



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
SERVICIO DE DERMATOLOGÍA, HOSPITAL GENERAL “DR. MANUEL GEA
GONZALEZ”**

**Identificación de *Treponema pallidum* spp., *pallidum* mediante una sonda tipo
TaqMan®, utilizando el gen *polA* en bloques de parafina positivos por
inmunohistoquímica**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
ESPECIALIDAD EN DERMATOLOGÍA**

**PRESENTA:
ANA MARIA GAMA MÉNDEZ**

**TUTORES PRINCIPALES:
LAURA GABRIELA MORENO COUTIÑO
MÉDICO ADSCRITO DEL DEPARTAMENTO DE MICOLOGÍA**

**RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO
INVESTIGADOR EN CIENCIAS MÉDICAS D. DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA DE
AGENTES PATÓGENOS**

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo de tesis con No.06-14-2016 presentado por la alumna Ana María Gama Méndez se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis Dra. Laura Gabriela Moreno Coutiño y del Dr. Rigoberto Hernández Castro con fecha de 21 de julio 2016 para su impresión final.



Dra. María Elisa Vega Memije

Subdirección de Investigación



Dra. Laura Gabriela Moreno Coutiño

Investigador principal

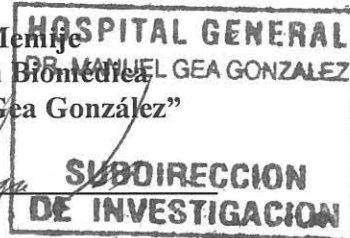
Este trabajo fue realizado en el Hospital General “Dr.Manuel Gea Gonzalez” en el servicio de dermatología, micología, dermatopatología y departamento de ecología de agentes patógenos bajo la dirección de la Dra. Laura Gabriela Moreno Coutiño y del Dr. Rigoberto Hernández Castro.

AUTORIZACIONES

Dr. Octavio Sierra Martínez
Director de Enseñanza e Investigación
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"



Dra. María Elisa Vega Menjíez
Subdirectora de Investigación Biomédica
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"



Dra. María Teresa Hojyo tomoka
Jefa de la División de Dermatología
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

M^a Teresa Hojyo T.

Dra. Laura Gabriela Moreno Coutiño
Adscrita del departamento de Micología
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

LGMC

Dr. Rigoberto Hernández Castro
Investigador en Ciencias Médicas D. Departamento de Ecología de Agentes Patógenos
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

RC

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis va dedicada principalmente a mis papas, porque no hay palabras para agradecerles el no dudar que la mejor inversión que hacían era en mi educación.

A mi hermana, Fernanda, porque no se que haría sin ella.

A Carlos, mi hermano.

A mi roomie, por ser un gran amigo y aguantarme los primeros años de derma.

A mis tíos Maru, Juan Manuel y Raúl por su apoyo.

A Gaby Moreno, por tomarme en cuenta en sus ideas, escucharme y ayudarme a descantinflar mis pensamientos.

A Rigo, por jalarme las orejas y no dejarme ser mediocre, por su disponibilidad, paciencia, interés y enseñanza.

Al equipo de Rigo, Aceituno y Erika, que ayudan a hacer esto posible.

A la Dra. Toussaint, Dr. Arenas y Dr. Roldán, mis maestros, por alfabetizarme en la dermatología.

A la Dra. Vega, por su ayuda y consejos.

A la Dra. Hojyo por compartir su sabiduría.

A Lore Lammoglia, por enseñarme más que dermatología, a ser balanceada y competente al mismo tiempo, ayudarme a atreverme en mis tratamientos y exigirme académicamente de manera continua.

A Vero Fonte, porque no hay persona más valiente y congruente que ella.

Al equipo de dermatología del Gea González, porque es su gente la que me ha hecho disfrutar la residencia y exprimirla al máximo.

Identificación de *Treponema pallidum* spp., *pallidum* mediante una sonda tipo TaqMan®, utilizando el gen *polA* en bloques de parafina positivos por inmunohistoquímica

Colaboradores:

Nombre: Ana María Gama Méndez

Firma: _____

Nombre: Laura Gabriela Moreno Coutiño

Firma: _____

Nombre: Rigoberto Hernández Castro

Firma: _____

Nombre: Sonia Toussaint Caire

Firma: _____

Nombre: Erika Margarita Carrillo Casas

Firma: _____

Nombre: Ramón Felipe Fernández Martínez

Firma: _____

INDICE

Glosario	8
Relación de tablas y figuras	9
Resumen	10
Abstract	12
Introducción.....	13
Pruebas serológicas no treponémicas y treponémicas	13
Métodos de identificación directa	13
Métodos de identificación molecular.....	13
Objetivo	13
Material y métodos	14
Criterios de selección de la muestra	14
Extracción del ADN y amplificación de PCR	16
Identificación molecular de <i>T. pallidum</i> spp., <i>pallidum</i> mediante PCR punto final.....	16
Identificación molecular de <i>T. pallidum</i> spp., <i>pallidum</i> con PCR en tiempo real mediante la detección del gen <i>polA</i>	17
Resultados	19
Discusión	25
Conclusión	29
Bibliografía	30

GLOSARIO

T. pallidum = *Treponema pallidum*.

VIH= Virus de la inmunodeficiencia humana.

PCR= Reacción en cadena de la polimerasa.

qPCR= Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

TaqMan®= Sonda de hidrólisis que se basa en la actividad de la exonucleasa 5'-3' TAQ polimerasa y el videojuego Pac-Man (Taq polimerasa + Pac-Man = TaqMan®).

ADN = Ácido desoxirribonucleico.

Pb = pares de bases

RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de los pacientes. “M”: masculino, “F” : femenino, “NA” : No aplica, “+” : positivo, “-”: negativo.

Tabla 2. Concentración de ADN total de muestras embebidas en parafina.

Tabla 3. Concentración de ADN de las muestras clínicas, PCR punto final (“+” : muestras positivas para gen *polA* , “-” : muestras negativas para el gen *polA*) y determinación de número de copias del genoma por muestra a través de PCR en tiempo real.

Figura 1. Identificación de *Treponema pallidum* spp., *pallidum* mediante la amplificación de un fragmento de 377 pb del gen *polA*. Carril 1. Marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder. Carril 2. Muestra 859; Carril 3. Muestra 636; Carril 4. Muestra 723; Carril 5. Muestra 8522; Carril 6. Muestra 230; Carril 7. Muestra 664; Carril 8. Muestra 155; Carril 9. Control negativo (NTC) y Carril 10. Control positivo *T. pallidum* spp., *pallidum* cepa SS14.

