



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

Detección de *Treponema pallidum subsp pallidum* para el diagnóstico de sífilis congénita mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa Convencional y PCR en tiempo real

Lesly Dayana Campos Leguizamón¹

Andrea Tatiana Durán Rodríguez¹

Gladys Pinilla²

Liliana Muñoz²

1. Estudiantes de noveno semestre de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Grupo de Investigación REMA-Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
2. Docentes e investigadoras. Grupo de Investigación REMA-Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Correspondencia: lesly_0720@hotmail.com/lcampos@unicolmayor.edu.co
andreatatianad@gmail.com/atduran@unicolmayor.edu.co

Bogotá D.C., Colombia

2015



CONGRESO
INTERNACIONAL
DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN
DOS MIL DIECISEIS



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

Detección de *Treponema pallidum subsp pallidum* para el diagnóstico de sífilis congénita mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa Convencional y PCR en tiempo real

Lesly Dayana Campos Leguizamón, Andrea Tatiana Duran Rodríguez, Gladys Pinilla Liliانا Muñoz.

Resumen

La sífilis congénita es producida por el *Treponema pallidum subsp pallidum*; esta enfermedad refleja la falta de atención prenatal y la carencia de control de las infecciones de transmisión sexual. El diagnóstico de la sífilis congénita es problemático, debido a que más de la mitad de los lactantes son asintomáticos y los restantes presentan sintomatología y signos inespecíficos; por esta razón se hace necesaria la implementación de una técnica sensible y específica que permita la detección temprana de los neonatos infectados, para garantizar un tratamiento oportuno; en el presente trabajo se comparó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional y PCR en tiempo real y se utilizaron diferentes tipos de muestras. Esta técnica es una alternativa diagnóstica y herramienta valiosa que podrá contribuir al control de la sífilis en gestantes y neonatos.

Palabras clave: sífilis congénita, *Treponema pallidum subsp pallidum*, PCR convencional. PCR en tiempo real

Abstract

Congenital syphilis is caused by *Treponema pallidum subsp pallidum*; this disease reflects the lack of prenatal care and control of sexually transmitted diseases. The diagnosis of congenital syphilis is problematic since more than half of the infants are asymptomatic and the remaining half show nonspecific signs and symptoms; therefore,



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

implementing a sensitive and specific technique that allows for early detection in infected newborns is necessary to ensure timely treatment. In the present study, conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) and real time PCR were compared and different types of samples were used. This technique is an alternative diagnosis and valuable tool that could contribute to the control of syphilis in pregnant women and infants.

Keywords: congenital syphilis, *Treponema pallidum subs pallidum*, conventional PCR, real time PCR.

1. Introducción

La sífilis es una de las enfermedades más antiguas conocidas y en la actualidad representa una alta morbilidad y mortalidad perinatal a nivel mundial (1,2), entre 0.5 y 1.0 millón de casos de sífilis congénita se producen en el mundo cada año y más de un quinto de los casos de mortalidad neonatal están directamente atribuidos a la sífilis en algunos países subdesarrollados (3), en donde el 10% de la población puede estar infectada (4).

Cuando la sífilis se presenta en el embarazo está asociada con pronósticos devastadores en la mayoría de los casos, incluyendo pérdida temprana del feto, muerte fetal, parto prematuro, bajo peso al nacer, muerte neonatal e infantil y enfermedades congénitas en los bebés recién nacidos (3). La detección temprana es crucial para la prevención de estas complicaciones (5); sin embargo, se presentan dificultades en el diagnóstico debido a que las mujeres embarazadas no tienen acceso a los controles prenatales (6,7); además, las técnicas no presentan especificidad suficiente para la identificación del microorganismo, la sensibilidad de estas es baja, algunas requieren de personal experto para su detección, se pueden presentar falsos positivos o falsos negativos y las técnicas no están ampliamente disponibles (3,8,9); por tanto, es necesario desarrollar una estrategia molecular de una alta sensibilidad y especificidad



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

que permita la identificación de *T. pallidum* en diversas muestras de neonatos (3,10). La reacción en la cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN, durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente (8).

