphilis treponemes in clinical samples: PCR detection contributes to the diagnosis of syphilis in patients with seronegative and serodiscrepant results. *PLoS ONE*. 2020; 15(8):e0237949. DOI:10.1371/journal.pone.0237949. 32817658; PMCID: PMC7446855.

Vrbová E, Grillová L, Mikalová L, Pospíšilová P, Strnadel R, Dastychová E, Kojanová M, Kreidlová M, Vaěousová D, Rob F, Procházka P, Krchěáková A, Vaškø V, Woznicová V, Dvořáková Heroldová M, Kuklová I, Zákoucká H, Šmajš, D. MLST typing of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in the Czech Republic during 2004-2017: Clinical isolates belonged to 25 allelic profiles and harbored 8 novel allelic variants. *PLoS ONE*, 2019; 14(5): e0217611. [DOI.org/10.1371/journal.pone.0217611](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217611)

Wang C, Cheng Y, Liu B, Wang Y, Gong W, Qian Y, Guan Z, Lu H, Gu X, Shi M e Zhou P. Sensitive detection of *Treponema pallidum* DNA from the whole blood of patients with syphilis by the nested PCR assay. *Emerging Microbes & Infections*. 2018; 7(1):83. DOI: 10.1038/s41426-018-0085-2. Erratum in: *Emerging Microbes & Infectios*. 2020 Dec;9(1):1174. PMID: 29739928; PMCID: PMC5940865.

World Health Organization. gho_sti_anc_syphilis_positive_2019.png (1123×793). Global Health Observatory Map Gallery: Percentage of antenatal care attendees positive for syphilis . http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/gho_sti_anc_syphilis_positive_2019.png. Published 2019.

World Health Organization. Global Health Observatory Map Gallery. 2014.

World Health Organization. Investment case for eliminating mother-to-child

transmission of syphilis: promoting better maternal and child health and stronger health systems. Geneva, Switzerland: WHO; 2012. 31 p.

Yi J, Choi W, Shin S, Choi J, Kim H, Chung HJ, Moon HW, Hur M, Yun YM. Strategy for performing treponemal tests in reverse-sequence algorithms of syphilis diagnosis. *Clinical Biochemistry*. 2019; 63:121-125. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2018.09.013. Epub 2018 Oct 2. 30287231

ANEXOS

Anexo A: Artigo Publicado na Revista *Brazilian Journal of Development*. ISSN: 2525-8761 54921, Curitiba, v.7, n.6, p. 54921-54934 jun. 2021. “Análise da infecção por *Chlamydia trachomatis* e fatores associados em mulheres portadoras do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e alto índice de coinfeção por Papilomavírus humano (HPV) no Maranhão”. DOI:10.34117/bjdv7n6-069.



Análise da infecção por *Chlamydia trachomatis* e fatores associados em mulheres portadoras do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e alto índice de coinfeção por Papillomavírus humano (HPV) no Maranhão

Analysis of *Chlamydia trachomatis* infection and associated factors in women with Human Immunodeficiency Virus (HIV) and high rate of Human Papillomavirus (HPV) coinfection in Maranhão

DOI:10.34117/bjdv7n6-069

Recebimento dos originais: 07/05/2021

Aceitação para publicação: 04/06/2021

Vera Mileide Trivellato Grassi

Doutoranda do curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada a Saúde

Universidade Luterana do Brasil – ULBRA
Rua Voluntários da Pátria 649 – Cáceres – MT
E-mail:vmgrassi@hotmail.com

Ana Carla Marques da Costa

Doutora em Biologia Celular e Molecular Aplicada a Saúde pela Ulbra-RS

Universidade Estadual do Maranhão
Rua Quininha Pires – Centro – Caxias - MA
E-mail:vmgrassi@hotmail.com

Liliane Trivellato Grassi

Doutoranda em Engenharia Biomédica pela Universidade Brasil

Universidade Brasil
Rua Voluntários da Pátria 649 – Cáceres – MT
E-mail:lilianegrassi@hotmail.com

Marcia Susana Nunes Silva

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

LGC, Biotecnologia
Av. Farroupilha 8001 – Canoas - BR
E-mail:marcia_susana@hotmail.com

Maria Lucia Rosa Rossetti

Doutora em Ciências Biológicas e professora do Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde (PPGBiosaúde), ULBRA, Canoas, Brasil