Figura 2. Identificación de *Treponema pallidum* spp., *pallidum* mediante la amplificación de un fragmento de 377 pb del gen *polA*. Carril 1. Marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder. Carril 2. Muestra 397; Carril 3. Muestra 1053; Carril 4. Muestra 169; Carril 5. Muestra 1896; Carril 6. Muestra 71-12; Carril 7. Muestra 860; Carril 8. Muestra 1832; Carril 9. Muestra 1059 y Carril 10. Control positivo *T. pallidum* spp., *pallidum* cepa SS14.

Figura 3. Detección del gel *polA* mediante PCR en tiempo real (qPCR), después de utilizar un protocolo de 50 ciclos con el sistema LightCycler 480II (Roche). Fluorografías de las muestras clínicas y el control positivo (*T. pallidum* spp., *pallidum* SS14) donde se observa la amplificación de las muestras antes del punto de corte de 36 ciclos, así como el control negativo.

Figura 4. Detección del gel *polA* mediante PCR en tiempo real (qPCR), después de utilizar un protocolo de 50 ciclos con el sistema LightCycler 480II (Roche). Fluorografías de las muestras clínicas y el control positivo (*T. pallidum* spp., *pallidum* SS14) donde se observa la amplificación de las muestras antes del punto de corte de 36 ciclos, así como el control negativo.

Figura 5. Determinación de número de copias de genoma por muestra clínica. **Primera ventana:** desarrollo de curva estándar con 4 diferentes diluciones de ADN de *T. pallidum* spp., *pallidum* SS14. **Segunda ventana:** muestras clínicas aplicando la fórmula para número de copias de genomas.

Identificación de *Treponema pallidum* spp., *pallidum* mediante una sonda tipo TaqMan®, utilizando el gen *polA* en bloques de parafina positivos por inmunohistoquímica

GAMA A., HERNÁNDEZ-CASTRO R., TOUSSAINT S., CARRILLO E., FERNÁNDEZ R., MORENO-COUTIÑO G.
INTRODUCCIÓN: La sífilis es una enfermedad infectocontagiosa, sistémica de transmisión sexual, causada por la espiroqueta *Treponema pallidum* spp., *pallidum*.¹

Existen diferentes técnicas para realizar el diagnóstico de la espiroqueta incultivable *Treponema pallidum*. Las pruebas tradicionales permiten la detección de la espiroqueta de manera directa e indirecta. Indirectamente a través de pruebas serológicas que se dividen en dos categorías: treponémicas y no treponémicas. Y de manera directa a través de la examinación microscópica de *T. pallidum* proveniente de alguna muestra clínica. Las pruebas serológicas no treponémicas presentan resultados falsos positivos (1 a 2%) por reacción cruzada ya que los anticuerpos antifosfolípido que se detectan son producidos también en respuesta a una variedad de condiciones que no se relacionan con la sífilis. Los resultados falsos negativos son por el fenómeno de prozona que ocurre en 1 a 2% de los pacientes, especialmente en mujeres embarazadas y en pacientes con VIH, particularmente en aquellos con cuentas bajas de CD4.^{1,2,3} Las pruebas serológicas treponémicas sirven para verificar la reactividad de pruebas no treponémicas y como diagnósticas en pacientes que presentan pruebas no treponémicas no reactivas pero con signos y síntomas de sífilis tardía.

Por otro lado, las pruebas de identificación directa como la microscopía de campo oscuro y la inmunohistoquímica son operador dependiente. Presentan limitada sensibilidad y el no encontrar la espiroqueta a través de estos métodos no excluye la infección por sífilis.²

Por último el desarrollo de herramientas moleculares ha revolucionado el diagnóstico de la sífilis en los últimos años. El uso de marcadores genéticos específicos de este microorganismo ha facilitado el diagnóstico más rápido, certero y preciso. Técnicas como la PCR en punto final o PCR en tiempo real (qPCR) de diagnóstico cuantitativo ha permitido contar con pruebas que han acertado el tiempo de identificación de este microorganismo. Si bien, hace unos años los costos de estas pruebas moleculares eran altos, hoy en día se han reducido enormemente siendo más accesibles para los laboratorios.

OBJETIVO: Determinar el porcentaje de muestras positivas con PCR punto final y tiempo real de muestras embebidas en parafina positivas por inmunohistoquímica para *T. pallidum* spp., *pallidum* mediante una sonda de hibridación tipo TaqMan®.

MATERIAL Y MÉTODOS: Diseño observacional, descriptivo, prolectivo y transversal. Población de estudio: muestras de piel embebidas en parafina del departamento de dermatopatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González por medio de una base de datos de 125 biopsias de piel entre los años 1993 a 2015 en cuyo registro se incluía la palabra sífilis o sifilítico, como antecedente, diagnóstico clínico, histológico, comentario o exclusión de la enfermedad. De éstas 125 biopsias, se eligieron aquellas positivas por inmunohistoquímica para *T. pallidum* spp., *pallidum*. Resultando en una muestra por conveniencia de 17 bloques de parafina. Se extrajo el ADN de estas muestras y se sometió a reacción en cadena de la polimerasa punto final y tiempo real (sonda TaqMan®) para identificar el gen *polA*.

RESULTADOS: Utilizando la reacción en cadena de la polimerasa punto final 11 muestras (64.70%) resultaron positivas y 6 muestras (35.29%) resultaron negativas. Cuando se realizó la reacción en cadena de polimerasa mediante una sonda tipo TaqMan® el 100% de las muestras resultaron positivas. La cantidad mínima de espiroquetas detectada por muestra fue de 2.

CONCLUSIONES: Partiendo de que resulta técnicamente desafiante la extracción de ADN de muestras clínicas embebidas en bloques de parafina, como es el caso de los 17 especímenes recopilados en un periodo de 22 años en nuestro estudio, se optó por detectar a través de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real a través de una sonda tipo TaqMan® el gen *polA*. Se seleccionó el gen *polA* por ser el blanco genómico con mayor especificidad, asimismo se prefirió la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real por ser un método con bajo riesgo de contaminación capaz de detectar un mínimo de dos espiroquetas por muestra.

En el 100% de las muestras se obtuvo un resultado positivo. Detectándose, como lo reporta la literatura, un mínimo de dos *Treponemas* en 100 ng de ADN. Al modificar la variable de la reacción en cadena de polimerasa a su versión en punto final, se obtuvo que 11 muestras (64.70%) presentaban infección por *T. pallidum* spp., *pallidum*, sin embargo no pudo identificarse el material genético de la espiroqueta en las 6 muestras restantes (35.29%).

Las técnicas utilizadas en este estudio en los casos en donde *Treponema* se manifiesta clínicamente en piel y/o líquidos corporales son de gran utilidad.

