



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona  
Facultat de Ciències

Departamento de Genética y de Microbiología  
Programa de Doctorado en Microbiología

# **Epidemiología molecular y caracterización de resistencias antibióticas de *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* en Barcelona**

**Tesis Doctoral**

Presentada por:

**Candela Fernández Naval**

Para optar al grado de Doctor

Trabajo realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital  
Universitario Vall d'Hebron bajo la dirección de:

Directora: **Dra. Judit Serra Pladevall**

Tutor: **Dr. Juan José González López**

**Curso 2020-2021**



**Judit Serra Pladevall**, facultativa especialista del Laboratorio Clínico del Hospital Universitario de Vic y Profesora asociada de la Universidad de Vic y **Juan José González López**, facultativo especialista del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Vall d'Hebron y Profesor asociado de la Universidad Autónoma de Barcelona

#### CERTIFICAN

Que el presente trabajo de investigación, titulado “Epidemiología molecular y caracterización de resistencias antibióticas de *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* en Barcelona” y presentado por **Candela Fernández Naval**, Graduada en Biotecnología y Máster en Biotecnología Molecular, ha sido realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Vall d'Hebron bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas por la normativa vigente para ser presentada y defendida como Tesis Doctoral por compendio de publicaciones ante el tribunal que corresponda.

Directora de Tesis Doctoral:

Tutor:

**Dra. Judit Serra Pladevall**

**Dr. Juan José González López**



*A mis padres y mi hermana*

*por todo.*



# AGRADECIMIENTOS

La elaboración de esta tesis no habría sido posible sin todas las buenas personas que me han acompañado y me han dado soporte durante este largo camino.

En primer lloc, voldria agrair a la Judit Serra per dirigir aquesta tesi plena d'imprevistos. Gràcies per la teva súper paciència, per escoltar-me i pels consells de directora (i de vegades de germana gran) que m'has anat donant des que ens vam conèixer.

A la Juliana per apostar per mi des del principi. Si no fos per aquell TFM "trambòlic" i per tu, no hagués arribat fins aquí. Gràcies per oferir-me la teva confiança fent el nostre petit equip i per donar-me un cop de mà en aquells moments que em venien grans.

A tot el personal de Microbiologia i de Drassanes: Al Tomàs, Juanjo, Mateu, Mainer i Martí per permetre'm formar part d'aquest projecte. Al grup de virus, Andrés, Laura, Cris i Maria, per acollir-me als esmorzars. A las chicas de serología, Rosa y Peque, por ayudarme y por vuestras señas diarias con una sonrisa a través del cristal. A la Pili y la Ana por las conversaciones que hacen mucho más divertidas las tardes. Mari, adoro tus "¡Cande!" tan alegres y nuestras charlas intentando arreglar el mundo. Gracias por tu serenidad y tu cariño. Gracias a Inma, Raquel, Encarna, Cris, Paco, Susanna, Jesús, Ari, Elena, resis... por acercarme vuestro hombro cuando lo he necesitado.

Aroa, mi alma gemela del "Valle". Companya de PCRs i *papers*, de "gim i de nyam", però sobretot amiga. La persona amb la que he compartit la major part del meu temps durant aquesta tesi: gràcies per aparèixer i fer-me costat al dia a dia i per aportar-me lucidesa en aquells dies negres de pandèmia. Sense tu, tot hagués estat molt més difícil.



Als meus amics de tota la vida, els “Trufa”, que entre sopars, viatges i les anècdotes que hi ha al darrera, han fet que tot aquest procés sigui molt més amè. Sou la meva segona família. Gràcies Gini, Andre, Laia, Martona, Mò, Uri, Andrea, Alba, Gonza, Maria, Ceci i Tomeu per ser tan especials i per seguir creixent amb mi després de tants anys!

Joan, gràcies per aquests sis anys acompanyant-nos la vida. Pels balls tontos, billars, pàdels, *tapeos*..., m’han aportat una especial serenor durant aquests últims temps. Però sobretot, gràcies per estimar-me com sóc i intentar entendre’m. Pels teus “la més guapa” i per fer tot el possible per treure’m un somriure. La vida és molt millor al teu costat.

Gracias a mi pequeña gran familia. Tieta Mertxe y tiet Pablo, Rafa, Maica y los “niños” y Rosario y Juan, por estar siempre. A mis abuelas, gracias por cuidarme y darme todo lo que habéis podido y más. Yaya Pilar, por tener siempre palabras bonitas para mí y por tu infinito cariño. Y gracias por todo a mi Yaya Josefa, que sé que me cuidas desde allí donde estés. Te echamos de menos.

Erea, la niña de mis ojos: no podría tener una hermana mejor. Por las confidencias entre lágrimas y risas, las tonterías y las *performances* improvisadas. Por devolverme ratitos de infancia y hacer que me sienta una cría cuando estamos juntas. Sé que estarás a mi lado pase lo que pase.