Universidade Luterana do Brasil – ULBRA
Av. Farroupilha 8001 – Canoas - RS
E-mail:maria.rossetti@ulbra.br



RESUMO

As Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs) são causadas por mais de 30 patógenos diferentes e estima-se que possam infectar 500 milhões de pessoas ao ano. Infecções causadas por *Chlamydia trachomatis* (clamídia) é uma das ISTs mais frequente e séria, uma vez que e na maioria dos casos é assintomática e quando não tratada, pode causar graves problemas no sistema gênito-urinário, levando inclusive a infertilidade. A coinfeção com o HIV tem sido relacionada com um aumento da transmissão do vírus e da aceleração da doença. Outra IST relacionada com aumento da transmissão de HIV é o Papillomavírus humano (HPV). No Brasil, a falta de notificação compulsória de clamídia, ou de HPV dificulta a obtenção de informações. Assim, estudos epidemiológicos que fornecem tais informações são importantes para direcionar políticas e ações de saúde. O objetivo deste estudo foi analisar a presença de infecção por *Chlamydia trachomatis* e a associação de fatores sociodemográficos e clínicos, inclusive coinfeção com HPV em mulheres infectadas com HIV/AIDS no Maranhão. Para isso, foram analisadas 125 amostras cervicais de mulheres em acompanhamento no sistema público de saúde. Para identificar a infecção, o DNA de *C. trachomatis* foi detectado por reação em cadeia de polimerase (PCR). Foi possível estimar uma frequência de 16,8% de *C. trachomatis* na população estudada. A coinfeção também com HPV foi de 10,8%. O fator de risco associado foi com a idade superior a 25 anos ($p=0,038$). Esse estudo mostra que a frequência de infecção por *C. trachomatis* na população com HIV e com alta frequência de HPV, não foi maior do que a relatada na população em geral e a única associação foi com a idade. Isso reforça as indicações de políticas de saúde para esta faixa etária independente da presença ou não de HIV e/ou HPV.

Palavras-chave: Infecções sexualmente transmissíveis, *C. trachomatis*, HPV, HIV.

ABSTRACT

Sexually Transmitted Infections (STIs) are caused by more than 30 different pathogens and are estimated to infect 500 million people a year. Infections caused by *Chlamydia trachomatis* (chlamydia) is one of the most frequent and serious STIs, since in most cases it is asymptomatic and when untreated can cause serious problems in the genitourinary system, including infertility. Co-infection with HIV has been related to an increase in virus transmission and acceleration of the disease. Another STI related to increased HIV transmission is the human papillomavirus (HPV). In Brazil, the lack of compulsory notification of chlamydia, or of HPV makes it difficult to obtain information. Thus, epidemiological studies that provide such information are important to direct health policies and actions. The objective of this study was to analyze the presence of *Chlamydia trachomatis* infection and the association of sociodemographic and clinical factors, including coinfection with HPV in women infected with HIV/AIDS in Maranhão. To this end, 125 cervical samples from women being followed up in the public health system were analyzed. To identify the infection, *C. trachomatis* DNA was detected by polymerase chain reaction (PCR). It was possible to estimate a frequency of 16.8% of *C. trachomatis* in the studied population. The coinfection with HPV was also 10.8%. The associated risk factor was age over 25 years ($p=0.038$). This study shows that the frequency of *C. trachomatis* infection in the population with HIV and with high frequency of HPV, was not higher than that reported in the general population and the only association was with age. This reinforces the indications of health policies for this age group regardless of the presence or absence of HIV and/or HPV.

Keywords: sexually transmitted infections, *C. trachomatis*, HPV, HIV.



1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos as Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs), tem aumentado consideravelmente. O número de casos novos no mundo, chegou a mais de 370 milhões por ano. Em geral, as infecções atingem mais mulheres que homens e pessoas pertencentes a grupos de risco, tal como homens que fazem sexo com homens e profissionais do sexo^{1,2}.

As ISTs causam diversas patologias, desde as mais brandas até as mais graves, podendo levar à infertilidade, complicações na gravidez com transmissão de infecções da mãe para o feto. Entre os patógenos causadores de ISTs estão o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), o Papilomavírus humano (HPV) e a *Chlamydia trachomatis*^{3,4}.

A infecção por *C. trachomatis*, apesar de normalmente ser assintomática⁵, é considerada uma das principais causadoras de infertilidade, além de causar gravidez ectópica, uretrites, salpingites, cervicites, endometriose e doença inflamatória pélvica (DIP). Em gestantes, além de DIP no pós-parto, o risco de natimortos e de morte neonatal é maior. Também é a causa mais comum de conjuntivite neonatal e pneumonia na primeira infância⁵.