Sugerimos que la mejor manera de diagnosticar sífilis primaria o secundaria es a través de la identificación del gen *polA* por medio de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

PALABRAS CLAVE: sífilis, *Treponema pallidum* spp., *pallidum*, diagnóstico molecular, qPCR, *polA*

***Treponema pallidum* spp., *pallidum* identification by a TaqMan® probe using the *polA* gene in paraffin embedded biopsies positive for immunohistochemistry**

GAMA A., HERNÁNDEZ-CASTRO R., TOUSSAINT S., CARRILLO E., FERNÁNDEZ R., MORENO-COUTIÑO G.

INTRODUCTION: Syphilis is a systemic and sexually transmitted infectious disease caused by *Treponema pallidum* spp., *pallidum*.

There are many laboratory techniques to detect the uncultivable spirochaete *Treponema pallidum*. Usual laboratory diagnostic tests can identify the microorganism on a direct and on an indirect way. Indirectly by serologic tests that are divided in two categories: treponemic and non treponemic. And directly by microscopic examination of *T. pallidum* from a clinical specimen. Serologic non treponemic tests show false positive results (1-2%) by crossreaction of the produced antiphospholipid antibodies in response to a variety of non-syphilis related conditions. False negative results are consequence of the prozone phenomenon which occurs on 1 to 2% of patients, specially on pregnant woman and on HIV patients with low CD4 counts. Serologic treponemic tests are useful to verify non treponemic tests reactivity and in patients with negative non treponemic tests but with late syphilis signs and symptoms.

On the other side, direct tests like dark-field microscopy and immunohistochemistry require a great deal of experience and expertise. Their sensibility is limited, and the fact of not finding the spirochetes does not exclude the infection. Finally, the development of new molecular tools has revolutionized syphilis diagnosis on the last years. Microorganism specific genetic markers have simplified syphilis diagnosis, making it faster, more accurate and precise. Techniques like conventional PCR or quantitative real time PCR reduced the time on which the microorganism is identified. Few years ago, prices of these molecular tests were unreachable, nowadays they are affordable for numerous laboratories.

OBJECTIVE: To determine the percentage of positive *T. Pallidum* spp., *pallidum* immunohistochemistry paraffin embedded skin biopsies with conventional PCR and real time PCR using a TaqMan® probe.

MATERIAL AND METHODS: Observational, descriptive, protective and transversal study. Study population: paraffin embedded biopsies from the dermatopathology department of the Hospital General Dr. Manuel Gea González from a database of 125 biopsies between 1993 and 2015 which contained the words syphilis or syphilitic, as previous history, clinical or histopathological diagnosis, or exclusion diagnosis. From these 125 biopsies, the immunohistochemistry positive ones for *T. pallidum* spp., *pallidum* were chosen. With a convenience sample of 17 paraffin embedded biopsies. DNA was extracted and processed by conventional polymerase chain reaction and real-time PCR with a TaqMan® probe to identify *polA* gene.

RESULTS: Using conventional polymerase chain reaction we got 11 positive (64.70%) and 6 (35.29%) negative samples. When used real time polymerase chain reaction with a TaqMan® probe 100% of samples derived positive. The minimum of spirochetes detected by sample were 2.

CONCLUSION: From the standpoint that it is technically difficult to extract DNA from paraffin embedded biopsies, like the 17 samples collected in a 22 year period in our study. We chose to detect by a TaqMan® probe with real time PCR the *polA* gene. The *polA* gene was selected because it is a genomic target with exceptional specificity, furthermore real time PCR was chosen because is a technique with low contamination risk, capable to detect a minimum of 2 spirochetes by sample.

We had positive results in 100% of the clinical samples. Detecting, like the literature, a minimum of two treponemes on 100 ng of DNA. When conventional PCR was used, 11 samples (64.70%) resulted with *T. pallidum* spp., *pallidum* infection, however the technique was not able to detect the organism on the other 6 samples (32.29%).

The techniques employed are really effective where the clinical manifestations of *Treponema* in skin or corporal fluids can be seen. We suggest so, that the best way to diagnose primary or secondary syphilis is by identifying *polA* gene by real time PCR.

KEYWORDS: syphilis, *Treponema pallidum* spp., *pallidum*, molecular diagnosis, qPCR, *polA*.

INTRODUCCIÓN

La sífilis es una enfermedad infectocontagiosa, sistémica de transmisión sexual, causada por la espiroqueta *Treponema pallidum* spp., *pallidum*.¹

Existen diferentes técnicas para realizar el diagnóstico de la espiroqueta incultivable *Treponema pallidum*. Las pruebas tradicionales permiten la detección de la espiroqueta de manera directa e indirecta. Indirectamente a través de pruebas serológicas que se dividen en dos categorías: treponémicas y no treponémicas. Y de manera directa a través de la examinación microscópica de *T. pallidum* proveniente de alguna muestra clínica. Las pruebas serológicas no treponémicas presentan resultados falsos positivos (1 a 2%) por reacción cruzada ya que los anticuerpos antifosfolípido que se detectan son producidos también en respuesta a una variedad de condiciones que no se relacionan con la sífilis. Los resultados falsos negativos son por el fenómeno de prozona que ocurre en 1 a 2% de los pacientes, especialmente en mujeres embarazadas y en pacientes con VIH, particularmente en aquellos con cuentas bajas de CD4.^{1,2,3}

Las pruebas serológicas treponémicas sirven para verificar la reactividad de pruebas no treponémicas y como diagnósticas en pacientes que presentan pruebas no treponémicas no reactivas pero con signos y síntomas de sífilis tardía.

Por otro lado, las pruebas de identificación directa como la microscopía de campo oscuro y la inmunohistoquímica son operador dependiente. Presentan limitada sensibilidad y el no encontrar la espiroqueta a través de estos métodos no excluye la infección por sífilis.²

Por último el desarrollo de herramientas moleculares ha revolucionado el diagnóstico de la sífilis en los últimos años. El uso de marcadores genéticos específicos de este microorganismo ha facilitado el diagnóstico más rápido, certero y preciso. Técnicas como la PCR en punto final o PCR en tiempo real (qPCR) de diagnóstico cuantitativo ha permitido contar con pruebas que han acortado el tiempo de identificación de este microorganismo. Si bien, hace unos años los costos de estas pruebas moleculares eran altos, hoy en día se han reducido enormemente siendo más accesibles para los laboratorios.

OBJETIVO

Determinar el porcentaje de muestras positivas con PCR en tiempo real de muestras embebidas en parafina positivas por inmunohistoquímica para *T. pallidum* spp., *pallidum* mediante una sonda de hibridación tipo TaqMan®.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se eligieron muestras de piel embebidas en parafina del departamento de dermatopatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González por medio de una base de datos de 125 biopsias de piel entre los años 1993 a 2015 en cuyo registro se incluía la palabra sífilis o sifilítico, como antecedente, diagnóstico clínico, histológico, comentario o exclusión de la enfermedad.

