

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Tiago da Silva Ferreira

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Treponema pallidum*

DOURADOS/MS

2020

TIAGO DA SILVA FERREIRA

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Treponema pallidum*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal da Grande Dourados para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Simone Simionatto.

Co-orientador: Júlio Henrique Ferreira de Sá Queiroz

Área de Concentração: Genética Molecular e de Microrganismos

DOURADOS/MS

2020

Tiago da Silva Ferreira

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Treponema pallidum*

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela Banca Examinadora como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, da Universidade Federal da Grande Dourados.

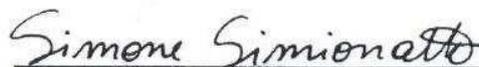
Orientador: Simone Simionatto

Co-orientador: Júlio Henrique Ferreira de Sá Queiroz

Área de Concentração: Genética Molecular e de Microrganismos

Aprovado em: 09/11/2020

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Simone Simionatto
Presidente



Marcelo do Santos Barbosa

Membro



Prof.^a Dr.^a Luana Rossato
Membro

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F382i Ferreira, Tiago DaSilva

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Treponema pallidum* [recurso eletrônico] / Tiago Da Silva Ferreira. -- 2020.

Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Simone Simionatto.

Coorientador: Júlio Henrique Ferreira de Sá Queiroz.

TCC (Graduação em Ciências Biológicas)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2020.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Sífilis. 2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). 3. Tipagem molecular. I. Simionatto, Simone. II. Queiroz, Júlio Henrique Ferreira De Sá. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

Dedico a Deus e minha família, pelo apoio
incondicional durante essa fase.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar concluindo mais uma etapa com sucesso em minha vida.

A minha mãe Maria Aparecida por me conceber a vida, meu pai Ranulfo e meu irmão Lucas pelo amor, carinho, apoio, incentivo e por acreditar em mim, sempre me ajudando frente às dificuldades.

À professora Simone Simionatto pela oportunidade de trabalhar com a biologia molecular além do inestimável auxílio durante a pesquisa. Obrigado por compreender minhas dificuldades e me incentivar a superá-las durante esta jornada, sou muito grato a senhora por tudo.

Ao meu amigo e co-orientador Júlio Queiroz pela orientação, sugestão e correções de texto. Especialmente pela sua imensa paciência e incentivo durante toda a pesquisa e sua contribuição na elaboração deste trabalho. Muito obrigado!!

A todos os professores do Curso de Ciências Biológica que dedicam a preparação de novos profissionais da área.

Aos meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade incondicional e pelo apoio demonstrado ao longo de todo o período de tempo em que me dediquei a esse trabalho, especialmente aos meus amigos: Mateus Mendes Merey, Felipe Garcia de Oliveira, Sarah Grazia Mendes, Juliana de Matos Justorriz e Michele Marques Ferreira.

Aos queridos amigos que tive o prazer de conhecer no laboratório; Gleyce Hellen de Almeida de Souza, Macia Soares Mattos Vaz, Marcelo do Santos Barbosa, Paulo César Pereira dos Santos, Bruna Oliveira da Silva, Julia Pimentel Arantes, Anna Carolina Miltos Valiente. Obrigado por todos os momentos de alegria que me proporcionaram nesses três anos de laboratório.

A todos os colaboradores do FCBA pelo inestimável auxílio durante a graduação.

Ao CNPq, Fundect e CAPES pelo apoio financeiro na execução do estudo e a Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) pela concessão de bolsa.

A todos aqueles que encontrei em meu caminho durante esse período, e que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui, os meus mais sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
2.1 Histórico	15
2.2 Agente etiológico da sífilis	15
2.3 Sífilis	16
2.4 Epidemiologia da Sífilis	18
2.5 Diagnóstico e tratamento	18
2.6 Diagnóstico molecular	20
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo Geral	22
3.2 Objetivos Específicos	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Coleta das amostras clínicas	23
4.2 Extração de DNA	23
4.3 Amplificação do DNA do gene <i>po1A</i>	23
4.4 Subtipagem molecular do <i>T. pallidum</i>	24
5. RESULTADOS	27
5.1 Diagnóstico e detecção molecular do <i>T. pallidum</i>	27
5.2 Subtipagem do <i>T. pallidum</i>	27
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÃO	33
7. REFERÊNCIAS	34

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IST - Infecção sexualmente transmissível

OMS - Organização Mundial de Saúde

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention* – Centro de controle e prevenção de doenças

TCLE - termo de consentimento livre e esclarecido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

PCR – *Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase

VDRL - *Venereal Disease Research Laborator*

RFLP - *Polimorfismo de fragmento de comprimento de restrição*

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

DFM - *Dark Field Microscopy*

DFA-TP - *Diret fluorescente-antibody testing for T. pallidum*

RPR - *Rapid Plasma Reagin*

TPHA - *T. pallidum hemagglutination*

FTA–Abs - *Fluorescent treponemal antibody absorption*

T PPA- *T. pallidum particle agglutination assay*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências do conjunto de *primers* que foram utilizados para a amplificação do gene *polA*.....24

Tabela 2. Sequências dos *primers* utilizados para a amplificação dos genes *tp0548*, *arp* e *EGJ*.....24

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed (Uniscience, USA) do produto de PCR do gene *polA* amplificado pela PCR. Coluna 1, Marcador de peso molecular DNA Ladder 50 pb (Ludwig, BRASIL); Coluna 2, Amostra controle negativo; Coluna 3 a 4, DNA extraído de lesão e amplificada na PCR; Coluna 5 a 7 DNA extraído de sangue sem amplificação.....27
- Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed (Uniscience, USA) do produto de PCR do gene *tp0548* amplificado pela PCR. Coluna 1, Marcador de peso molecular DNA Ladder 50 kb (Ludwig, BRASIL); Coluna 2, controle negativo; Coluna 3, amplificação do gene *tp0548*.....28
- Figura 3.** Alinhamento da sequência da região de 131 bp a 215 do gene *tp0548* com duas sequências do subtipo “g” depositas no banco de dados de nucleotídeos *GenBank* (PT-SIF0954 e UW074B) utilizando o programa de bioinformática *Codon Code Aligner* (Codon Corporation Code, USA).....28
- Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed (Uniscience, USA) do produto de PCR do gene *arp* amplificado pela PCR. Coluna M, Marcador de peso molecular DNA Ladder 1 kb (Ludwig, BRASIL); Coluna 1, controle negativo; Coluna 2, amplificação do gene *arp*.....29
- Figura 5.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed (Uniscience, USA) do produto de PCR do gene *EGJ* amplificado pela PCR. Coluna M, Marcador de peso molecular DNA Ladder 1 kb (Ludwig, BRASIL); Coluna 1, controle negativo; Coluna 2, amplificação do gene *EGJ*.....29

RESUMO

A sífilis é causada pelo *Treponema pallidum* subespécie *pallidum*, uma infecção sexualmente transmissível (IST) com amplo espectro de manifestação clínica, que varia de acordo com os estágios da infecção e o estado imunológico do hospedeiro. A sífilis apresenta fases sintomáticas distintas (primária, secundária e terciária) e períodos de latência (sífilis latente recente e tardia) podendo ocorrer lesões aguda e crônica até a forma disseminada com complicações neurológicas. O seu diagnóstico é baseado em sintomas clínicos associados aos testes sorológicos. A técnica da subtipagem molecular é uma ferramenta robusta para investigar a diversidade e epidemiologia do *T. pallidum*. Este estudo teve como objetivo caracterizar o *T. pallidum* isolado de um paciente com sífilis primária pelo método *Enhanced Centers for Disease Control and Prevention typing* (ECDCT), esse método consiste em: 1) Determinação do número de 60 pb que repete no gene *arp* 2) RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição) dos genes *tpr* de subfamília II (*tpr EGJ*); 3) Análise da região de 84 pb do gene *tp0548*. A sífilis primária foi diagnosticada pela combinação de sintomas clínicos (presença de uma lesão indolor), com o teste rápido de sífilis (ABON Biopharm, Hangzhou, China) e o teste *Venereal Disease Research Laboratory* (Abbott Murex, Dartford, UK). O DNA treponêmico foi identificado na lesão através da Reação em Cadeia da Polimerase utilizando como alvo o gene *polA*, mas não foi possível a identificação do DNA do *T. pallidum* na amostra de sangue total. A sequência do fragmento do gene *arp* apresentou 14 repetições, sendo relatado como mais prevalente no mundo. Na análise da região do gene *tp0548* apresentou similaridade ao subtipo g, que o qual é o mais prevalente em alguns países europeus. A cepa isolada apresentou o subtipo parcial 14 x/g. A técnica da PCR vem sendo utilizada como uma técnica sensível e específica para a identificação do DNA de *T. pallidum* em amostras clínicas. O método de subtipagem demonstra relevância biológica e clínica na investigação e discriminação de reinfecções assim como na identificação geográfica.