La PCR puede identificar la presencia o ausencia de un patógeno bacteriano, proporciona información sobre la carga en que se encuentra el mismo y aporta información valiosa para suministrar el tratamiento (9). Además, se ha identificado como una herramienta con gran potencial para mejorar la capacidad en la detección de enfermedades infecciosas producidas por microorganismos de crecimiento lento (10). La PCR puede identificar un número menor de microorganismos que otras técnicas directas (11). Se ha reportado que este ensayo tiene una sensibilidad entre 91-95%; siendo la PCR en tiempo real más sensible y específica debido a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción, y no hay necesidad de que el producto amplificado sea manipulado en un gel de agarosa (8). Por tanto, tiene un gran valor potencial para el diagnóstico de la sífilis en diversos estadios, incluyendo la sífilis congénita (12).

2. Metodología

2.1 Diseño de primers

Inicialmente se realizó un análisis bioinformático para definir los primers a utilizar en cada uno de los ensayos, teniendo en cuenta que fueran específicos para cada uno de los genes blanco en estudio y se evaluaron las posibles interacciones que podían presentar.

Los primers diseñados fueron los siguientes:



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

GEN DIANA	PRIMER F	PRIMER R	TAMAÑO AMPLICÓN
<i>polA-1</i>	GTGTGCACTGGGCATTACAG	CAGCGTCGCAACATGTCC	200 pb
<i>polA-2</i>	TGAAGCTGACGACCTCATTG	GTCTGAGCACTTGCACCGTA	125 pb
<i>16S-1</i>	AGCGATACGCCTCTTGACAG	TGTGTAGCCCCGGACATAAG	203 pb
<i>16S-2</i>	TACGCCTCTTGACAGGTGCT	ACCTTCCTCCGGTTTGTAC	152 pb
<i>TpN47-1</i>	GCATTGTCTTAAGGCCGTTG	AAGCAGTCGAGGGTGCAGTA	210 pb
<i>TpN47-2</i>	GTAACGCGGGAGTCTTCCA	CATGGTTGACAGCGAGGAAT	135 pb

2.2 PCR convencional

Se realizó PCR convencional para comparar la amplificación de los genes *polA*, *TpN47* y *16S rDNA* de *Treponema pallidum subsp pallidum*.

Las concentraciones utilizadas para los ensayos fueron: MgCl₂ 3Mm, dNTPs 200uM, Primers 0.25uM, Taq 2.5U para una volumen final de reacción de 25 ul y 184 ng de DNA; las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 94°C por 1 min (por 5 min para *TpN47*); seguido de 30 ciclos para *polA* y *16S rDNA* o 35 ciclos para *TpN47* a 94°C por 30 segundos, 63°C por 1 min (para *PolA* y *TpN47*) o 62°C por 1 min (para *16S*), y 72°C por 1 min; finalmente 1 ciclo de 72°C durante 7 min (10 min para *TpN47*). Los productos fueron analizados por geles de agarosa al 1.8% teñidos con GR SAFE®.

2.3 PCR en tiempo real

Se ejecutaron ensayos de PCR en tiempo real para los genes *polA*, *16S rDNA* y *TpN47*. Las secuencias de los primers usados son las mostradas anteriormente. En la reacción se usó el Kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen®), con las siguientes concentraciones SYBR Green 1X y Primers 0.16uM. Las condiciones fueron: 1 ciclo a 50°C 2 min; 1 ciclo a 95°C 3 min; 45 ciclos 95°C 15 segundos y 62°C 30 segundos; 81 ciclos a 55°C 30 segundos y 95°C por 30 segundos. Se evaluó la



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

sensibilidad utilizando diluciones seriadas en base 2 de DNA plasmídico (concentración inicial 84,2 ng/ul) para *TpN47* y diluciones seriadas en base 2 de DNA de *Treponema pallidum* (concentración inicial 92 ng/ul) para *polA* y *16S*; y la especificidad se determinó para *TpN47* utilizando como plantilla el DNA de: *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *E.coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* y DNA humano.

2.4 PCR Nested

Se evaluó la amplificación del gen *TpN47* por PCR nested en muestras de sangre de cordón umbilical infectadas en el laboratorio, por ser el blanco molecular que mostro mejores resultados en las pruebas preliminares; se utilizó como plantilla un producto de PCR convencional de *TpN47-1*, con primers *TpN47-2*. Las concentraciones y condiciones fueron las mismas descritas para la PCR convencional. Para este ensayo se evaluó la sensibilidad realizando diluciones seriadas en base 10 de DNA, producto de PCR purificado de *TpN47-1* (concentración inicial 16,4 ng/ul) y se realizó PCR con *TpN47-2*. La especificidad se determinó usando como molde los DNA descritos para PCR en tiempo real.