De éstas 125 biopsias, se eligieron aquellas positivas por inmunohistoquímica para *T. pallidum* spp., *pallidum*. Resultando en una muestra por conveniencia de 17 bloques de parafina.

Número de muestra	Registro de Muestra	Sexo	Edad	VIH	VDRL	Diagnóstico clínico	Diagnóstico histológico
1	1832-13	M	32	NA	+	Secundarismo sifilítico Vs Verruga vulgar	Dermatitis de interfaz liquenoide superficial y profunda
2	636-11	M	29	+	NA	Chancroide Vs Herpes genital	Chancro sifilítico
3	71-12	M	51	NA	+	Papilomatosis oral	Estomatitis psoriasiforme con infiltrado linfoplasmocitario superficial
4	718-15	M	27	NA	NA	Secundarismo sifilítico	Dermatitis perivascular superficial por linfocitos con mínimo daño de interfaz vacuolar
5	397-14	M	27	+	NA	Secundarismo sifilítico Vs Erupción morbiliforme viral o por fármacos	Dermatitis de interfaz liquenoide por linfocitos y células plasmáticas por infección por treponema
6	776-12	M	23	+	NA	Psoriasis Vs Sífilis Vs Eritema multiforme	Secundarismo sifilítico
7	723-12	F	1mes	NA	NA	Psoriasis	Sífilis cutánea congénita
8	860-11	M	28	+	NA	Reacción a medicamentos	Secundarismo sifilítico
9	1896-14	M	62	NA	-	Eritema polimorfo Vs Secundarismo sifilítico	Secundarismo sifilítico
10	852274-14	M	53	-	+	Secundarismo sifilítico	Dermatitis de interfaz vacuolar liquenoide con infiltrado inflamatorio de células plasmáticas.
11	155-12	M	51	NA	+	Psoriasis plantar Vs Secundarismo sifilítico	Dermatitis perivascular superficial por linfocitos y células plasmáticas
12	169-14	M	37	+	NA	Secundarismo sifilítico Vs Psoriasis Vs Parapsoriasis	Dermatitis psoriasiforme y esponjiforme superficial con cúmulos de paraqueratosis y neutrófilos
13	859-14	M	47	NA	+	Secundarismo sifilítico Vs Dermatitis neutrofílica Vs Farmacodermia	Secundarismo sifilítico con infiltrado linfoide liquenoide superficial y profundo atípico
14	664-11	M	55	NA	NA	Vasculitis Vs Farmacodermia	Dermatitis de interfaz liquenoide con paraqueratosis y queratinocitos necróticos
15	230-15	M	24	+	+	Infección por VPH Vs Secundarismo sifilítico	Úlcera cutánea con presencia de Treponema
16	1053-14	M	21	+	NA	Primosecundarismo sifilítico	Secundarismo sifilítico
17	2274-14	M	43	NA	NA	Eritema multiforme Vs Sífilis secundaria	Dermatitis de interfaz liquenoide por linfocitos y células plasmáticas

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de los pacientes. “M”: masculino, “F” : femenino, “NA” : No aplica, “+” : positivo, “-”: negativo.

EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DE PCR

Se realizó la extracción del ADN total de 17 bloques de parafina con inmunohistoquímica positiva para *T. pallidum*.

Las muestras fueron colocadas en tubos de 1.5 ml estériles. Cada muestra contenía 10 cortes de 5 micras de grosor de tejido embebido en parafina. Para desparafinar el tejido se agregó 1.2 ml de xilol y se mezcló de forma vigorosa. Se centrifugó a 13 mil rpm por 5 min a temperatura ambiente (25°C) y el sobrenadante fue eliminado. La pastilla de tejido fue lavada con etanol al 96% (1.2 ml) para eliminar el xilol, se mezcló suavemente y se centrifugó a 13 mil rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Este último paso fue realizado dos veces. El sobrenadante se eliminó y el tejido se colocó a 37°C hasta estar completamente seco.

La extracción de ADN se realizó utilizando el sistema comercial DNeasy Blood and Tissue de Qiagen (Qiagen, Ventura, CA. USA). Brevemente, al tejido sin parafina y seco se le agregó 180 µl de solución de lisis ATL y 40 µl de proteinasa K y se incubó a 56°C por 12 h.

Posteriormente se adicionaron 200 µl de la solución AL y 200 µl de etanol al 96% mezclando suavemente, para después colocar la muestra en una columna de afinidad y centrifugar a 8 mil rpm durante 1 min. La columna que contenía el ADN fue lavada con la solución AW1 (500 µl) y centrifugada a 8 mil rpm durante 1 min, un nuevo lavado fue realizado con la solución AW2 (500 µl) y centrifugado a 13 mil rpm durante 1 min.

El ADN se obtuvo al colocar 50 µl de agua estéril en la columna y centrifugar a 13 mil rpm durante 1 min.

El ADN fue visualizado en el gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para determinar su pureza, concentración e integridad. Posteriormente la concentración de DNA fue determinada utilizando un espectrofotómetro de luz ultravioleta de 260 nm-280 nm y se utilizaron 100 ng de ADN total para amplificar el gen *polA*. Finalmente el ADN fue almacenado a 4°C hasta su uso.

Identificación molecular de *T. pallidum* spp., *pallidum* mediante PCR punto final

Se utilizaron iniciadores específicos para el gen *polA*; F1: 5-TGCCGCGTGCGAATGGTGTGGTC y R1: 5-CACAGTGCTCAAAAACG

CCTGCACG-3, que amplifican un fragmento de 377 pb.⁴

Con un volumen final de 25 µl para la reacción de amplificación, con 100 ng de template de DNA, 12.5 µl de TopTaq Master Mix (Qiagen, Ventura, CA. USA), 100 pM de primers c/u, y agua grado biología molecular cbp., 25 µl. El protocolo de amplificación incluyó una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 65°C por 30 seg y 72°C por 40 seg, por último una extensión final a 72°C por 5 min. El producto fue analizado a través de reacción en cadena de polimerasa en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Se tomaron imágenes en un digitalizador GelLogic2000 (Carestream, Palo Alto CA. USA).