Palavras-chave: Sífilis, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tipagem molecular.

ABSTRACT

Syphilis is caused by *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*, a sexually transmitted infection (STI) with a broad spectrum of clinical manifestations, which varies according to the stages of infection and the host's immune status. Syphilis presents distinct symptomatic phases (primary, secondary and tertiary) and latency periods (recent and late latent syphilis), with acute and chronic lesions occurring to the disseminated form with neurological complications. Its diagnosis is based on clinical symptoms associated with serological tests. The molecular subtyping technique is a robust tool to investigate the diversity and epidemiology of *T. pallidum*. This study aimed to characterize *T. pallidum* isolated from a patient with primary syphilis using the *Enhanced Centers for Disease Control and Prevention typing* (ECDCT) method, this method consists of: 1) Determining the 60 bp number that repeats in the *arp 2* gene) RFLP (*Polymorphism in Length of Restriction Fragments*) of the subfamily II *tpr* genes (*tpr EGJ*); 3) Analysis of the 84 bp region of the *tp0548* gene. Primary syphilis was diagnosed by combining clinical symptoms (presence of a painless lesion), with the rapid syphilis test (ABON Biopharm, Hangzhou, China) and the *Venereal Disease Research Laboratory test* (Abbott Murex, Dartford, UK). Treponemic DNA was identified in the lesion through the Polymerase Chain Reaction using the *polA* gene as a target, but it was not possible to identify *T. pallidum* DNA in the whole blood sample. The sequence of the *arp* gene fragment showed 14 repetitions, being reported as the most prevalent in the world. In the analysis of the *tp0548* gene region, it was similar to subtype g, which is the most prevalent in some European countries. The isolated strain had a partial subtype 14 x / g. The PCR technique has been used as a sensitive and specific technique for the identification of *T. pallidum* DNA in clinical samples. The subtyping method demonstrates biological and clinical relevance in the investigation and discrimination of reinfections as well as in geographical identification.

1. INTRODUÇÃO

A sífilis é uma infecção sexualmente transmissível (IST), causada pela espiroqueta *Treponema pallidum* da subespécie *pallidum*, transmitida, principalmente, por via sexual. A infecção é caracterizada por apresentar períodos distintos (primário, secundário e terciário), com lesões agudas e crônicas, até disseminada, com complicações cardiovasculares e neurológicas (GOTTLIEB et al., 2014). A Organização Mundial de Saúde (OMS), estima que mais de um milhão de casos de ISTs ocorram mundialmente por dia. No Brasil, em 2018, cerca de 158.051 casos de sífilis adquirida e 62.599 casos de sífilis em gestantes foram relatadas (BRASIL, 2019).

O diagnóstico para sífilis é baseado em testes sorológicos (EDMONDSON; HU; NORRIS, 2018). Os testes são divididos em testes treponêmicos e não treponêmico. Os testes não treponêmicos, como o teste *Rapid Plasma Reagin* (RPR) e *Venerela Disease Research Laboratory* (VDRL) que detectam anticorpos contra cardiolipina que não são específicos contra o *T. pallidum* (ZHOU et al., 2019). Já os testes treponêmico incluem; teste de imunofluorescência indireta (FTA-Abs, *Fluorescent Treponemal Antibody-Absorption*) e o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) que detectam anticorpos IgM e IgG específicos contra os antígenos de *T. pallidum* (PARK et al., 2011) No entanto, os testes sorológicos apresentam baixa sensibilidade nos estágios iniciais e tardios da sífilis e a presença de resultados falso negativo em testes não treponêmicos limitam a sua utilização (ZHOU et al., 2019).

Novas estratégias diagnósticas têm sido adotadas, dentre as quais a amplificação de ácidos nucleicos através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O PCR tem demonstrado ser um método sensível na detecção do material genético do *T. pallidum* e na identificação de sífilis primária e em pacientes com sífilis congênita e neurosífilis (LARSEN; STEINER; RUDOLPH, 1995). A técnica de PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade, que permite a detecção de subtipos e avaliação de cepas com suscetibilidade à antibióticos. Dessa forma, o desenvolvimento de métodos moleculares altamente discriminatórios permitem a diferenciação das cepas de *T. pallidum* e fornecem informações que contribui para uma compreender a aquisição e transmissão da sífilis (HO; LUKEHART, 2011). A diferenciação genética das cepas de *T. pallidum* é muito importante, pois torna possível o conhecimento da diversidade epidemiológica e o monitoramento da prevalência e da distribuição geográfica das cepas ao longo do tempo e permite determinar as novas cepas introduzidas, especialmente, para o *T. pallidum*, um

patógeno de oneroso cultivo *in vitro* (PENG et al., 2011). A técnica da subtipagem molecular tem sido utilizado com sucesso na caracterização de novos isolados do *T. pallidum*, no entanto no Brasil há escassos relatos da utilização desta ferramenta que pode colaborar na investigação mais ampla e orientar na intervenção clínica à saúde pública.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICOS

2.1 Histórico

A sífilis é uma doença de evolução crônica descoberta no final do século XV. O termo Sífilis foi descrito pela primeira vez em 1530, por Hieronymus Fracastorius ao utilizar o nome de um pastor mítico chamado “*Syphilus*” em seu poema. Neste poema, a sífilis seria uma enfermidade como castigo do Deus Apolo ao pastor. (SINGH; ROMANOWSKI, 1999). A epidemia da sífilis é documentada em 1495 na Europa, pela disseminação da doença durante a queda de Nápoles contra as tropas do líder francês Charles VIII. Essa infecção ocorreu concomitantemente ao retorno de Colombo e seu homens ao novo mundo. Relatos informam que homens que compunham a expedição de Colombo sofriam de sintomas similar a esta doença (HARPER et al., 2008).

Microorganismos do gênero *Treponema* da ordem *Spirochaetales*, família *Spirochaetaceae* foram descobertos no dia 3 de março de 1905, por Fritz Schaudinn e Paul Erich Hoffman, zoologista e dermatologista. Posteriormente foram examinadas amostras da pápula existentes na vulva de uma mulher diagnosticada com sífilis secundária (KOHL; WINZER, 2005). Inicialmente foi denominado de *Cytorrhyses lues* e posteriormente no mesmo ano, Schaudinn propôs como *Spirochaeta pallida* num novo gênero com a denominação de *Treponema pallidum*. O bacteriologista August Paul Von Wassermann em 1906, desenvolveu a primeira sorologia a sífilis (Lues) (KOHL; WINZER, 2005). No entanto a penicilina foi introduzida no tratamento em 1943 por Mahoney Arnold, trazendo expectativas ao controle desta doença. (MAHONEY; ARNOLD; HARRIS, 1943). Diante ao cenário endêmico da sífilis, novas pesquisas foram conduzidas e sua incidência apresentou queda nos Estados Unidos e na Europa. (BROWN, 1970). Entretanto o comportamento sexual devido ao advento da pílula anticoncepcional e associação a infecção pelo HIV elevou consideravelmente novos casos de sífilis. (LYNN; LIGHTMAN, 2004).

2.2 Agente etiológico da sífilis

O agente etiológico causador da sífilis é o *Treponema pallidum* da subespécie *pallidum*, pertencente a ordem *Spirochaetales*, família *Spirochaetaceae*, do gênero *Treponema*. Dentre as espécies classificadas, quatro bactérias são patogênicas e seis não patogênicas. As espécies patogênicas são o *Treponema pallidum* da subespécie *pallidum*,

causador da sífilis, *T. pallidum* subespécie *carateum* que causa a pinta, *T. pallidum* subespécie *pertenue* (TPE) responsável pela framboesia e o *T. pallidum* subespécie *endemicum* agente etiológico da sífilis endêmica. (SINGH; ROMANOWSKI, 1999) (FANELLA et al., 2012). O *T. pallidum* da subespécie *pallidum*, não pode ser cultivado *in vitro*, é um patógeno exclusivo do ser humano, entretanto novos modelos experimentais de inoculação da bactéria são em macacos e testículos de coelho. (AVELLEIRA; BOTTINO, 2006).