3. Resultados

El análisis bioinformático de los primers diseñados mostro una alta especificidad para los blancos moleculares, además, no se evidencio interacciones entre los mismos que puedan interferir en la reacción de PCR.

Con PCR convencional se detectó *T. pallidum subsp pallidum* mediante el uso de los genes *polA*, *TpN47* y *16S* (Figura 1-2), se confirma la especificidad de los primers y la viabilidad de la técnica.



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”
 Multidisciplinario
 21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

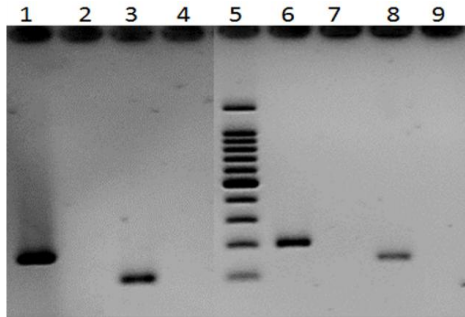


Figura 1. Electroforesis en gel e agarosa de PCR para los genes *poIA* y *16S rDNA*. 1. control positivo *poIA*-1 200 pb. 2. control negativo. 3. control positivo *poIA*-2 125pb. 4. control negativo. 5. marcador de peso 100pb. 6. control positivo *16S rDNA*-1 203 pb. 7. control negativo. 8. control positivo *16S rDNA*-2 152pb. 9. control negativo.

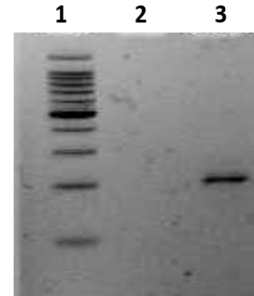


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de PCR para el gen *TpN47*. 1. Marcador de peso 100 pb. 2. control negativo. 3. control positivo *TpN47*-1 210 pb.

La comparación de la amplificación de los genes *poIA*, *TpN47* y *16S rDNA* por medio de Q-PCR muestra que se obtienen mejores valores de Ct cuando se amplifica el gen *TpN47* (Figura 3), además se observó que cuando se usa este gen como blanco molecular se obtiene mejor sensibilidad (tabla 1).

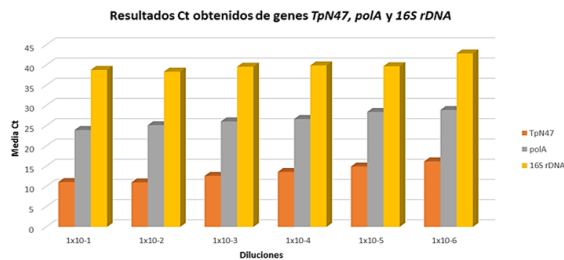


Figura 3. Comparación de los resultados obtenidos del Ct (Cycle threshold) de los genes *TpN47*, *poIA* y *16S rDNA* a partir de diluciones seriadas. Se considera como negativo desde el ciclo 30 de amplificación.

Tabla 1. Sensibilidad y especificidad de los genes en la Q-PCR

	<i>TpN47</i>	<i>poIA</i>	<i>16S</i>
Sensibilidad	0,16 ng*	11,5 ng	>184 ng
Especificidad	100%	**	**

*Cantidad detectada hasta la dilución 2⁻¹¹

** No se determinó, ya que se observaron mejores resultados con *TpN47*

La PCR nested con el gen *TpN47* evidencio ser una herramienta diagnostica útil en muestra clínicas de sangre de cordón umbilical (Figura 4); se incrementa la especificidad de la técnica, debido a que únicamente con la amplificación con *TpN47*-1 no se observaba la identificación del DNA del microorganismo en las muestras clínicas. Esta técnica mostró tener una sensibilidad de 0,328 fg y una especificidad del 100%.



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”
Multidisciplinario
21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

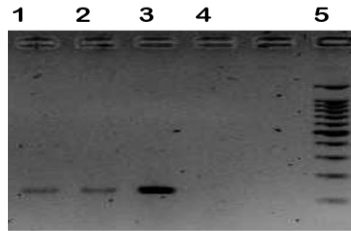


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de PCR Nested para el gen *TpN47* en muestras de sangre de cordón infectadas. 1. muestra #25, 135 pb, 2. muestra #50, 135 pb, 3. muestra #100, 135 pb, 4. Control negativo, 5. Marcador de peso 100 pb.