No caso de HPV, este é considerado um importante fator de risco para o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo uterino, com maior chance de desenvolvimento em mulheres portadoras do HIV em decorrência da imunossupressão⁵. O interesse de estudos sobre essas infecções, não está, apenas no fato desses patógenos causarem problemas como a doença pélvica ou infertilidade, mas também pela possibilidade de evitar um aumento na transmissão do vírus HIV¹. A presença de infecção por *C. trachomatis*, e/ou por HPV aumentariam, significativamente, o risco de infecção pelo HIV, devido as lesões epiteliais, o que poderia facilitar a penetração do vírus, além de proporcionar uma aceleração na evolução da infecção pelo HIV para a AIDS^{1,7,8}.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a cada ano ocorram em torno de 120 milhões de novos casos de *C. trachomatis*, dos quais a maioria é observada em países em desenvolvimento, afetando principalmente adolescentes e jovens². No Brasil, estima-se que ocorram cerca de 1.967.200 novos casos de *C. trachomatis*, embora não esteja incluída entre as ISTs de notificação compulsória. Com relação ao HPV, esta é considerada a IST mais frequente em todo o mundo, cuja prevalência varia entre 2% a



68%. A estimativa é de que 75% da população sexualmente ativa entrem em contato com um ou mais tipos de HPV durante sua vida ¹.

Apesar das dificuldades no diagnóstico de clamídia, devido ao caráter assintomático da infecção, alguns métodos estão disponíveis como a cultura (a partir de swab endocervical e uretral)⁹, a pesquisa de anticorpos (soro) por imunofluorescência indireta (IFI), ou enzima imunoensaio (EIA) ⁹ e por PCR convencional ou real time PCR. Este tem sido utilizado por ser, potencialmente, mais sensível e específico que os métodos anteriores. ^{1,10}.

Existem poucos estudos sobre a coinfeção de *C. trachomatis* e HIV. Um estudo feito em São Paulo encontrou uma prevalência de 1,8% nas mulheres vivendo com HIV atendidas nos centros de referência, valor menor do que o encontrado por um estudo em Manaus cuja prevalência foi de 4,3%. Em outro estudo, feito com homens e mulheres em Salvador a frequência foi de 12,3% casos positivos de *C. trachomatis* entre as mulheres e 17,1% entre os homens ^{11, 12, 13}.

A escassez, ou inexistência de dados sobre essas infecções em algumas regiões do Brasil, torna extremamente relevante estudos sobre a prevalências e coinfeções entre outros, principalmente em populações com HIV, pela importância que esses patógenos assumem na transmissão de HIV. Considerando isso, o objetivo deste trabalho foi analisar a frequência de *C. trachomatis* e fatores associados (inclusive coinfeção com HPV) em mulheres infectadas pelo HIV em uma região do Maranhão.

2 METODOLOGIA

Foram utilizadas amostras cervicais provenientes de pacientes soropositivas para HIV que estavam em acompanhamento em um centro de referência em atendimento de DST/AIDS denominado Serviço de Assistência Especializada/Centro de Testagem e Aconselhamento (SAE/CTA) na cidade de Caxias, Maranhão. As amostras eram coletadas (swabs) durante o atendimento de rotina para exame citopatológico. Posteriormente, uma alíquota (500 µL) era encaminhada ao laboratório de Biologia Molecular da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA/Canoas). Esse Centro de triagem tem como objetivo acompanhar os portadores de HIV, tratar os doentes de AIDS e possíveis coinfeções, melhorando assim a qualidade de vida dos usuários deste serviço.

Os dados sociodemográficos foram obtidos através de uma entrevista com as pacientes no momento da coleta e, os dados clínicos utilizados, foram consultados no prontuário das pacientes. As coletas foram realizadas no período de setembro de 2014 a



setembro de 2016.

Para a realização do estudo foram incluídas as amostras das pacientes com mais de 18 anos e com resultados positivo nos testes para HIV.

Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada através de um Kit comercial da Roche, *High Pure Viral Nucleic Acid* e foi realizada conforme instruções do fabricante.