Finalmente, quiero agradecer a mis padres su amor incondicional. Gracias por creer en mis ilusiones y celebrar mis propias alegrías más que yo.

Papá, por nuestras eternas charlas filosóficas o simplemente divertidas, gracias por tus consejos prácticos y por escucharme cuando lo necesito.

Mamá, no sé qué haríamos sin ti. Gracias por ser mi mejor animadora, por recogerme en cada uno de mis tropiezos y por todo lo bueno que nos das. Sin duda, eres la mejor mami del mundo.





## ABREVIATURAS

---

|                   |   |
|-------------------|---|
| <b>A2058G</b>     | Transición de adenina por guanina en la posición 2058   |
| <b>A2059G</b>     | Transición de adenina por guanina en la posición 2059   |
| <b>ADN</b>        | Ácido desoxiribonucleico  |
| <b>ARN</b>        | Ácido ribonucleico  |
| <b>ARNr</b>       | ARN ribosomal   |
| <b>ARNr 16S</b>   | Subunidad 16 del ARN ribosomal  |
| <b>ARNr 23S</b>   | Subunidad 23 del ARN ribosomal  |
| <b>ARNt</b>       | ARN de transferencia  |
| <b><i>arp</i></b> | Gen que codifica para la proteína <i>acidic repeat protein</i>  |
| <b>ATP</b>        | Adenosina trifosfato  |
| <b>BamA</b>       | Proteína <i><math>\beta</math>-barrel assembly machinery A</i>  |
| <b>CEEISCAT</b>   | <i>Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les Infeccions de Transmissió Sexual i Sida de Catalunya</i> |
| <b>ECDCT</b>      | <i>Enhanced CDC typing</i>  |
| <b>FTA-abs</b>    | <i>Fluorescent Treponemal Antibody absorption test</i>  |
| <b>HSH</b>        | Hombres que tienen Sexo con Hombres   |
| <b>IM</b>         | Intramuscular   |
| <b>ITS</b>        | Infección de Transmisión Sexual   |
| <b>IV</b>         | Intravenosa   |
| <b>LCR</b>        | Líquido cefaloraquídeo  |
| <b>LPS</b>        | Lipopolisacáridos   |
| <b>M</b>          | Millones  |
| <b>MLST</b>       | <i>Multilocus Sequence Typing</i>   |
| <b>OMS</b>        | Organización Mundial de la Salud  |
| <b>PAMPs</b>      | Patrones moleculares asociados a patógenos  |
| <b>Pb</b>         | Pares de bases nitrogenadas   |

|                     |  |
|---------------------|--|
| <b>PCR</b>          | Reacción en cadena de la polimerasa                                  |
| <b><i>PoIA</i></b>  | Gen que codifica para la ADN polimerasa I                            |
| <b>RFLP</b>         | Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción               |
| <b>RPR</b>          | <i>Rapid Plasma Reagin</i>   |
| <b>SBMT</b>         | <i>Sequence Based Molecular Typing</i>                               |
| <b>SS14</b>         | <i>Street Strain 14</i>  |
| <b>ST</b>           | Secuenciotipo  |
| <b>TDI</b>          | Índice de diversidad de tipos  |
| <b>TEN</b>          | <i>Treponema pallidum</i> subespecie <i>endemicum</i>                |
| <b>TPA</b>          | <i>Treponema pallidum</i> subespecie <i>pallidum</i>                 |
| <b>TPA</b>          | <i>Treponema pallidum</i> subespecie <i>pallidum</i>                 |
| <b>TPE</b>          | <i>Treponema pallidum</i> subespecie <i>pertenue</i>                 |
| <b>TPHA</b>         | <i>Treponema Pallidum Hemagglutination Test</i>                      |
| <b><i>tpp47</i></b> | Gen que codifica para una proteína de membrana de 47 Kilodalton      |
| <b>TPPA</b>         | <i>Treponema pallidum Particle Agglutination Test</i>                |
| <b><i>tpr</i></b>   | Gen que codifica para las proteínas <i>Treponema pallidum repeat</i> |
| <b>UI</b>           | Unidades   |
| <b>VDRL</b>         | <i>Venereal Diseases Research Laboratory</i>                         |
| <b>VIH</b>          | Virus de la Inmunodeficiencia Humana                                 |

## LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

---

**Figura 1.** Estimación mundial de la tasa de incidencia de sífilis, 2016.

**Figura 2.** Casos notificados de sífilis en Europa, 2018.

**Figura 3.** Casos notificados de sífilis en España entre 1995 y 2019.

**Figura 4.** Casos de sífilis según la orientación sexual en Cataluña, 2019.

**Figura 5.** Evolución anual de la sífilis en Barcelona. Casos y tasas de incidencia, 2012-2016.

**Figura 6.** Estructura de *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*.

**Figura 7.** Filogenia de las subespecies de *Treponema pallidum*.

**Figura 8.** Proteínas de membrana de *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*.

**Figura 9.** Adherencia e invasión del endotelio por *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*.

**Figura 10.** Estadios de la sífilis.

**Figura 11.** Mecanismo de acción de los macrólidos y las tetraciclinas.

**Figura 12.** Porcentaje de *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* resistente a macrólidos (según la presencia de mutaciones en el gen ARNr 23S) en Europa.