Identificación molecular de *T. pallidum* spp. *pallidum* con PCR en tiempo real mediante la detección del gen *poIA*

La determinación de *T. pallidum* fue realizada mediante la amplificación de una región variable del gen *poIA* (110 pb), con los iniciadores (5-GGTAGAAGGGAGGG CTAGTA) y (5-CTAAGATCTCTATTT TCTATAGGTATGG) y la secuencia TaqMan® 5-FAM-ACACAG CACTCGTCTTCAACTCC-BHQ1 (FAM es 6-carboxyfluoresceína y BHQ1 es Black Hole Quencher). La reacción de amplificación contenía 0.5 µmol/L de cada iniciador, 10 µmol/L de DNTP's, 1.5 mmol/L de MgCl₂ y 1× de buffer de PCR y 2 unidades de enzima TAQ polimerasa. Las condiciones de PCR incluyeron una desnaturalización inicial de 93°C por 5 min; las condiciones de amplificación consistieron en 50 ciclos a 95°C por 30 seg., alineamiento de 55°C por 30 seg., y una extensión a 72°C por 30 seg.⁵

El punto de corte del control positivo o “cycle threshold” (CT) fue en el ciclo 36. Valores de CT de 36 a 40 fueron considerados en la zona gris o muestras sospechosas. Estas muestras serán analizadas de nuevo y consideradas positivas si el valor está por debajo del ciclo 40. Como control positivo se utilizó *T. pallidum* spp., *pallidum* cepa SS14 (Atlanta, USA; 1977) y como control negativo *Leptospira interrogans*. La amplificación fue realizada en un equipo Light Cycler 480II (Roche).

Para la determinación del número de copias en cada muestras o número de genomas de *T. pallidum* spp., *pallidum* se construyó una curva estándar utilizando el ADN de *T. pallidum* spp., *pallidum* cepa SS14 a diferentes concentraciones. Posteriormente se utilizó el programa Light Cycler 480II (Roche), así como el tamaño del genoma de *T. pallidum* spp.,

pallidum cepa SS14 (1,11 E+06 pb), aplicado a la siguiente fórmula: donde n es el número de pares de bases, m es la masa del ADN, N es un número de Avogadro's ($6,02 \times 10^{23}$ pb/mol) y M es el peso molecular medio de una base/par (610 g/mol).

RESULTADOS

Se realizó la extracción de ADN total de las muestras de piel embebidas en parafina. Posteriormente se determinó la concentración de ADN mediante espectrofotometría. Se encontraron muestras con ADN total de hasta 477.5 ng como límite mayor y 14.5 como límite menor (Tabla 2). Se utilizaron 100 ng de ADN total para las reacciones de PCR en punto final y tiempo real.

Número de muestra	Muestra (20 mg)	Concentración de ADN total (ng/ μ l)
1	1832-13	29.6545
2	636-11	193.2545
3	71-12	14.584
4	718-15	67.3345
5	397-14	14.5435
6	776-12	54.62
7	723-12	58.004
8	860-11	45.5035
9	1896-14	31.5835
10	852274-14	47.8085
11	155-12	94.165
12	169-14	27.8555
13	859-14	112.1585
14	664-11	58.2415
15	230-15	477.51
16	1053-14	28.8455
17	2274-14	16.138

Tabla 2. Concentración de ADN total de muestras embebidas en parafina.

Se sometió el ADN a reacción en cadena de la polimerasa punto final para la identificación del gen *polA* (377 pb). Resultaron positivas 11 muestras (64.7%) y 6 negativas (35.29%).

Las muestras 636-11, 230-15, 71-12, y 859-14 fueron las que mostraron mayor rendimiento en el PCR punto final (Figura 1 y 2).

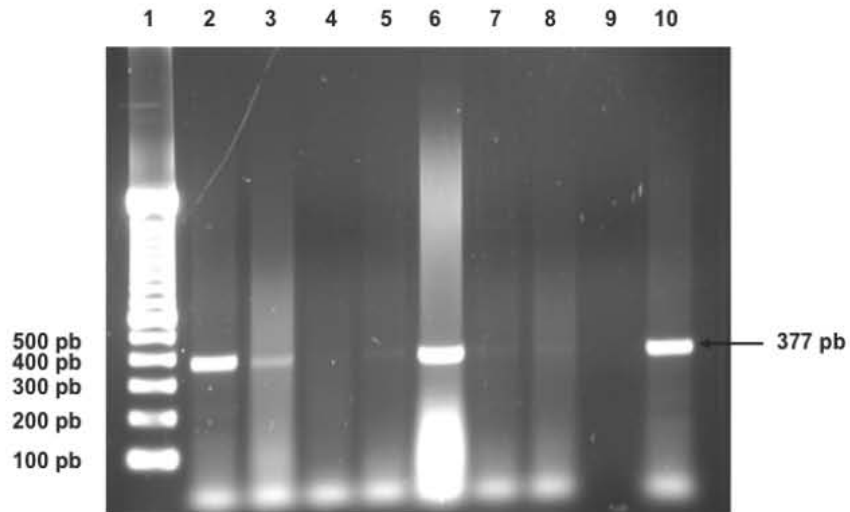


Figura 1. Identificación de *Treponema pallidum* spp. *pallidum* mediante la amplificación de un fragmento de 377 pb del gen *polA*. **Carril 1.** Marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder. **Carril 2.** Muestra 859; **Carril 3.** Muestra 636; **Carril 4.** Muestra 723; **Carril 5.** Muestra 8522; **Carril 6.** Muestra 230; **Carril 7.** Muestra 664; **Carril 8.** Muestra 155; **Carril 9.** Control negativo (NTC) y **Carril 10.** Control positivo *T. pallidum* spp. *pallidum* cepa SS14.

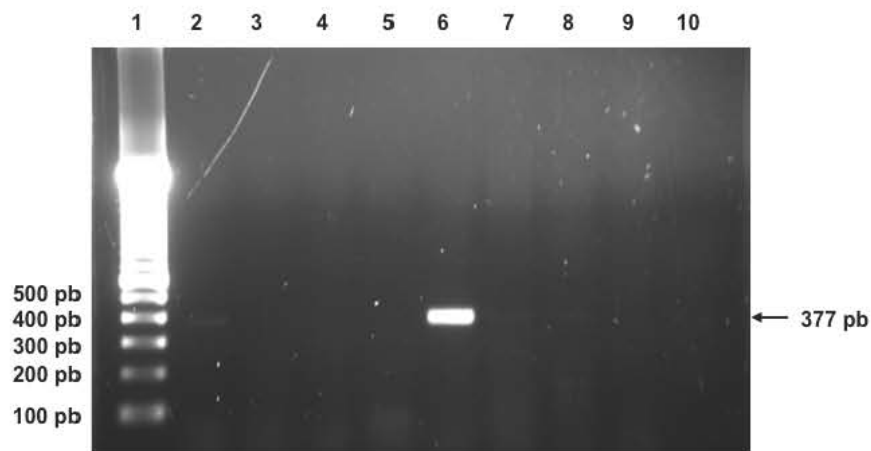


Figura 2. Identificación de *Treponema pallidum* spp. *pallidum* mediante la amplificación de un fragmento de 377 pb del gen *polA*. **Carril 1.** Marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder. **Carril 2.** Muestra 397; **Carril 3.** Muestra 1053; **Carril 4.** Muestra 169; **Carril 5.** Muestra 1896; **Carril 6.** Muestra 71-12; **Carril 7.** Muestra 860; **Carril 8.** Muestra 1832; **Carril 9.** Muestra 1059 y **Carril 10.** Control positivo *T. pallidum* spp. *pallidum* cepa SS14.