Deteção do DNA da *Chlamydia trachomatis* por PCR

O DNA extraído foi utilizado na realização da técnica de PCR para detecção da *Chlamydia trachomatis*. A amplificação foi realizada utilizando os *primers* CTP1 (5`TAG TAA CTG CCA CTT CAT CA 3`) e CTP2(5`TTC CCC TTG TAA TTC GTT GC 3`), que amplificam um segmento de 201 pb da ORF de número 4 do plasmídeo críptico da *C. trachomatis*. Este segmento localiza-se a 2940 pb do sítio único de restrição de *Bam*HI conforme descrito em Lan et al. (1993) ¹⁴.

As amostras foram preparadas e submetidas às condições estabelecidas pelo autor, para amplificação do DNA. Foi preparada uma mistura com tampão 10 x, 3 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTPs, 125 ng de cada *primer* e 1U da enzima *Taq* DNA polimerase. Foi realizada uma desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguida de uma desnaturação a 95°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, durante 40 ciclos, e uma extensão final a 72°C por 4 minutos.

O amplicon foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2% contendo 0,05% de brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

O controle positivo usado na reação foi um DNA da *C. trachomatis* e o negativo uma mistura dos componentes da reação, livre de DNA.

Deteção e genotipagem do HPV

A detecção de HPV foi realizada anteriormente (dados não demonstrados) por PCR usando os *primers* GP5+ e GP6+ (de Roda Husman, 1995) ¹⁵, que geravam um fragmento de 150 pb da região L1 do genoma do vírus. As amostras positivas, foram genotipadas em um ensaio de hibridização em microplacas. Para esse ensaio foram utilizadas sondas específicas de HPV de alto risco (HPV 16, 18, 31, 33, 39, 45, 52, 59, 58 e 59). O protocolo utilizado para PCR e genotipagem foi realizado conforme descrito por Barcellos et al. (2011) ¹⁶.



Análises Estatísticas

Os resultados foram tabulados e analisados pelo programa SPSS v21. Análises foram realizadas para estimar a prevalência da infecção por *C. trachomatis* e a coinfeção com HPV. As diferenças de prevalência das variáveis categóricas e as análises dos dados sociodemográficos foram realizadas utilizando o teste de qui-quadrado. A razão de chance (OD) com intervalo de confiança de 95% (IC 95%) para potenciais fatores de risco associados com a infecção foram estimados usando o modelo de regressão logística. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em seres Humanos da Universidade Estadual do Maranhão com o número de protocolo nº 891.746 e do Comitê de Ética de pesquisa em seres Humanos da ULBRA (CEP-ULBRA 2007-379H).

3 RESULTADOS

Um total de 125 amostras cérvico-vaginais foi submetido a PCR para identificar a presença de *C. trachomatis*. Foram consideradas positivas as amostras que após amplificação foi possível visualizar um fragmento de 201 pb. Destas, 21 (16,8%) apresentaram resultado positivo.

As características sociodemográficas, comportamentais e clínicas das 125 mulheres estão apresentadas na Tabela 1. A idade variou de 18 a 70 anos, e a média ficou em 37,4 anos. Com relação ao estado civil e escolaridade verificou-se que 58,4% eram casadas ou viviam em união estável, 62,4% tinham de 1 a 9 anos de estudo e 88,0% se declaram pardas e/ou negras. Quanto as características comportamentais, verificou-se que 61,6% tinham um parceiro no último ano, 38,4% usavam anticoncepcional oral e 84,9% relataram não fumar.



Tabela 1. Características sociodemográficas da população estudada.

Variável	N	%
Idade		
18 a 25 anos	22	17,6
> 26 anos	103	82,4
Estado Civil		
Casada e união estável	73	58,4
Solteira, separada e viúva	52	41,6
Escolaridade		
Nenhuma	19	15,2
1 a 9 anos	78	62,4
Mais de 9 anos	28	22,4
Parceiros Sexuais*		
0	41	32,8
1	77	61,6
2 ou mais	7	5,6
Fumo		
Não	107	85,6
Sim	18	14,4

* Quantidade de parceiros sexuais no momento da coleta

A Tabela 2 mostra as características clínicas das pacientes, onde se observou que 72,2% tinham carga viral de HIV de até 1000 cópias/mL. Em 73,6%, o CD4 era maior de 350 células/mm³. Nas análises relacionadas à presença do HPV e seus genótipos, observou-se que em 44,8% tinham a infecção por HPV, e os genótipos mais prevalentes foram o HPV18 (96,4%), 16 (89,3%), 58 (46,4%) e 56 (33,9%). Em várias destas amostras foi possível observar a presença de dois ou mais genótipo simultaneamente.