T. pallidum é uma bactéria anaeróbia de formato helicoidal (10 a 20 voltas) com comprimento médio de 5 a 20 µm e 0.1 a 0.2 µm de espessura. Não apresenta membrana celular, entretanto é protegido por três camadas ricas em molécula de ácido N-acetilmuramico e N-acetil glucosamina (AVELLEIRA; BOTTINO, 2006). Na extremidade distal da bactéria apresenta filamentos axiais (endoflagelos) sob uma bainha externa. A rotação dos filamentos, impulsiona a bactéria ao um movimento sobre seu próprio eixo flagelar (CAUSER et al., 2014).

O genoma do *T. pallidum* subespécie *pallidum* (Nichols) foi sequenciado em 1998. O sequenciamento do genoma da cepa (Nichols) apresenta um cromossoma circular de 1.138.006 pares de base (bp). A ilimitada sensibilidade ao oxigênio e baixos componentes proteicos em sua membrana externa, reduz suas atividades metabólicas (FRASER et al., 1998).

Em outros estudos, o sequenciamento do genoma completo do *T. pallidum* são todas da América, incluindo a Nichols (US Navy, 1912)(FRASER et al., 1998b), Chicago (US Chicago, 1951)(GIACANI et al., 2010), México (US México, 1953) (PĚTROŠOVÁ et al., 2012), SS14 (US Atlanta, 1976)(MATEJKOVÁ et al., 2008), e a cepa DAL-1 afro-americana, 1991(ZOBANÍKOVÁ et al., 2012). O sequenciamento da cepa Amoy foi a primeira isolada de um paciente com sífilis primária na China em 2011, em que permite identificar variações com outras cepas de *T. pallidum* (TONG et al., 2017).

2.3 Sífilis

A sífilis é uma infecção transmitida predominantemente pelo contato sexual, além da transmissão sanguínea e por via transplacentária ao feto. As manifestações clínicas causadas pelo *T. pallidum* variam de acordo com os estágios de infecção e o estado imunológico do hospedeiro. O *T. pallidum* apresenta fases distintas (primária, secundária, terciária) e períodos de latência (sífilis latentes) (LAFOND; LUKEHART, 2006).

A lesão específica da sífilis primária, o cancro, é uma ulcera de cor rósea de bordas endurecidas, recoberto por material seroso, sem manifestações inflamatórias e indolor medido em torno de 0,3 a 3,0 cm (LAFOND; LUKEHART, 2006). No homem acomete na região do sulco balanoprepucial, meato uretral, prepúcio e raramente intra-uretral. Em mulheres ocorre frequentemente nos pequenos lábios, parede vaginal e colo uterino (BRASIL, 2010). As lesões extragenitais são na boca, região mamaria, dedos da mão e região anal. Pacientes que não recebem o tratamento adequado, espontaneamente o cancro regride e ocorre a evolução para sífilis secundária (GOH; THORNTON, 2007).

A sífilis é caracterizada por período de latência de seis a oito semanas, se não tratada corretamente a infecção evolui a fase secundária. O acometimento da doença, corresponde a distribuição do *T. pallidum* ao organismo, com aparecimento de lesões na região cutânea (MATTEI et al., 2012). A disseminação treponêmica, ocasiona sintomas variáveis, perda de peso, febre, dores de garganta, mialgia, glomerulonefrite e iridociclite (LEADER et al., 2007). O período de latência da infecção é cada vez mais duradouro após o primeiro e segundo ano, com o desaparecimento das manifestações clínicas, iniciando uma longa fase de latência (AVELLEIRA; BOTTINO, 2006).

A sífilis latente ou assintomática é caracterizada por cerca de 25% dos pacientes infectados apresentando recidivas manifestações secundárias até o final do primeiro ano pós-infecção. Entretanto a infecção com mais de um ano de duração, é denominada de sífilis latente tardia (LAFOND; LUKEHART, 2006) (GOH; THORNTON, 2007). As lesões da sífilis terciária podem ocorrer de 10 a 20 anos após a infecção inicial (CARLSON et al., 2011). E pode ocasionar as alterações cardiovasculares, tais como aneurisma da aorta e insuficiência valvular e no sistema neurológico como inflamação meningovascular (CARLSON et al., 2011) (SINGH; ROMANOWSKI, 1999).

A infecção treponêmica no sistema nervoso central pode ocasionar neurosífilis recente com sintomas que resultam em meningite aguda ou subaguda e vasculite inflamatória que pode causar acidente vascular cerebral (SINGH; ROMANOWSKI, 1999) (BRASIL, 2010). Entretanto após a introdução a penicilina ao tratamento os sintomas de neurosífilis desaparecem, no entanto aos portadores de HIV reaparecem anos depois. A infecção pelo *T. pallidum* em pacientes com HIV tendem a lesões mais profundas e mais de um cancro, com aumento do risco de neurosífilis e potencializar os sintomas (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2007).

2.4 Epidemiologia da Sífilis

A OMS estimou 376,4 milhões IST, sendo 6,3 milhões de infectados com o *T. pallidum*, com prevalência de 0,5% entre homens e mulheres. (BRASIL 2019). Em 2017 nos EUA, houve um aumento nos casos de infecção pelo *T. pallidum* com 9,6 caso por 100.000 habitantes, sendo 88% entre homens e 58% entre homens que realizam sexo com outros homens (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2018). No Canadá, foram notificados um aumento de 5,0 para 9,3 casos por 100.000 habitantes, no período de 2010 a 2015 (CHOUDHRI, Y. et al 2018). Na Austrália, dados da vigilância em todo o país indicaram um aumento de 6,9 casos por 100.000 habitantes em 2012, para 14,3 casos por 100.000 habitantes em 2016 (KIRBY INSTITUTE et al 2017).

No Brasil, o *T. pallidum* é uma das doenças mais frequente associada a úlceras genitais (GOMES NAVECA et al., 2013). No período de 2017 e 2018, houve um aumento na taxas de detecção de sífilis adquirida de 28,3%, de 59,4 casos para 75,8 casos por 100.000 habitantes. O aumento no número de casos chegou a 71,1% na região nordeste, de 27,4 para 46,9 casos por 100.000 habitantes, já na região centro-oeste a notificação foi de 50,3 para 79,9 casos por 100.000 habitantes. (BRASIL 2019)

O Brasil apresenta um aumento de notificação em maior parte dos estados. A maior taxa de detecção foi observada em Santa Catarina com 164,1 caso por 100.000 habitante, em seguida pelo estado de Mato Grosso do Sul com 163,0 casos por 100.000 habitantes. Dentre as capitais, Florianópolis apresenta taxa de detecção superior a taxa média nacional de 307,1 e Campo Grande com 282,4 casos por 100.000 habitantes. (BRASIL 2019). O aumento constante nos casos de sífilis, pode ser atribuído, pelo aumento da cobertura de testagem, com a ampliação do uso de testes rápidos e redução do uso de preservativo (BRASIL 2016).

2.5 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico laboratorial da sífilis é realizado de acordo com o estágio da infecção. Diversos testes podem ser empregados na detecção do treponema, e são divididos em exames diretos e indiretos (PIRES; MIRANDA, 1998). Métodos diretos como a detecção do *T. pallidum* em fluidos ou lesões iniciais nas fases primárias e secundárias, consistem em métodos diretos, como coloração por prata e Microscopia de Campo Escuro (*Dark Field Microscopy* – DFM) ou imunofluorescência direta

denominado de DFA-TP (*diret fluorescente-antibody testing for T.pallidum*) e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (CASTRO et al., 2010)(PARK et al., 2011).

Os testes não treponêmicos são métodos indiretos que detectam anticorpos inespecíficos para o *T. pallidum*. O *Venerela Disease Research Laboratory* (VDRL) que tem como princípio aglutinação indireta entre uma suspensão antigênica (cardiolipina, cristais de colesterol e lecitina) (CASTRO et al., 2010). A sensibilidade para a sífilis primária é de 70%, na fase secundária de 99% e de 70% a 80% na terciária. Os títulos podem se encontrar não reagentes durante o tratamento na sífilis primária, uma vez que o VDRL se torna reagente entre cinco e seis semanas após a infecção e até três semanas após o aparecimento do cancro. Entretanto o indivíduo recém-infectado pode ainda não ser reagente, configurado em um exame falso-negativo. Outros testes não treponêmicos como a Reagina Plasmática Rápida (*Rapid Plasma Reagin – RPR*) apresenta em fase primária 86% de sensibilidade, sendo maior do que o VDRL. A vantagem para a utilização de testes não treponêmico, é a facilidade e baixo custo, além para monitorar a resposta ao tratamento por método quantitativo. Sua desvantagem é a baixa especificidade, através de resultados falso-negativo devido o fenômeno de prozona, quando se testa a amostra sem diluir, ou mesmo em baixas diluições, apresenta resultados não reagentes. (HOOVER; RADOLF, 2011) (SMAJS; NORRIS; WEINSTOCK, 2012)(NYATSANZA; TIPPLE, 2016).