Para la identificación de *T. pallidum* spp., *pallidum* mediante PCR en tiempo real utilizando una sonda TaqMan®, las muestras con 100 ng de ADN tota fueron analizadas para detectar un fragmento blanco de 110 pb del gen *polA*. Después de utilizar un protocolo de 50 ciclos con el sistema Light Cycler 480II (Roche) se determinó que todas las muestras fueron positivas a la presencia de *T. pallidum* spp., *pallidum* (Figuras 3 y 4).

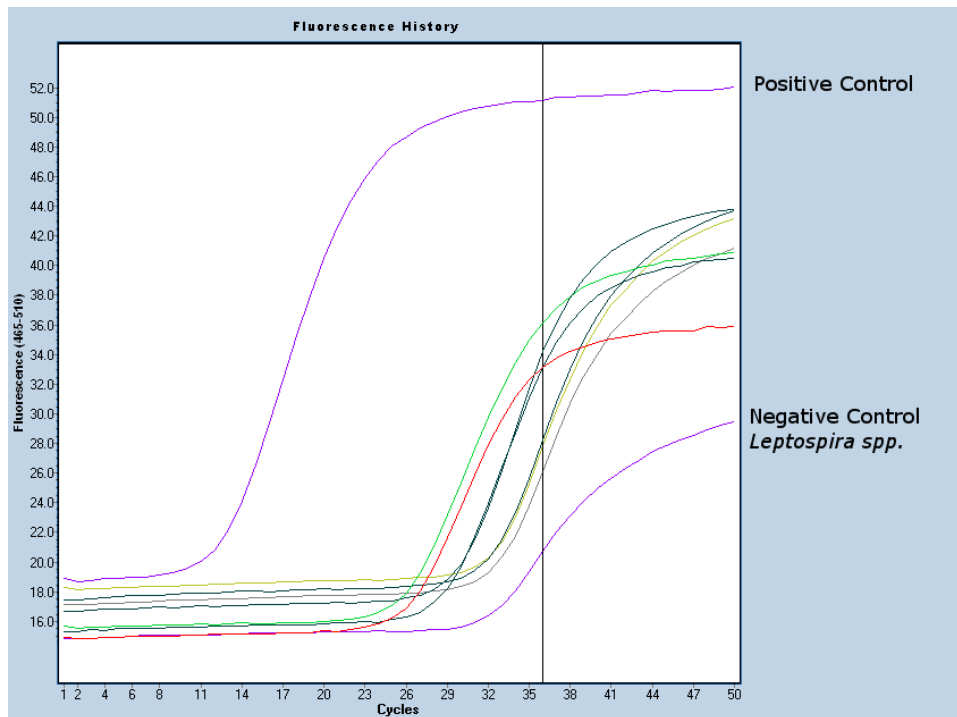


Figura 3. Detección del gen *polA* mediante PCR en tiempo real (qPCR), después de utilizar un protocolo de 50 ciclos con el sistema LightCycler 480II (Roche). Fluorografías de las muestras clínicas y el control positivo (*T. pallidum* spp., *pallidum* SS14) donde se observa la amplificación de las muestras antes del punto de corte de 36 ciclos, así como el control negativo.

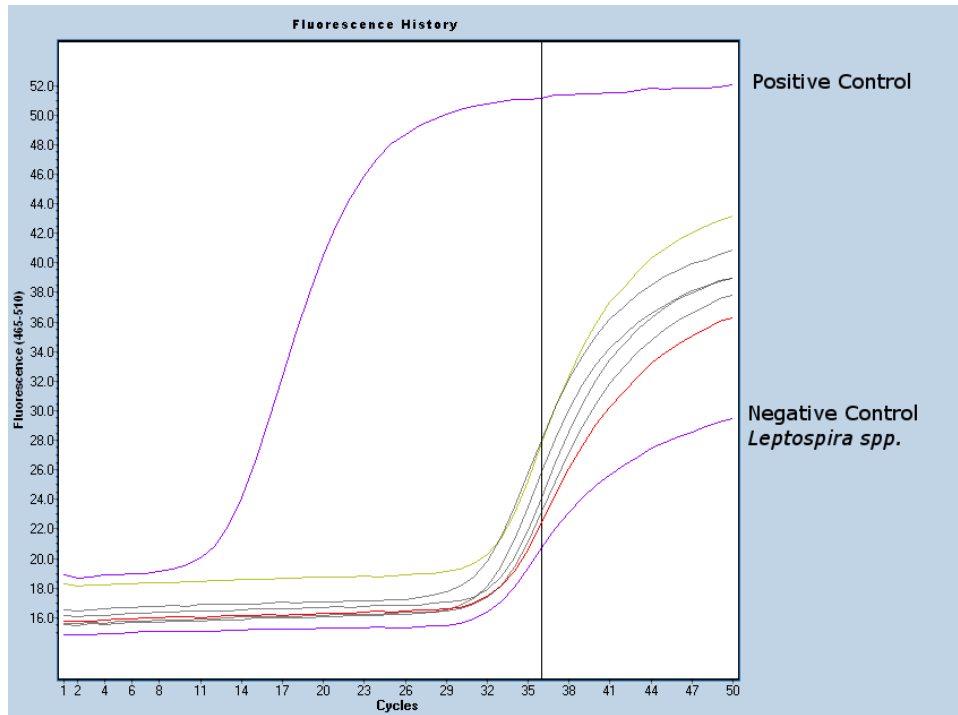


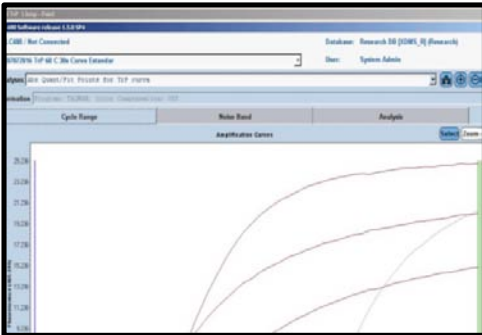
Figura 4. Detección del gen *polA* mediante PCR en tiempo real (qPCR), después de utilizar un protocolo de 50 ciclos con el sistema LightCycler 480II (Roche). Fluorografías de las muestras clínicas y el control positivo (*T. pallidum* spp., *pallidum* SS14) donde se observa la amplificación de las muestras antes del punto de corte de 36 ciclos, así como el control negativo.