Tabela 2. Características clínicas da população estudada.

Variável	N	%
Carga Viral		
Até 1000 cópias/mL	91	72,8
Mais de 1000 cópias/mL	34	27,2
CD4		
Até 350 células/mm ³	33	26,4
Mais de 350 células/mm ³	92	73,6
Tratamento Antiretroviral		
Sim	93	74,4
Não	32	25,6
HBsAg		
Negativo	120	96,0
Positivo	5	4,0
VDRL		
Negativo	113	90,4
Positivo	12	9,6
HPV		
Sim	56	44,8
Não	69	52,2
Genotipagem		
HPV16	50	89,3
HPV18	54	96,4
HPV31	4	7,1
HPV33	16	28,6
HPV39	5	8,9
HPV45	2	3,6



HPV52	1	1,8
HPV56	19	33,9
HPV58	26	46,4
HPV59	6	10,7

As características sociodemográficas e comportamentais das pacientes versus a infecção por *C. trachomatis* são apresentadas na Tabela 3. Apesar das diferenças observadas entre o grupo com e sem infecção essas diferenças não foram estatisticamente significativas, com exceção para a idade das pacientes, Mulheres com mais de 25 estavam associadas a infecção ($p=0,038$).

Tabela 3 – Características sociodemográficos e comportamentais das pacientes com e sem a infecção por *C. trachomatis* em mulheres HIV positivas.

Variável	<i>C. trachomatis</i>		
	Positivo – N (%)	Negativo – N (%)	OD (ID95%) P -value
Idade			2,967(1,028-8,558) 0,038
18 a 25 anos	7 (33,3)	15 (14,4)	
>25 anos	14 (66,7)	89 (85,6)	
Raça			1,357(0,283-6,514) 0,702
Parda/Negra	19 (90,5)	91(87,5)	
Branca/Amarela	2 (9,5)	13 (12,5)	
Escolaridade			0,617
Nenhum	2 (9,5)	17(16,3)	
1 a 9 anos	13 (61,9)	65 (62,5)	
>10 anos	6 (28,6)	22 (21,2)	
Situação Conjugal			0,940(0,364-2,426) 0,898
Solteira	12 (57,1)	61(58,7)	
Casada	9 (42,9)	43 (41,3)	
Fumo			1,727(0,366-8,149) 0,485
Não	19(90,5)	88(84,6)	
Sim	2(9,5)	16(15,4)	
Uso Contraceptivo Hormonal			0,387
Sim	5(23,8)	34(32,7)	
Não	7(33,3)	41(39,4)	
Outros	9(42,9)	29(27,9)	
Parceiros Sexuais			0,443
0	8(38,1)	33(31,7)	
1	13(61,9)	64(61,5)	
>2	0(0)	7(6,7)	

Outros fatores sociodemográficos, como raça, escolaridade, situação conjugal, uso de anticoncepcional, quantidade de parceiros e hábito de fumar não tiveram valores estatisticamente significativos. Das pacientes com infecção por *C. trachomatis* 21 (XX%), 66,7% tinham mais de 25 anos, 90,5% eram pardas ou negras; 61,9% estudaram o ensino fundamental completo ou não, 90,5% relataram não fumar, 76,7% faziam uso de algum método contraceptivo, sendo que dentre estas, 23,8% usavam anticoncepcional hormonal e 61,9% tinham um parceiro sexual nos últimos seis meses.



Avaliando os aspectos clínicos patológicos, a Tabela 4 descreve essas variáveis nas amostras das mulheres HIV positivas considerando a presença ou não da infecção por *C. trachomatis*.

Tabela 4. Aspectos clínicos patológicos avaliados das mulheres do estudo

Variável	<i>C. trachomatis</i>			
	Positivo – N (%)	Negativo – N (%)	OD (ID95%)	P –value
Carga Viral			0,542 (0,202-1,452)	0,219
Até 1000 cópias/mL	13 (61,9)	78 (75,0)		
> 1000 cópias/mL	8 (38,1)	26 (25,0)		
CD4			1,141 (0,402-3,238)	0,805
Até 350 cell/mm	6 (28,6)	27 (26,0)		
> 350 cell/mm	15 (71,4)	77 (74,0)		
Tratamento Antiretroviral			0,633 (0,230-1,742)	0,373
Sim	14 (66,7)	79 (76,0)		
Não	7 (33,3)	25 (24,0)		
HPV			0,718 (0,275-1,878)	0,498
Positivo	8 (38,1)	48 (46,2)		
Negativo	13 (61,9)	56 (53,8)		

Com relação à carga viral, está se apresentou indetectável ou menor que 1000 cópias/mL em 61,9% das mulheres com a infecção e em 75,0% nas não infectadas. O CD4 foi maior que 350 células/mm³ em 71,4% das infectadas e em 74,0% das não infectadas. Essas características não tiveram associação com a infecção ($p=0,219$ e $p=805$).