Testes sorológicos treponêmicos identificam anticorpos específicos (IgM e IgG) contra a bactéria treponêmica. O teste de (*T.pallidum hemagglutination – TPHA*), Teste de imunofluorescência Indireta para Determinação de Anticorpos contra *T.pallidum* (*Fluorescent treponemal antibody absorption – FTA–Abs*), Ensaio de Aglutinação em Partícula *T.pallidum* (*T.pallidum particle agglutination assay – TPPA*), são testes para detecção do *T.pallidum* durante a sífilis primária. O FTA-Abs é um teste treponêmicos de imunofluorescência. Amostra que contenha anticorpos anti-*T. pallidum*, ocorrerá ligação entre antígeno e o anticorpo, promovendo uma cor brilhante. O Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA*) promove a imunocaptura com proteínas recombinantes, capaz de detectar anticorpos em todas as fases da doença. Os testes treponemicos apresenta uma sensibilidade de 96 a 100% e uma especificidade de 98%. No entanto, sua execução é demorada e alto custo em que requer reagentes especializados e um microscópio. (CASTRO et al., 2010) (HOOVER; RADOLF, 2011) (SMAJS; NORRIS; WEINSTOCK, 2012)(PEELING et al., 2017).

A penicilina é a medicamento de primeira escolha no tratamento a sífilis, visto que o *T. pallidum* é sensível a esta droga, não havendo relatos de resistência (BRASIL 2005). Estudos sugere o tratamento com azitromicina, no entanto, já foi detectado cepas de *T. pallidum* resistentes ao medicamento. O acompanhamento ao tratamento da sífilis, recomenda-se por testes não treponêmico a cada 3 meses, durante um período de um ano, se houver reatividade em titulação decrescente, deve-se manter o acompanhamento a cada 6 meses até se estabilizar (WOODS et al., 2005).

2.6 Diagnóstico molecular

O sequenciamento do genoma do *T. pallidum* em 1998, forneceu novas estratégias de detecção do agente etiológico da sífilis e possibilidades do diagnóstico molecular. A identificação do DNA treponêmico através da PCR tem sido empregada através de diversos genes alvos, tais como o gene *polA* que codifica a DNA polimerase do tipo I, importante no reparo e replicação do DNA e o gene *tpp47* que codifica proteínas da membrana (MARFIN et al., 2001) (GRANGE et al., 2012) (WANG et al., 2018).

A PCR vêm sendo utilizada como um método preciso e específico para o diagnóstico da sífilis. A PCR baseia-se na detecção do material genético do patógeno a partir de amostras de sangue, soro, líquido cefalorraquidiano e líquido amniótico. Estudos confirmaram a detecção de DNA de *T. pallidum* no líquido cefalorraquidiano em pacientes com neurosífilis infectados pelo HIV (CASTRO et al., 2016).

Um estudo realizado por Scythes et al., 2013, utilizando a técnica da PCR identificou casos positivos de sífilis e que não haviam sido reagentes nos testes sorológicos, indicando que esta técnica é promissora para determinar a prevalência ou incidência da sífilis em uma população (SCYTHES; JONES, 2013). De acordo com Shields et al., 2012, a detecção do *T. pallidum* pela técnica da PCR é uma ferramenta robusta para o diagnóstico recente de sífilis primária, em especial quando uma resposta sorológica ainda precisa desenvolver (SHIELDS et al., 2012). Novas técnicas moleculares como a PCR em Tempo Real, possibilitam a realização de um diagnóstico rápido para a detecção do *T. pallidum* com alta sensibilidade (HEYMANS et al., 2010)

Nas últimas décadas vários estudos, tem mapeado a diversidade genômica de cepas de *T. pallidum* isoladas de amostras clínicas. Em 1998, Pillay e o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), publicou o primeiro método molecular para identificação dos subtipos moleculares do *T. pallidum*. O método do CDC foi amplamente

utilizado na caracterização molecular, sendo baseado em dois alvos moleculares. O primeiro alvo é a determinação dos números de repetição de 60pb do gene da proteína de repetição ácida (*arp*) e o segundo alvo baseado na análise do polimorfismo de comprimento (RFLP) (*Restriction fragmente length polymorphism*) dos genes *tpr* da subfamília II (*tpr EGJ*). Essa diversidade genética revelou 12 subtipos, dentre 63 amostras de DNA analisadas (PILLAY et al., 1998).

Através do método do CDC, Pillay et al., 2002 analisaram 161 amostras de sífilis primária e foram identificados 35 subtipos, (27,3% n=44/161) os quais pertencem ao subtipo 14d (PILLAY et al., 2002). Em um estudo foram caracterizadas 43 amostras e identificados 4 subtipos, (70% n=30/43) ao subtipo 14d, (7% n= 3/43) ao 14f, (5% n=2/43) ao subtipo 14e, e (2% n=1/43) identificado o subtipo 16a, e 16% apresentaram resultados imparcial (MARTIN et al., 2010).

Em busca de um método de tipagem molecular com maior poder discriminatório, (MARRA et al., 2010) examinaram três alvos genéticos, o genes *tprC* (*tp0117*) e *tprD* (*tp0131*) e a análise da região curta do gene *tp0548*. O uso desse último alvo em conjunto com os genes *arp* e ao gene *tprEGJ* já utilizados, melhorou significativamente a discriminação entre as cepas *T. pallidum*, e permitiu dividir 14 subtipos encontrados pelo método do Pillay et al., 1998 em 24 subtipos (MARRA et al., 2010). O método *Enhanced ECDC* aprimorado, permite a caracterização molecular e o monitoramento da prevalência e da distribuição geográfica das cepas ao longo do tempo e permite determinar quais novas cepas têm sido introduzidas em áreas específicas (SMAJS; NORRIS; WEINSTOCK, 2012) (MARRA et al., 2010) (CASTRO et al., 2009) (FLASAROVÁ et al., 2006).

O método do ECDCT é amplamente utilizado em todo o mundo. No entanto, novos métodos de tipagem foram continuamente aprimoradas para caracterização genética. Em um estudo recente, Grillová et al., 2018, aprimorou o sistema de tipagem, adicionando o gene *tp0705* aos genes *tp0136* e *tp0548* e o genes 23S rDNA. O novo sistema de tipagem molecular (MLST) revelou 23 perfis alélicos em 97 amostras analisadas, indicando ser uma ferramenta importante na caracterização e compreensão da epidemiologia da sífilis (GRILLOVÁ et al., 2018).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como o objetivo identificar o subtipo molecular do *Treponema pallidum* subespécie *pallidum* isolado na região de Dourados-MS.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar o DNA treponêmico nas amostras de sangue e lesão através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o gene alvo *polA*;
- Determinar o subtipo de *T. pallidum* utilizando os pelo método CDC *arp*, *EGJ* e *tp0548*;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das amostras clínicas

As amostras clínicas foram coletadas de um paciente com suspeita de sífilis primária atendida no Hospital Universitário de Dourados, Mato Grosso do Sul, em agosto de 2016. Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foram coletadas amostras de soro, sangue total e lesão. A amostra de soro foi submetida ao teste rápido de sífilis (ABON Biopharm, Hangzhou, China) e ao teste *Venereal Disease Research Laboratory* (Abbott Murex, Dartford, UK).

4.2 Extração de DNA

Para a identificação do DNA treponêmico foi realizada a extração do DNA das amostras clínicas coletadas (Swab da lesão e sangue total) pelo *Kit QIAamp DNA Blood Mini* (Qiagen, Germantown, Maryland, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, as extrações foram quantificadas (BioDrop, Cambridge, UK) e visualizados em gel de agarose TBE 0,5x a 1% corado com 100X GelRed (Uniscience, São Paulo, Brazil). Após a extração da amostra foram armazenadas a -20 °C para posteriores avaliações moleculares.