Por otro lado, se cuantificó el número de genomas en cada muestra clínica, utilizando el tamaño del genoma de *T. pallidum* spp., *pallidum* SS14, aplicando la fórmula: $\text{Genoma} = \frac{1.11\text{E}+06 \text{ pb} \times [\text{ng}] \text{ mg}}{[1.22\text{E}-09 \text{ ng}] \text{ mg} \times [1000 \times 660] / \text{número de Avogadro}}$ (Figura 5). Después de realizar la ecuación a cada muestra se determinó que el límite menor de detección fue de 2.3 genomas en la muestra 169-14 y el mayor número de genomas en la muestra 71-12 con 2670 copias. Los resultados totales de números de copias por muestras se detallan en la tabla 3.

Número de muestra	Muestra (100 ng)	PCR en punto final (+ ó - para gen <i>polA</i>)	PCR en tiempo real (número de copias del gen <i>polA</i>)
1	1832-13	-	4.8
2	636-11	+	236
3	71-12	+	2670
4	718-15	-	13.3
5	397-14	-	8.9
6	776-12	+	95.4
7	723-12	-	26.7
8	860-11	-	21.1
9	1896-14	-	3.5
10	852274-14	-	13.9
11	155-12	-	6.48
12	169-14	-	2.3
13	859-14	+	132
14	664-11	-	14.2
15	230-15	+	65.3
16	1053-14	-	51.9
17	2274-14	-	40.1

Tabla 3. Concentración de ADN de las muestras clínicas, PCR punto final (“+”: muestras positivas para gen *polA*, “-”: muestras negativas para el gen *polA*) y determinación de número de copias del genoma por muestra a través de PCR en tiempo real.

Curva Estándar



Análisis

Genoma 1.11E+06 pb [1.22E-09 ng]

mg= pb[1000*660]/ Avogadro

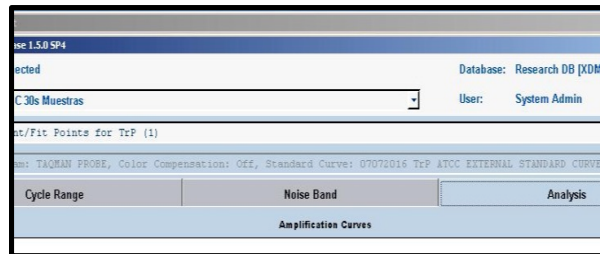
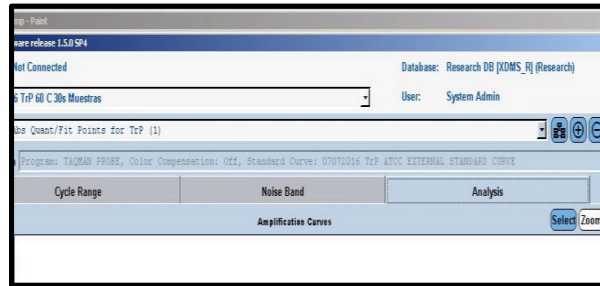


Figura 5. Determinación de número de copias de genoma por muestra clínica. **Primera ventana:** desarrollo de curva estándar con 4 diferentes diluciones de ADN de *T. pallidum* spp., *pallidum* SS14. **Segunda ventana:** muestras clínicas aplicando la fórmula para número de copias de genomas.

DISCUSION

El diagnóstico adecuado de la sífilis depende de la combinación de la presentación clínica, la historia de paciente, pruebas serológicas y pruebas de detección directa. Hasta el momento no existe una prueba “gold estándar” por lo que pruebas como la microscopía en campo oscuro y las pruebas de PCR son las más utilizadas para la detección de *T. pallidum* en lesiones o exudados.

El único método de identificación directa de la espiroqueta no operador dependiente es el de la amplificación del ácido nucleico por medio de la reacción en cadena de la polimerasa el cual brinda un espectro amplio de sensibilidades diagnósticas (42 al 100%).^{6,7}

Esta variabilidad en las sensibilidades reportadas se debe a que son varias las características que deben de considerarse: el tipo de muestra, método de PCR utilizado y blanco genómico.

MUESTRA

Para el diagnóstico se puede amplificar ADN de distintas muestras biológicas como sangre completa, suero, orina, líquido cefalorraquídeo, muestra de exudado del lóbulo de la oreja, etc.

En la sífilis primaria, identificando el gen de 47-kDa en sangre completa, suero y orina, las sensibilidades varían de 28%, 55%, 29%, respectivamente, y en la sífilis secundaria varían entre 19-55%, 21-73%, 14-79%, 12-18%, respectivamente.⁸

Se ha reportado que la sensibilidad del estudio es independiente del marcador genético y dependiente del tipo de espécimen clínico en donde se compararon diferentes blancos genómicos.⁹

Una de las grandes ventajas de trabajar con tejidos fijados y embebidos en parafina es que son estables a temperatura ambiente por grandes periodos de tiempo, fáciles de transportar comparado con tejidos frescos, los cuales son generalmente procesados de inmediato a congelados. Asimismo, se puede almacenar este material para realizar estudios clínicos o moleculares retrospectivos. Estas características nos permitieron utilizar muestras almacenadas del banco de muestras del servicio de dermatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González de 1993 al 2005.

Sin embargo, cabe destacar que extraer material genético de bloques embebidos en parafina es un reto. Su éxito depende críticamente de factores como manejo de la muestra previo a la fijación, material y tiempo de fijación, temperatura de almacenaje y tinciones histológicas realizadas previamente.