A análise de coinfeção com *C. trachomatis* e HPV (genótipos de alto risco), além do HIV, mostrou que em 56 amostras que eram positivas para HPV, 8 (14,28%) também eram positivas para *C. trachomatis* ($p=0,498$).

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os estudos sobre a prevalência das ISTs têm aumentado nos últimos anos. O avanço da medicina promoveu uma grande sobrevida aos pacientes com HIV mantendo a carga viral em níveis indetectáveis ou muito baixa, proporcionando a diminuição do uso de preservativos como método de prevenção. No entanto, a transmissão de outras doenças sexuais como a sífilis, a gonorréia e a clamídia aumentaram drasticamente. Como essas doenças são assintomáticas por um longo período acabam causando graves implicações na saúde^{13,17}.

As ISTs, historicamente, apresentam-se como um grande desafio para o diagnóstico por testes laboratoriais, porém com o desenvolvimento dos testes de amplificação de ácidos nucleicos, considerados mais sensíveis que os tradicionais, eliminaram-se a necessidade do cultivo bacteriano possibilitando um diagnóstico através



do uso de amostras colhidas por métodos pouco invasivo, como é o caso das amostras cervicais^{10,13}.

Este estudo usou como método molecular a técnica de PCR para detectar a presença da *C. trachomatis* em 125 mulheres portadoras do vírus HIV, sendo que destas, 56 também apresentavam o vírus HPV. Nesta análise foi encontrada uma prevalência de 16,8%, resultado considerado superior ao relatado na literatura em trabalhos realizados em outros países como os Estados Unidos, onde a prevalência da infecção foi de 4,7%¹⁸.

No Brasil, as prevalências variam de 2,1% a 13,6% em estudos onde a população de mulheres estava abaixo dos 25 anos e em adolescentes, mulheres grávidas e em mulheres vivendo com HIV/AIDS^{13,19,20,21}. Um estudo envolvendo mulheres submetidas à reprodução assistida, mostra uma frequência bem superior aos estudos citados anteriormente (40,0%), podendo ser este um indicativo de que a *C. trachomatis* é uma potente bactéria causadora de infertilidade em mulheres⁵. Nosso estudo foi restrito a uma população de mulheres com HIV, sendo a média de idade de 37,4 anos, o que se mostrou como um fator de risco para a presença da infecção, $p=0,038$, $OD=2,967(1,028-8,558)$, corroborando com dados da literatura^{6,13,22}.

No Brasil a infecção por *C. trachomatis* não é uma doença de notificação compulsória e, portanto, a poucos dados confiáveis sobre a real prevalência da mesma. Também não existem programas específicos do Ministério da Saúde (MS) que incentivem o rastreio, e por ser assintomática na maior parte dos casos, provavelmente é subdiagnosticada e consequentemente pouco tratada, podendo justificar os altos índices encontrados neste estudo. As estimativas de prevalência da *C. trachomatis* devem ser interpretadas levando-se em conta as diferenças nacionais e culturais de comportamento sexual e assistência à saúde. O Brasil é um país de dimensão continental, com populações de diferentes níveis de desenvolvimento socioeconômico, o que justificaria as diferenças regionais encontradas^{23,24}.

Quanto aos outros fatores sociodemográficos, verificamos a presença de infecção por *C. trachomatis* em pacientes que relataram ter um único parceiro (61,6%), casadas ou vivendo em união estável (58,4%), de raça parda e ou negra (88,0%) e com escolaridade de 1 a 9 nos (62,4%), o que concorda com os dados obtidos de relatos na literatura^{13,19,21,25}. Entretanto, uma discordância é evidenciada nos resultados encontrados em^{6,20}, onde uma intensa atividade sexual com múltiplos parceiros foi apontado como fator de risco. Nossa população de estudo, foi de mulheres que fazem um acompanhamento constante devido ao fato de serem portadoras do HIV, e assim facilitaria um acesso mais



fácil ao diagnóstico de outras ISTs. Além disso, também era esperado que fizessem o uso frequente de métodos preventivos, o que mostrou não ser a realidade.