4.3 Amplificação do DNA do gene *polA*

O ensaio da PCR para a detecção do DNA de *T. pallidum* foi baseado na amplificação do gene *polA* utilizando primers descritos na Tabela 1. Os *primers-F2 primers -R2* foram desenhados utilizando o programa *primer3* para gene *polA*, de acordo com a sequência da cepa Seattle Nichols (número do GenBank CP010422.1) e os *primers F1* e *R1* (CASAL et al., 2011). O volume final de 25 µL, contendo 30 ng de DNA genômico, 1 x tampão de enzima (10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl, 0.5 µmol/µL de cada *primer*, 1 unidade de Taq DNA Polimerase (Sigma-Aldrich, USA) e 16 µL de água ultrapura (Sigma-Aldrich, USA). A reação foi submetida à amplificação em termociclador T-100 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), com as seguintes condições de ciclagem: 5 minutos a 94 °C para desnaturação do DNA, 1 minuto a 94 °C, 1 minuto de 60 °C para anelamento dos *primers*, 1 minuto a 72 °C para extensão, repetidos por 40 ciclos e a extensão final de 72 °C durante 5 minutos. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose TBE 0,5x a 1,5% corado com GelRed 100X (Uniscience,

São Paulo, Brazil). Após a confirmação da amplificação, os produtos da PCR foram purificados utilizando o Kit *GFX PCR DNA and gel band purification* (GE Healthcare, USA), seguindo as orientações e recomendações do fabricante. Os produtos amplificados purificados foram sequenciados pelo ABI 3730 XL DNA (Applied Biosystems, USA).

Tabela 1. Sequências do conjunto de primers utilizados para a amplificação do gene *po1A*.

<i>Primers</i>	Sequência de nucleotídeos	Tamanho do amplicon
<i>Forward F2</i>	5'-TGCGCACGAAGATAGTGTGT-3'	
<i>Reverse R1</i>	5'-AGCAGACGTTACATCGAGCGGA-3'	131 bp
<i>Forward F1</i>	5'-AGACGGCTGCACATCTTCTCCA-3'	
<i>Reverse R1</i>	5'-AGCAGACGTTACATCGAGCGGA-3'	209 bp
<i>Forward F2</i>	5'-TGCGCACGAAGATAGTGTGT-3'	
<i>Reverse R2</i>	5'-TGCTGTTCTGTGCACTCCTT-3'	691 bp

4.4 Subtipagem molecular do *T. pallidum*

A tipagem do *T. pallidum* foi realizada utilizando primers específicos conforme descrito na Tabela 2 (MARRA et al., 2010), (KATZ et al., 2010), (WU et al., 2012) para analisar a região do gene *tp0548*, o número repetição de 60 pb do gene *arp*, o perfil de polimorfismo pelo RFLP (*Restriction fragmente length polymorphism*) do gene *tpr* da subfamília II (*tpr EGJ*).

Tabela 2. Sequências de primers utilizados para a amplificação dos genes *tp0548*, *arp*, *EGJ*.

<i>Primers</i>	<i>Forward F2</i>	<i>Reverse R2</i>
<i>Tp0548</i>	5' GGTCCCTATGATATCGTGTTTCG-3'	5' GTCATGGATCTGCGAGTGG -3'
<i>Arp</i>	5'-ATCTTTGCCGTCCCGTGTGC-3'	5'-CCGAGTGGGATGGCTGCTTC-3'
<i>EGJ -1</i>	5' - ACTGGCTCTGCCACACTTGA-3'	5' - CTACCAGGAGAGGGTGACGC-3'
<i>EGJ - 2</i>	5'- CAGGTTTTGCCGTTAAGC-3'	5 -AATCAAGGGAGAATACCGTC-3'

A reação da PCR para o gene *tp0548* foi realizada para um volume final 50 µL, 1× tampão de enzima (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl [pH 8.4]), 200 mM de cada dNTP (Ludwig, Brasil), 1,5 mM de MgCl₂, 0,6 µM de, 2,5 unidades de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, USA) e água ultrapura (Sigma, USA) para completar o volume final da

reação. A reação foi submetida à amplificação em termociclador T100 (Bio-Rad, USA) com as seguintes condições de ciclagem: 3 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto e 15 segundos a 62 °C e 1 minuto a 72 °C, e 10 minutos a 72 °C. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose TBE 0,5x a 1,5% corado com 100X GelRed (Uniscience, USA). Para a visualização dos fragmentos, foi utilizado o fotodocumentador L-Pix Touch (Loccus, Brasil). Após a confirmação da amplificação, os produtos da PCR foram purificados utilizando o Kit *GFX PCR DNA and gel band purification* (GE Healthcare, USA), seguindo as orientações e recomendações do fabricante. Os produtos amplificados purificados foram sequenciados pelo ABI 3730 XL DNA (Applied Biosystems, USA).

A reação da PCR para o genes *arp* foi realizado em um volume final de 50 µL, 1x tampão de enzima (500 mM KCL, 200 mM Tris-HCL [pH 8.4]), 200 mM de cada dNTP (Ludwig, Brasil), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de, 1,25 unidades de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, USA) e água ultrapura (Sigma, USA) para completar o volume final da reação. A reação foi submetida à amplificação em termociclador T-100 (Bio-Rad, USA) com as seguintes condições de ciclagem de acordo com Korbie et al., 2008, sendo a 3 minutos por 95 °C, seguindo a primeira fase de 15 ciclos de 30 segundo a 95 °C, 45 segundos a 74 °C diminuindo 1°C a cada ciclo e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C. A segunda fase, consiste em 25 ciclos de 30 segundos a 95 °C e 45 segundos a 60 °C e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C. E a extensão final a 5 minutos a 72 °C.

Os produtos da *touchdown* PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose TBE 0,5x a 1,5% corado com 100X GelRed (Uniscience, USA). Para a visualização dos fragmentos, foi utilizado o fotodocumentador L-Pix Touch (Loccus, Brasil). Após a confirmação da amplificação, os produtos da *touchdown* PCR foram purificados utilizando o Kit *GFX PCR DNA and gel band purification* (GE Healthcare, USA), seguindo as orientações e recomendações do fabricante. Os produtos amplificados purificados foram sequenciados pelo ABI 3730 XL DNA (Applied Biosystems, USA).

O ensaio da Nested PCR para os genes *tprEGJ* foi realizado em um volume final de 50 µL, 1× tampão de enzima (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl [pH 8.4]), 200 mM de cada dNTP (Ludwig, Brasil), 1,5 mM de MgCl₂, 0,3 µM de cada *primer* (*EGJ forward 1* e *EGJ Reverse 1*), 2,5 unidades de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, USA) e água ultrapura (Sigma, USA) para completar o volume final da reação. A reação foi será submetida à amplificação em termociclador T100 (Bio-Rad, USA) com as seguintes condições de ciclagem: 5 minutos a 94 °C com 40 ciclos de 1 minuto de 94 °C, 1 minuto

a 60 °C, 2 minutos a 50 segundos, a extensão final por 10 minutos a 72 °C. Para segunda reação da *Nested* PCR, foram utilizados os *primer* (*EGJ forward 2* e *EGJ Reverse 2*), e 1 µL do produto da primeira reação da *Nested* PCR foi submetido a condições de reação e ciclagem idênticas as da primeira reação. Os produtos da segunda reação da *Nested* PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose TBE 0,5x a 1,5% corado com 100X GelRed (Uniscience, USA). Para a visualização dos fragmentos, foi utilizado o fotodocumentador L-Pix Touch (Loccus, Brasil). Após a confirmação da amplificação, os produtos da segunda reação da *nested* PCR foram purificados utilizando o Kit *GFX PCR DNA and gel band purification* (GE Healthcare, USA), seguindo as orientações e recomendações do fabricante. Os produtos amplificados purificados foram sequenciados pelo ABI 3730 XL DNA (Applied Biosystems, USA).

5. RESULTADOS

5.1 Diagnóstico e detecção molecular do *T. pallidum*

O teste rápido de sífilis apresentou resultado reagente e o teste quantitativo não treponêmico VDRL apresentou titulação de 1:128. A amostra de sangue total e lesão foram extraídas pelo kit comercial e submetidas a quantificação determinando uma concentração média $\cong 14,27\text{ng}/\mu\text{L}$. A identificação do DNA treponêmico na amostra de lesão foi pelo *primers* 131 pares de bases (pb), 209 pb e 691 pb, conforme demonstrado na figura 1. No entanto, não foi identificado amplificação de DNA treponêmico no sangue total para os três alvos analisados.