4. Conclusiones

Se estableció que el gen *TpN47* presenta el mejor resultado de sensibilidad y reproducibilidad en los ensayos realizados tanto en PCR convencional como en PCR en tiempo real, por tanto se probara como blanco diagnostico en distintos tipos de muestras clinicas de pacientes presuntivamente infectados para la detección de sífilis congénita.

Cuando se utilizó PCR nested con los primers *TpN47-2* se evidenció un considerable aumento de la sensibilidad.

La muestra de sangre de cordón umbilical empleada en el ensayo experimental mostró ser una acertada alternativa para la detección de sífilis congénita; sin embargo, se probarán otros tipos de muestras, para facilitar su uso y asegurar que cualquier tipo de muestra disponible posparto, pueda ser utilizada, obviando tomar una segunda muestra directa, en este tipo de pacientes, que resulta de alta complejidad.

5. Bibliografía

1. Howdhary, N., et al. Early detection of congenital syphilis. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2014; 32: 333-337.
2. Valderrama, Julia. Eliminación de sífilis congénita en América Latina y el Caribe:



CONGRESO
INTERNACIONAL
DE INVESTIGACION
E INNOVACION
DOS MIL DIECISEIS



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

marco de referencia para su implementación. Organización Panamericana de la Salud. 2005; Washington, D.C.

3. Casal Charliana Aragão Damasceno, Silva Mayra Oliveira da, Costa Igor Brasil, Araújo Eliete da Cunha, Corvelo Tereza Cristina de Oliveira. Molecular detection of *Treponema pallidum* sp. *pallidum* in blood samples of VDRL-seroreactive women with lethal pregnancy outcomes: a retrospective observational study in northern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2011; 44(4): 451-456.
4. Buffet M, Grange P, Gerhardt P, Carlotti A, Calvez V, Bianchi A, Dupi N. Diagnosing *Treponema pallidum* in Secondary Syphilis by PCR and Immunohistochemistry. *Journal of Investigative Dermatology.* 2007; 127:2345–2350.
5. Herring A, Ballard R, Mabey D, Peeling R. Evaluation of rapid diagnostic tests: syphilis. *Nature Reviews Microbiology.* 2006; S33-S40.
6. Luu, M., et al. Syphilis testing in antenatal care: Policies and practices among laboratories in the Americas. *International Journal of Gynecology and Obstetrics.* 2015; S0020-7292(15)00208-8.
7. Irene E. Martin, Weiming Gu, Yang, y Raymond Tsang SW. Macrolide resistance and molecular types of *Treponema pallidum* causing primary syphilis in Shanghai, China. *Clin Infect Dis.* 2009; 49 (4): 515 – 521.
8. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad.* 2013; Vol. 2, Núm 2: 70-78.
9. Tevfik, Dorak. *Real-time PCR.* Taylor & Francis Group. 2006.



“CONGRESO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN 2016”

Multidisciplinario

21 y 22 de abril de 2016, Cortazar, Guanajuato, México

10. Burstain JM, Grimprel E, Lukehart SA, Norgard MV, Radolf JD. Sensitive detection of *Treponema pallidum* by using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991; 29(1):62-69.
11. Pope V, Fox K, Liu H, et al. Molecular Subtyping of *Treponema pallidum* from North and South Carolina. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43(8):3743-3746.
12. Heymans R, van der Helm JJ, de Vries HJC, Fennema HSA, Coutinho RA, Bruisten SM. Clinical Value of *Treponema pallidum* Real-Time PCR for Diagnosis of Syphilis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010; 48(2):497-502.
13. Wahab AA, Ali UK, Mohammad M, Md. Monoto EM, Rahman MM. Syphilis in pregnancy. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 2015; 31(1):217-219.
14. Taylor et al. Correlates of syphilis seropositivity and risk for syphilis-associated adverse pregnancy outcomes among women attending antenatal care clinics in the Democratic Republic of Congo. *International Journal of STD & AIDS*. 2014; Vol. 25(10) 716–725.
15. Ham, D. C., et al. Improving global estimates of syphilis in pregnancy by diagnostic test type: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2015; pii: S0020-7292(15)00209-X.
16. Grange PA, Gressier L, Dion PL, et al. Evaluation of a PCR Test for Detection of *Treponema pallidum* in Swabs and Blood. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012; 50(3):546-552.
17. Palmer H, Higgins S, Herring A, Kingston M. Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. *Sexually Transmitted Infections*. 2003; 79(6):479.