No nosso estudo, 72,2% das pacientes tinham carga viral <1000 cópias/mL, e 74,4% estavam fazendo uso de algum antiretroviral, indício de que a maioria já apresentava sintomas, e que com o uso do antirretroviral, estavam com a quantidade do vírus HIV controlada. Portanto, essas pacientes apesar de estarem sendo assistidas há algum tempo, com consultas e exames frequentes ainda assim deixam passar doenças assintomáticas, que podem ter desfechos graves no futuro e ainda aumentarem a transmissão, tanto das ISTs como do HIV. Um estudo de Travassos et al (2012) ¹⁹¹, identificaram que quanto maior a carga viral e menor o CD4, maior o risco de infecção por ISTs, indicativo do comprometimento do sistema imunológico, portanto, facilitando a transmissão.

Seguindo nas análises, os resultados observados relacionados à infecção pelo HPV, encontramos neste grupo em 44,8% das mulheres estudadas e em apenas 10,8% delas estavam com coinfeção com *C. trachomatis*. Diferente do encontrado em²⁶, que encontraram 2,4% de coinfeção, mas o estudo utilizou somente amostras com alterações intraepiteliais.

Com relação aos genótipos de alto risco para o HPV, estes foram analisados nas amostras que apresentaram coinfeção com a *C. trachomatis*. Os mais encontrados foram o 16 e o 18 (100,0%), e esta condição em mulheres imunodeprimidas caracteriza essa população como de risco para evolução do câncer cervical. Cabe salientar que, essa situação já seria o suficiente para justificar o desenvolvimento de estratégias específicas no controle da saúde sexual dessa população, pois na maioria das vezes só é disponibilizado o exame de citologia oncológica ²⁶.

Uma limitação encontrada neste estudo foi o número pequeno de participantes. Alguns fatores de risco podem não ter dado informações estatisticamente significativas entre algumas variáveis independentes para a infecção por *C. trachomatis*, e a possibilidade de respostas tendenciosas ao responder o questionário da pesquisa.

Deste modo, o estudo mostrou que programas de rastreio dessas doenças, por métodos de exames não invasivos, tende a diminuir as possíveis complicações causadas pela *C. trachomatis* e outras ISTs, visando a prevenção do HIV. A atenção em saúde as ISTs/AIDS, precisa de ações preventivas que deveriam ser implementadas nos serviços de assistência especializada em HIV/AIDS.



REFERÊNCIAS

1. Brasil. Protocolo Clínico e diretrizes terapêuticas para atenção integral às pessoas com infecções sexualmente transmissíveis (IST). Brasília: Ministério da Saúde; 2020
2. WHO. Global estimates of 4 curable STIs and maternal and congenital syphilis, 2016. Geneva: World Health Organization; 2020.
3. Brasil. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections including human immunodeficiency virus. OMS - Ministério da Saúde, Departamento de DST/AIDS e Hepatites Virais; 2013.
4. Vega NC, Otero RM, Garcia S, Diaz JL, Noriega ER, Ortiz AC, et al. Sexually transmitted pathogens, coinfections and risk factors in patients attending obstetrics and gynecology clinics in Jalisco, Mexico. *salud pública de méxico*. 2016; 58 (4): p. 437-445.
5. Proto IAC, Carneiro JdM, Passos XS, Ataídes FS, Amaral WNd. Prevalência de Chlamydia trachomatis em mulheres submetidas à fertilização assistida em Goiânia. *Sociedade Brasileira de Reprodução Humana*. 2014; 28(3): p. 108-11.
6. Silva LCFd, Miranda AE, Batalha RS, Sabino. Carolina, Dib, Elizabeth Cristina Dantas, Costa, Carolina Marinho da, Ramasawmy, Rajandranath, Talhari, Sinésio. Chlamydia trachomatis infection among HIV-infected women attending an AIDS clinic in the city of Manaus - Brazil. *Braz J Infect dis*. 2012;16(4):335-38..
7. Granato CFH. Saiba+ Anais - Boletim do grupo Fleury. 2013 Agosto.
8. Brasil. Manual Técnico para o Diagnóstico da Sífilis. Ministério da Saúde - PNCQ; 2016.
9. Andrade ACR, Teles RAS, Silva AMHP, Dias BHM, Vasconcelos Filho FEd, Amaral RLG, et al. Infecção genital por Chlamydia trachomatis na mulher: epidemiologia, diagnóstico e consequências. *RFM-Revista Fluminense de Medicina - FJM - Fluminense Journal of Medicine*. 2014: p. 15-17.
10. Koksall MO, Beka H, Domirci M, Kadioglu A, Agactidan A, Akgul B. Prevalence and genotyping of chlamydia trachomatis in symptomatic male patients from Istanbul, Turkey. *Springer Plus*. 2016: p. 1-4.
11. Travassos, AGA. Anogenital infection by Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in HIV-infected men and women in Salvador, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases (BJID)*. DOI: 10.1016/j.bjid.2016.09.004. 2016.
12. Buchalla, CM et al. Prevalence and factors associated with Chlamydia trachomatis infection among women with HIV in São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med Trop*, v. 49, n. 3, p. 312-318, May-June 2016. doi: 10.1590/0037-8682-0169-2016
13. Miranda AE, Silveira MF, Travassos AG, Tenório T, Val ICCd, Lannoy Ld, et al. Prevalence of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoea and associated factors among women living with Human Immunodeficiency Virus in Brazil: A multicenter study. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2017; 21(4): p. 402-07.