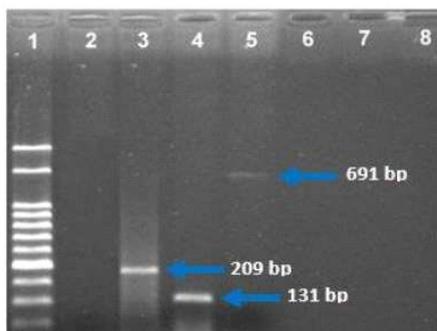


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed 100X (Uniscience, USA) do produto de PCR do gene *polA* amplificado pela PCR. Coluna 1, Marcador de peso molecular DNA *Ladder* 50 pb (Ludwig, BRASIL); Coluna 2, Amostra controle negativo; Coluna 3 a 4, DNA extraído de lesão e amplificada na PCR; Coluna 5 a 7 DNA extraído de sangue sem amplificação.

5.2 Subtipagem do *T. pallidum*

A amplificação do fragmento do gene *tp0548*, utilizando a sequência de *primer tp0548-F/ tp0548-R* confirmou a amplificação de um fragmento de 344 pb, relatado na figura 2. Os produtos amplificados do gene *tp0548* foram sequenciados pelo ABI 3730 XL DNA (Applied Biosystems, USA) e analisados pelo programa de bioinformática *Codon Code Aligner* (CodonCode Corporation, USA). A análise do gene *tp0548* apresentou uma similaridade com a sequência do subtipo g, conforme o alinhamento na figura 3.

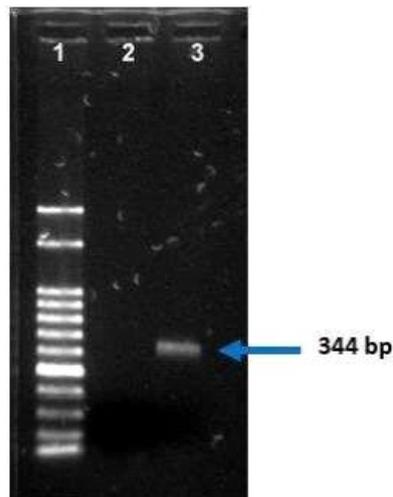


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed (Uniscience, USA) do produto de PCR do gene *tp0548* amplificado pela PCR. Coluna 1, Marcador de peso molecular DNA *Ladder* 50 kb (Ludwig, BRASIL); Coluna 2, controle negativo; Coluna 3, amplificação do gene *tp0548*.

PT_SIF0954 - Group G	CCACA	GCCGCTAGAGACTCCAGTGGTTGCAGCGATAATGGCAACCACCCCGCAAGGAACAGTTTCTCCAGTTCCTCATTCCATCTGGCGT
<< Brazil	CCACA	GCCGCTAGAGACTCCAGTGGTTGCAGCGATAATGGCAACCACCCCGCAAGGAACAGTTTCTCCAGTTCCTCATTCCATCTGGCGT
UW074B - Group G	CCACA	GCCGCTAGAGACTCCAGTGGTTGCAGCGATAATGGCAACCACCCCGCAAGGAACAGTTTCTCCAGTTCCTCATTCCATCTGGCGT

Figura 3. Alinhamento da sequência da região de 131 bp a 215 do gene *tp0548* com duas sequências do subtipo “g” depositas no banco de dados de nucleotídeos *GenBank* (PT-SIF0954 e UW074B) utilizando o programa de bioinformática *Codon Code Aligner* (Codon Corporation Code, USA).

O gene *arp* contém um número de repetição variável de 60 pb. A amplificação desta região foi realizada por meio da sequência de *primers* ARP-F, ARP-R, pela qual resultou na amplificação de um fragmento de 1.003 pb, conforme descrito na figura 4. Os produtos amplificados do gene *arp* foram sequenciados pelo ABI 3730 XL DNA (Applied Biosystems, USA) que correspondeu a 14 repetições.

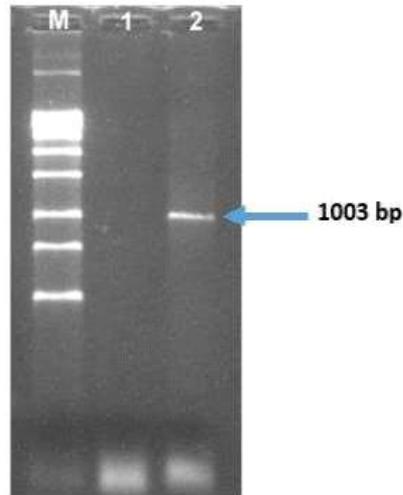


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed (Uniscience, USA) do produto de PCR do gene *arp* amplificado pela PCR. Coluna M, Marcador de peso molecular DNA Ladder 1 kb (Ludwig, BRASIL); Coluna 1, controle negativo; Coluna 2, amplificação do gene *arp*.

Na análise realizada nos genes *tpr* da subfamília II (*tprEGJ*), foi possível à amplificação, conforme demonstrado na figura 5. No entanto, apresentou algumas limitações para análise do sequenciamento, dificultando a caracterização do gene e a identificação do subtipo estudado, sendo necessários mais ajustes no protocolo para determinar o seu subtipo. De acordo com as sequências detectadas, identificamos o subtipo parcial 14 $\frac{1}{g}$ em lesão de sífilis primária.

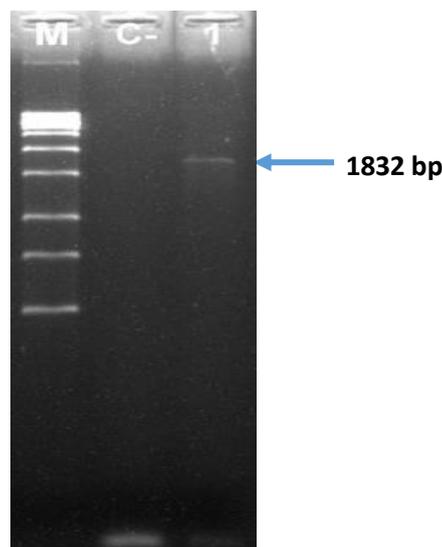


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed (Uniscience, USA) do produto de PCR do gene *EGJ* amplificado pela PCR. Coluna M, Marcador de peso molecular DNA Ladder 1 kb (Ludwig, BRASIL); Coluna 1, controle negativo; Coluna 2, amplificação do gene *EGJ*.

5. DISCUSSÃO

A técnica da PCR vem sendo utilizado amplamente na detecção do *T. pallidum* em amostras clínicas, especialmente no diagnóstico precoce da sífilis primária em secreções de cancro (ZHOU et al., 2019). Nesse estudo foi utilizado três conjuntos de *primers* para o gene treponêmico *polA*, o qual tem sido relatado como um excelente alvo para identificação molecular do *T. pallidum* nas amostras clínicas. Identificamos o DNA do *T. pallidum* na amostra de lesão de um paciente com sífilis primária, com as três combinações de *primers* avaliadas. No entanto, a PCR não foi capaz de detectar o DNA do *T. pallidum* nas amostras de sangue total desse paciente. Essas diferenças nas amostras podem ser explicadas porque na fase primária a quantidade de *T. pallidum* é maior nas lesões do que na corrente sanguínea do paciente infectado (PINTO et al., 2017).

Em outro estudo, a sensibilidade da técnica da PCR do gene *polA* foi avaliada em amostras de lesões de pacientes em diferentes fases da sífilis, o qual identificou um número maior de amostra positivas na sífilis primária (100% n= 9/9) do que na fase secundária (85,7% n=6/7). No entanto, nas amostras de sangue a sensibilidade foi superior na sífilis secundária (57,1% n=4/7) em comparação a fase primária (28,6% n=4/14) (CASTRO et al., 2009). Um estudo mais recente, identificou o *T. pallidum* através do gene *tp47* em amostras de lesão na fase primária com (89,1%, n =49/55) maior do que na fase secundária que foram (50,0% n =11/22). Por outro lado, a sensibilidade em amostras de sangue na fase secundária foi (38%, n = 26/ 69) maior do que na fase primária (13%, n = 8/61) (SHIELDS et al., 2012).