PCR UTILIZADO

En las dos últimas décadas se han descrito un gran número de métodos de PCR para la detección del ADN de *T. pallidum* spp., *pallidum*. La reacción en cadena de la polimerasa múltiple (multiplex-PCR) que detecta al mismo tiempo *Haemophilus ducreyi*, *T. pallidum* y virus del herpes simple, y es el más comunmente utilizado (56.8%); seguido de la reacción en cadena de la polimerasa punto final (PCR) (21.6%); reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) (16.2%); reacción en cadena de la polimerasa anidada (nested PCR) (5.4%)^{10,11} y reacción en polimerasa por transcriptasa reversa (RT-PCR).⁴

Las ventajas que provee el PCR en tiempo real son que solamente con una cantidad de 5 µl de ADN (10-100 ng) es capaz de proveer resultados cuantitativos rápidos, puesto que la amplificación y detección se realizan en el mismo tubo cerrado siendo mínimo el riesgo de contaminación.^{12,13} La técnica es fácil de realizar en la mayoría de los laboratorios microbiológicos y es posible aislar menos de 5 organismos por muestra, en comparación con el PCR punto final donde el límite inferior de organismos detectables son de 10 a 50. El tiempo necesario para el análisis es de 30 minutos por muestra, en comparación con 2 a 4 horas de la PCR punto final.⁴

Gayet-Ageron, *et.al*, en un metaanálisis compararon estos dos tipos de PCR encontrando que la exactitud de ambos métodos moleculares era similar, sin embargo la cantidad de estudios con qPCR era menor a la de PCR punto final.¹⁰

BLANCO GENÓMICO

Se han utilizado diferentes marcadores genéticos (Tpf-1, 16S rRNA, tpp47, *bmp*, *tmpA* y *tmpB*) para la identificación de *T. pallidum* spp., *pallidum* a través de PCR ya que es un factor crucial en la sensibilidad de detección.¹⁰ La selección de

iniciadores basados en estas secuencias requiere que se realicen pruebas complementarias en un gran repertorio de organismos para verificar su especificidad. El gen aislado con mayor frecuencia es el de 47-kDa (78.4%)¹⁰ el cual necesita hibridación para confirmar su especificidad. Al contrario de todos estos genes, el gen de la polimerasa del ADN I (*pol A*), enzima importante en la replicación y reparación, posee una secuencia genómica bien descrita y conservada en *Treponema pallidum* spp., *pallidum*, entre los microorganismos con características únicas en regiones ricas en cisteína.⁴

En este sentido nuestro trabajo permitió realizar dos ensayos de PCR, uno en punto final y otro en tiempo real mediante una sonda de hibridación TaqMan®, utilizando el mismo marcador genético, el gen *polA*.

Al utilizar PCR punto final en las 17 muestras positivas por inmunohistoquímica se obtuvo un 35.29% (6 muestras de 17) de falsos negativos. Cuando se realizó la amplificación de la región *polA* mediante la secuencia TaqMan® en un equipo Light Cycler 480II (Roche) el 100% de las muestras resultaron positivas. El límite mínimo de detección en 100 ng de DNA fueron 2 espiroquetas, lo cual concuerda con el límite teórico de detección del gen *polA* con PCR en tiempo real de 200 organismos por ml o 2 organismos por PCR.⁴

Al momento de identificar el número de copias de genoma de treponema en cada una de las muestras clínicas se observó que las muestras con mayor rendimiento en el PCR en punto final (859, 636, 230, 686 y 71-12, Tabla 3) mostraron el mayor número de copias. Lo que confirma que estas muestras contenían en su ADN total una concentración alta de treponemas.

Asimismo los resultados muestran que las técnicas moleculares elegidas fueron capaces de discriminar el ADN de las muestras que pertenecía a *Treponema pallidum* spp., *pallidum* del ADN de la microbiota del hospedero, lo cual ilustra la importancia del qPCR en lesiones sifilíticas de pacientes con VIH que pueden tener sobreinfección por otros microorganismos.³

Por otro lado, cabe destacar la variedad de presentaciones clínicas observadas en este estudio del “gran imitador”, el secundarismo sifilítico, que a pesar de en algunos casos, contar con pruebas serológicas como VDRL, positivas, la impresión diagnóstica clínica y la

descripción histológica eran inciertas, siendo necesario una prueba confirmatoria, como la inmunohistoquímica para poder realizar el diagnóstico final.

CONCLUSIONES

Partiendo de que resulta técnicamente desafiante la extracción de ADN de muestras clínicas embebidas en bloques de parafina, como es el caso de los 17 especímenes recopilados en un periodo de 22 años en nuestro estudio, se optó por detectar a través de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real a través de una sonda tipo TaqMan® el gen *polA*. Se seleccionó el gen *polA* por ser el blanco genómico con mayor especificidad, asimismo se prefirió la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real por ser un método con bajo riesgo de contaminación capaz de detectar un mínimo de dos espiroquetas por muestra.

En el 100% de las muestras se obtuvo un resultado positivo. Detectándose, como lo reporta la literatura, un mínimo de dos Treponemas en 100 ng de ADN. Al modificar la variable de la reacción en cadena de polimerasa a su versión en punto final, se obtuvo que 11 muestras (64.70%) presentaban infección por *T. pallidum* spp., *pallidum*, sin embargo no pudo identificarse el material genético de la espiroqueta en las 6 muestras restantes (35.29%).

BIBLIOGRAFÍA

1. Scythes JB, Jones CM. Syphilis in the AIDS era: diagnostic dilemma and therapeutic challenge. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2013;60:93-116.
2. Ratnam S. The laboratory diagnosis of syphilis. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2005;16:45-51.
3. Leslie DE, Azzato F, Karapanagiotidis T, Leydon J, Fyfe J. Development of a real-time PCR assay to detect *Treponema pallidum* in clinical specimens and assessment of the assay's performance by comparison with serological testing. *J Clin Microbiol* 2007;45:93-6.
4. Liu H, Rodes B, Chen CY, Steiner B. New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene. *J Clin Microbiol* 2001;39:1941-6.
5. Heymans R, van der Helm JJ, de Vries HJ, Fennema HS, Coutinho RA, Bruisten SM. Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. *J Clin Microbiol* 2010;48:497-502.
6. Wu L, Patten N, Yamashiro CT, Chui B. Extraction and amplification of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002;10:269-74.
7. Buffet M, Grange PA, Gerhardt P, et al. Diagnosing *Treponema pallidum* in secondary syphilis by PCR and immunohistochemistry. *J Invest Dermatol* 2007;127:2345-50.
8. Gayet-Ageron A, Ninet B, Toutous-Trellu L, et al. Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse biological samples. *Sex Transm Infect* 2009;85:264-9.
9. Tsang RS, Morshed M, Chernesky MA, Jayaraman GC, Kadkhoda K. Canadian Public Health Laboratory Network laboratory guidelines for the use of direct tests to detect syphilis in Canada. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2015;26 Suppl A:13A-7A.
10. Gayet-Ageron A, Combescure C, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger TV. Comparison of Diagnostic Accuracy of PCR Targeting the 47-Kilodalton Protein Membrane Gene of *Treponema pallidum* and PCR Targeting the DNA Polymerase I Gene: Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Microbiol* 2015;53:3522-9.
11. Behrhof W, Springer E, Brauninger W, Kirkpatrick CJ, Weber A. PCR testing for *Treponema pallidum* in paraffin-embedded skin biopsy specimens: test design and impact on the diagnosis of syphilis. *J Clin Pathol* 2008;61:390-5.
12. Gayet-Ageron A, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger TV, Combescure C. Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis: a systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect* 2013;89:251-6.
13. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:165-256.