14. Lan J, Walboomers JMM, Roosendaal R, Doornum GJJV, Maclaren DM, Meijer CLM, et al. Direct detection and genotyping of chlamydia trachomatis in cervical scrapes by using polymerase chain reaction and restriction fragment length. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993; 31: p. 1060-1065.
15. de Roda Husman AM, Walboomers JM, Van der Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology*. 1995; 76: p. 1057-62.
16. Barcellos RB, Almeida SEM, Sperchacks RD, Verza M, Rosso F, Medeiros RM, Perzzolo PF, Herrera EC, Rossetti MLR. Evaluation of a novel microplate colorimetric hybridization genotyping assay for human papillomavirus. *J Virol Methods*. 2011: p. 38-43. doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.06.010
17. Park J, Zimmerman L, Stempinski K, Bridge R, Roston A, Patel A. Prevalence of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in a urban public hospital pregnancy termination clinic. *Int J STD AIDS*. 2017.
18. Torrone E, Papp J, Weinstock H. Prevalence of chlamydia trachomatis genital infection among persons aged 14-39years - United States,2007-2012. *Morbidity and mortality weekly report*. 2014 september: p. 834-838.
19. Travassos ACA, Britus C, M.Neto E, Fernandes SdA, Rutherford GW, Queiroz CM. Prevalence of sexually transmitted infections among HIV-infected women in Brazil. *The Brazilians Journal of Infections Diseases*. 2012; 16(6): p. 581-85.
20. Pinto VM, Swarcwald CL, Banoni C, Stinguri LL, Inocencio LA, Miranda AC. Chlamydia trachomatis prevalence and risk behavior in parturient women age 15 a 24 in Brazil. *Sexually trasmitted diseases*. 2011: p. 957-61.
21. Angelova M, Chev EK, Tsankova V, Koleva I, Mangareva S. Role and importance of Chlamydia trachomatis in pregmant patient. *Journal of Medical Sciences*. 2016: p. 410-12.
22. Zhu Y, Yin B, Wo T, Ye L, Chen C, Zeng Y, et al. Comparative study in infertile couples with and without Chlamydia trachomatis genital infection. *Bio Med Central*. 2017: p. 1-9.
23. Redmond SM, Kissilig KA, Woodhall sC, Brock IVFvd, Bergin JV, Word H, et al. GenitalChlamydiaPrevalenceinEuropeand Non-EuropeanHighIncomeCountries: SystematicReviewandMeta-Analysis. *Plos One*. 2015.
24. Saúde Md. Boletim Epidemiológico - HIV-AIDS. Secretaria de Vigilancia em Saúde; 2016.
25. Anaene M, Sayeme K, Caskey R. Factor associated with the over-treatment and under-treatment of Gonorrhea and Chlamydia in adolescents persenting to a public hospital emergency department. *International Journal of infctious diseases*. 2016: p. 34-38.



26. Wohlmeister D, Vianna DRB, Helfer VE, Gimenes F, Consolaro MEL, Barcellos RB, et al. Association of human papillomavirus and Chlamydia trachomatis with intraepithelial alterations incervix samples. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016; 111(2): p. 106-12.