A tipagem molecular permite caracterizar surtos de sífilis, determinar a diversidade, o mapeamento epidemiológico e correlacionar associações com neurosífilis e a resistência aos antibióticos (FU et al., 2020). Esse método fornece informações dos subtipos genéticos e alterações que ocorrem ao longo do tempo entre as cepas de *T. pallidum*. O método do *Enhanced-CDC* é o sistema de tipagem molecular de *T. pallidum* amplamente utilizado, sendo baseado na variabilidade genética do gene *arp*, os genes *tpREGJ* (PILLAY et al., 1998) e gene *tp0548* (MARRA et al., 2010). Nesse estudo foi identificado o subtipo parcial 14_/g na amostra de lesão de um paciente com sífilis primária. O subtipo 14 d/g foi identificado desde 2004 em São Francisco, Seattle e Dublin, indicando uma conexão entre as cidades (MARRA et al., 2010). A identificação do subtipo com maior prevalência em Seattle no período de 2001 a 2004 foi o subtipo 14 d/f, ocorrendo uma mudança ao longo do tempo pelo subtipo 14 d/g (MARRA et al., 2010),

(GIACANI et al., 2018). No entanto, o subtipo 14 d/f foi predominantemente detectado em alguns países da América do Sul, como na Argentina (GALLO VAULET et al., 2017) e Peru (FLORES et al., 2016)

O subtipo 14d/g, apresentou uma alta prevalência nos países europeus (MARRA et al., 2010). Na Dinamarca há maior prevalência do subtipo 14d/g (54,3% n=107/197), seguido por 14d/f (17,8% n= 35/197) (SALADO-RASMUSSEN et al., 2016). Como também na França 14d/g (69% n= 49/71) e 14d/f (27% n=19/71) (GRANGE et al., 2013). Na Itália 40,8% (n=22/55) das amostras pertencia ao 14d/g (GIACANI et al., 2018). Em Paris, a distribuição temporal do subtipo 14 d/g no período de 2005 a 2012 representou de 0% em 2005 a 100% em 2012. Enquanto o subtipo 14d/f permaneceu com menor incidência desde 2005 com 100% até o desaparecimento em 2011 (GRANGE et al., 2013). No estudo realizado na Dinamarca, observou que pacientes portadores de HIV apresentavam maior predominância de reinfeção com sífilis em relação a pacientes não portadores. O subtipo mais prevalente identificado em relação a outros subtipos foi o 14d/g (17%), e pacientes homossexuais portadores de HIV foram 81% (SALADO-RASMUSSEN et al., 2013). A distribuição desse subtipo pode significar a ocorrência de uma rede transmissão acentuada de infecção, principalmente, entre homens que fazem sexo com homens (HSH) ou em casos clínicos de reinfeção (READ et al., 2016) (TIPPLE et al., 2011). Em um estudo não foi possível a identificação de um único subtipo causadoras da sífilis ocular, e sim pelo menos cinco subtipos (8d/g, 14d/g, 13_/g, 14_/g, __/c, __/f, __/g) (OLIVER et al., 2016). A identificação de pacientes comumente infectados com o subtipo 14 d/f apresentam potencial risco de serem diagnosticados com neurosífilis, por serem mais neuro invasivos e gerar respostas imunológicas do hospedeiro mais fraca do que outros subtipos (MARRA et al., 2010).

A detecção do gene *arp* equivalente a 14 repetições foi identificado em 52% dos subtipos de *T. pallidum* analisados (PILLAY et al., 1998). Em um estudo recente, 33% (n= 6/18) das amostras analisadas apresentavam 14 repetições (GOMES, 2016) (OLIVER et al., 2016) . Já para as análises realizadas para os genes *tpr* da subfamília II (*tprEGJ*), apresentou algumas limitações para análise do sequenciamento, dificultando a caracterização do gene e a identificação do subtipo.

O mapeamento da diversidade de cepas de *T. pallidum* em diferentes países, representa um avanço significativo na capacidade de identificar subtipos e compreender a epidemiologia molecular da sífilis. Em nosso estudo a identificação subtipo parcial 14_/g pelo método ECDCT, dentre a qual nos permite a determinação da diversidade

genética de cepas de *T. pallidum* e correlacionar a associação do subtipo encontrado em outros estudos no mundo. No entanto, um número maior de amostras precisa ser analisado.

6. CONCLUSÃO

A capacidade de identificação do *T. pallidum* em amostras de lesão, através da técnica de PCR mostrou ser uma técnica eficiente e com alta sensibilidade na detecção em amostras de sífilis primária. No entanto, em amostras de sangue total não foi possível à amplificação do gene treponêmico. A capacidade de caracterizar subtipos de cepas de *T. pallidum* pode ter implicações clínicas importantes, na qual o mapeamento da diversidade genética entre populações permite compreender as conexões entre diversos perfis genéticos e a sua capacidade epidemiológica. Os resultados obtidos neste estudo possibilitaram identificar o DNA treponêmico na lesão de sífilis primária, bem como genotipar este isolado. No entanto, se faz necessário avaliar um maior número de isolados para determinar a diversidade dos subtipos circulantes.

7. REFERÊNCIAS

- AVELLEIRA, J. C. R.; BOTTINO, G. Sífilis: diagnóstico, tratamento e controle. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n. 2, p. 111–126, mar. 2006.
- BROWN, W. J. Eradication of syphilis: the missing element. **Annals of Internal Medicine**, v. 72, n. 2, p. 278–280, fev. 1970.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico-Sífilis, 2019.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico-Sífilis, v. 47, n. 35, p. 29, 2016.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sífilis: Estratégias para Diagnóstico no Brasil. Brasília, 2010
- CARLSON, J. A. et al. The immunopathobiology of syphilis: the manifestations and course of syphilis are determined by the level of delayed-type hypersensitivity. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 33, n. 5, p. 433–460, jul. 2011.
- CASAL, C. A. D. et al. 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. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 44, n. 4, p. 451–456, ago. 2011.
- CASTRO, A. R. et al. Novel point-of-care test for simultaneous detection of nontreponemal and treponemal antibodies in patients with syphilis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 12, p. 4615–4619, dez. 2010.
- CASTRO, R. et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Lisbon, Portugal. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2510–2512, ago. 2009.
- CASTRO, R. et al. Detection of *Treponema pallidum* Sp. *Pallidum* DNA in Cerebrospinal Fluid (CSF) by Two PCR Techniques. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 30, n. 5, p. 628–632, set. 2016.
- CAUSER, L. M. et al. A laboratory-based evaluation of four rapid point-of-care tests for syphilis. **PloS One**, v. 9, n. 3, p. e91504, 2014.

Centers for Disease Control and Prevention (2018) Sexually Transmitted Disease Surveillance 2017. **Atlanta: Department of Health and Human Services.**

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Symptomatic early neurosyphilis among HIV-positive men who have sex with men--four cities, United States, January 2002-June 2004. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 56, n. 25, p. 625–628, 29 jun. 2007.

CHOUDHRI, Y. et al. Sexually transmitted infections: Infectious and congenital syphilis in Canada, 2010–2015. **Canada Communicable Disease Report**, v. 44, n. 2, p. 43, 2018.

EDMONDSON, D. G.; HU, B.; NORRIS, S. J. Long-Term In Vitro Culture of the Syphilis Spirochete *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. **mBio**, v. 9, n. 3, 26 2018.

FANELLA, S. et al. Local transmission of imported endemic syphilis, Canada, 2011. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 6, p. 1002–1004, jun. 2012.

FLASAROVÁ, M. et al. [Molecular detection and subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in clinical specimens]. **Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie: Casopis Spolecnosti Pro Epidemiologii a Mikrobiologii Ceske Lekarske Spolecnosti J.E. Purkyne**, v. 55, n. 3, p. 105–111, ago. 2006.

FLORES, J. A. et al. *Treponema pallidum pallidum* Genotypes and Macrolide Resistance Status in Syphilitic Lesions among Patients at 2 Sexually Transmitted Infection Clinics in Lima, Peru. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 43, n. 7, p. 465–466, 2016.

FRASER, C. M. et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. **Science (New York, N.Y.)**, v. 281, n. 5375, p. 375–388, 17 jul. 1998.

FU, B. et al. A comparison of genotyping tool in *Treponema pallidum*: Review and meta-analysis. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 78, p. 104049, 2020.

GALLO VAULET, L. et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* isolates from Buenos Aires, Argentina: Frequent Nichols-like isolates and low levels of macrolide resistance. **PloS One**, v. 12, n. 2, p. e0172905, 2017.

GIACANI, L. et al. Complete genome sequence and annotation of the *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* Chicago strain. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 10, p. 2645–2646, maio 2010.

GIACANI, L. 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**, v. 45, n. 4, p. 237–242, 2018.

GOH, B. T.; THORNTON, A. C. Antenatal screening for syphilis. **Sexually Transmitted Infections**, v. 83, n. 5, p. 345–346, ago. 2007.

GOMES, D. H. M. Dissertação apresentada ao Curso de Pós- Graduação Stricto Sensu em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre. p. 96, 2016.

GOTTLIEB, S. L. et al. Toward global prevention of sexually transmitted infections (STIs): the need for STI vaccines. **Vaccine**, v. 32, n. 14, p. 1527–1535, 20 mar. 2014.

GRANGE, P. A. et al. Evaluation of a PCR test for detection of *treponema pallidum* in swabs and blood. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 546–552, mar. 2012.

GRANGE, P. A. et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* in Paris, France. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 40, n. 8, p. 641–644, ago. 2013.

GRILLOVÁ, L. et al. Molecular characterization of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Switzerland and France with a new multilocus sequence typing scheme. **PloS One**, v. 13, n. 7, p. e0200773, 2018.

HARPER, K. N. et al. The sequence of the acidic repeat protein (arp) gene differentiates venereal from nonvenereal *Treponema pallidum* subspecies, and the gene has evolved under strong positive selection in the subspecies that causes syphilis. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 53, n. 3, p. 322–332, ago. 2008.

HEYMANS, R. et al. Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 497–502, fev. 2010.

HO, E. L.; LUKEHART, S. A. Syphilis: using modern approaches to understand an old disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 12, p. 4584–4592, dez. 2011.

HOOVER, K. W.; RADOLF, J. D. Serodiagnosis of syphilis in the recombinant era: reversal of fortune. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 9, p. 1295–1296, nov. 2011.

KATZ, K. A. et al. Molecular epidemiology of syphilis--San Francisco, 2004-2007. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 37, n. 10, p. 660–663, out. 2010.

KIRBY INSTITUTE. HIV, viral hepatitis and sexually transmissible infections in Australia: annual surveillance report 2017. 2017.

KOHL, P. K.; WINZER, I. [The 100 years since discovery of *Spirochaeta pallida*]. **Der Hautarzt; Zeitschrift Fur Dermatologie, Venerologie, Und Verwandte Gebiete**, v. 56, n. 2, p. 112–115, fev. 2005.

LAFOND, R. E.; LUKEHART, S. A. Biological basis for syphilis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 29–49, jan. 2006.

LARSEN, S. A.; STEINER, B. M.; RUDOLPH, A. H. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 1, p. 1–21, jan. 1995.

LEADER, B. T. et al. CD4+ lymphocytes and gamma interferon predominate in local immune responses in early experimental syphilis. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 6, p. 3021–3026, jun. 2007.

LYNN, W. A.; LIGHTMAN, S. Syphilis and HIV: a dangerous combination. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 4, n. 7, p. 456–466, jul. 2004.

MAHONEY, J. F.; ARNOLD, R. C.; HARRIS, A. Penicillin Treatment of Early Syphilis--A Preliminary Report. **American Journal of Public Health and the Nation's Health**, v. 33, n. 12, p. 1387–1391, dez. 1943.

MARFIN, A. A. et al. Amplification of the DNA polymerase I gene of *Treponema pallidum* from whole blood of persons with syphilis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 40, n. 4, p. 163–166, ago. 2001.

MARRA, C. M. et al. Enhanced molecular typing of *treponema pallidum*: geographical distribution of strain types and association with neurosyphilis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 9, p. 1380–1388, 1 nov. 2010.

MARTIN, I. E. et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* strains in western Canada: predominance of 14d subtypes. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 37, n. 9, p. 544–548, set. 2010.

- MATEJKOVÁ, P. et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* strain SS14 determined with oligonucleotide arrays. **BMC microbiology**, v. 8, p. 76, 15 maio 2008.
- MATTEI, P. L. et al. Syphilis: a reemerging infection. **American Family Physician**, v. 86, n. 5, p. 433–440, 1 set. 2012.
- NYATSANZA, F.; TIPPLE, C. Syphilis: presentations in general medicine. **Clinical medicine** (London, England), v. 16, n. 2, p. 184–8, 1 abr. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27037391>>. Acesso em: 20 out. 2017.
- OLIVER, S. et al. Molecular Typing of *Treponema pallidum* in Ocular Syphilis. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 43, n. 8, p. 524–527, 2016.
- PARK, Y. et al. Evaluation of a fully automated treponemal test and comparison with conventional VDRL and FTA-ABS tests. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 136, n. 5, p. 705–710, nov. 2011.
- PENG, R.-R. et al. Molecular typing of *Treponema pallidum*: a systematic review and meta-analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 11, p. e1273, nov. 2011.
- PĚTROŠOVÁ, H. et al. Whole genome sequence of *Treponema pallidum* ssp. *pallidum*, strain Mexico A, suggests recombination between yaws and syphilis strains. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 9, p. e1832, 2012.
- PILLAY, A. et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 25, n. 8, p. 408–414, set. 1998.
- PILLAY, A. et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* in South Africa: cross-sectional studies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 256–258, jan. 2002.
- PINTO, M. et al. A retrospective cross-sectional quantitative molecular approach in biological samples from patients with syphilis. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 296–302, mar. 2017.
- PIRES, I. C. P.; MIRANDA, A. E. B. Prevalência e fatores correlatos de infecção pelo hiv e sífilis em prostitutas atendidas em centro de referência DST/AIDS. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 20, n. 3, p. 151–154, abr. 1998.
- PEELING, R. W. et al. Primer: Syphilis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 2017.

- RADOLF, J. D. et al. *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete: making a living as a stealth pathogen. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 14, n. 12, p. 744–759, 2016.
- READ, P. et al. *Treponema pallidum* Strain Types and Association with Macrolide Resistance in Sydney, Australia: New TP0548 Gene Types Identified. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 2172–2174, ago. 2016.
- SALADO-RASMUSSEN, K. et al. Risk of HIV or second syphilis infection in Danish men with newly acquired syphilis in the period 2000-2010. **Sexually Transmitted Infections**, v. 89, n. 5, p. 372–376, ago. 2013.
- SALADO-RASMUSSEN, K. et al. Molecular Typing of *Treponema pallidum* in Denmark: A Nationwide Study of Syphilis. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 96, n. 2, p. 202–206, fev. 2016.
- SCYTHES, J. B.; JONES, C. M. Syphilis in the AIDS era: diagnostic dilemma and therapeutic challenge. **Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica**, v. 60, n. 2, p. 93–116, jun. 2013.
- SHIELDS, M. et al. A longitudinal evaluation of *Treponema pallidum* PCR testing in early syphilis. **BMC infectious diseases**, v. 12, p. 353, 17 dez. 2012.
- SINGH, A. E.; ROMANOWSKI, B. Syphilis: review with emphasis on clinical, epidemiologic, and some biologic features. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 2, p. 187–209, abr. 1999.
- SMAJS, D.; NORRIS, S. J.; WEINSTOCK, G. M. Genetic diversity in *Treponema pallidum*: implications for pathogenesis, evolution and molecular diagnostics of syphilis and yaws. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 191–202, mar. 2012.
- TIPPLE, C. et al. Getting the measure of syphilis: qPCR to better understand early infection. **Sexually Transmitted Infections**, v. 87, n. 6, p. 479–485, out. 2011.
- TONG, M.-L. et al. Whole genome sequence of the *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* strain Amoy: An Asian isolate highly similar to SS14. **PloS One**, v. 12, n. 8, p. e0182768, 2017.

WANG, C. et al. Sensitive detection of *Treponema pallidum* DNA from the whole blood of patients with syphilis by the nested PCR assay. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 1, p. 83, 9 maio 2018.

WU, H. et al. Evaluation of macrolide resistance and enhanced molecular typing of *Treponema pallidum* in patients with syphilis in Taiwan: a prospective multicenter study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 7, p. 2299–2304, jul. 2012.

WOODS, C. R. Syphilis in Children : Congenital and Acquired. 2005.

ZHOU, C. et al. PCR detection for syphilis diagnosis: Status and prospects. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 33, n. 5, p. e22890, jun. 2019.

ZOBANÍKOVÁ, M. et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum* strain DAL-1. **Standards in Genomic Sciences**, v. 7, n. 1, p. 12–21, 10 out. 2012.