**Tabla 1.** Guía para el tratamiento de la sífilis adquirida.

**Tabla 2.** Métodos para la tipificación de *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*.

**Tabla 3.** Mutaciones que confieren resistencia a las tetraciclinas en *Helicobacter pylori* y *Propionibacterium acnes*.



# ÍNDICE

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUMEN</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>2</b>  |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....   | <b>4</b>  |
| <b>1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA SÍFILIS</b> .....                                   | <b>5</b>  |
| <b>1.2 EPIDEMIOLOGÍA</b> .....   | <b>6</b>  |
| 1.2.1 Situación epidemiológica de la sífilis en Europa.....                              | 7         |
| 1.2.2 Situación epidemiológica de la sífilis en España .....                             | 8         |
| 1.2.3 Situación epidemiológica de la sífilis en Cataluña.....                            | 10        |
| <b>1.3 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA TRANSMISIÓN DE LA SÍFILIS</b> .....             | <b>12</b> |
| <b>1.4 CARACTERÍSTICAS DE <i>Treponema pallidum</i> subespecie <i>pallidum</i></b> ..... | <b>12</b> |
| 1.4.1 Taxonomía.....   | 12        |
| 1.4.2 Estructura y fisiología .....  | 13        |
| 1.4.3 Características genéticas .....  | 16        |
| 1.4.4 Características moleculares y factores de virulencia .....                         | 17        |
| 1.4.5 Metabolismo.....   | 18        |
| <b>1.5 PATOGENIA Y RESPUESTA INMUNITARIA</b> .....                                       | <b>19</b> |
| 1.5.1 Transmisión y diseminación .....   | 19        |
| 1.5.2 Respuesta inmunitaria e inflamación .....  | 21        |
| <b>1.6 MANIFESTACIONES CLÍNICAS</b> .....  | <b>22</b> |
| 1.6.1 Sífilis precoz .....   | 23        |
| 1.6.2 Sífilis latente .....  | 24        |
| 1.6.3 Sífilis terciaria .....  | 24        |
| 1.6.4 Sífilis congénita .....  | 25        |
| <b>1.7 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA SÍFILIS</b> .....                                | <b>26</b> |
| 1.7.1 Diagnóstico directo.....   | 26        |
| 1.7.2 Diagnóstico indirecto o serológico .....   | 28        |
| 1.7.3 Algoritmos de cribado .....  | 29        |



|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| <b>1.8</b>  | <b>TRATAMIENTO</b> .....  | <b>30</b> |
| <b>1.9</b>  | <b>EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE TPA</b> .....   | <b>32</b> |
| 1.9.1       | Caracterización molecular mediante los métodos de los CDC.....  | 34        |
| 1.9.2       | Caracterización molecular basada en análisis de secuencias de múltiples locus .....   | 35        |
| <b>1.10</b> | <b>RESISTENCIAS ANTIBIÓTICAS</b> .....  | <b>37</b> |
| 1.10.1      | Resistencia a los macrólidos.....   | 37        |
| 1.10.2      | Potencial desarrollo de resistencia a las tetraciclinas.....  | 38        |
| <b>2.</b>   | <b>JUSTIFICACIÓN</b> .....  | <b>41</b> |
| <b>3.</b>   | <b>OBJETIVOS</b> .....  | <b>43</b> |
| <b>4.</b>   | <b>RESULTADOS</b> .....   | <b>45</b> |
| 4.1.        | Primer trabajo: Nueva variante del gen <i>tp0548</i> de <i>Treponema pallidum</i> subespecie <i>pallidum</i> identificado en Barcelona, España.....   | 45        |
| 4.2.        | Segundo trabajo: Tipificación molecular de <i>Treponema pallidum</i> subespecie <i>pallidum</i> mediante el método <i>Enhanced CDC Typing</i> y estudio de resistencias a macrólidos y tetraciclinas en Barcelona. .... | 46        |
| 4.3.        | Tercer trabajo: Tipificación molecular de <i>Treponema pallidum</i> subespecie <i>pallidum</i> mediante el método <i>Multilocus Sequence Typing</i> en Barcelona.....   | 48        |
| <b>5.</b>   | <b>DISCUSIÓN</b> .....  | <b>51</b> |
| <b>6.</b>   | <b>CONCLUSIONES</b> .....   | <b>73</b> |
| <b>7.</b>   | <b>PRESPECTIVAS DE FUTURO</b> .....   | <b>76</b> |
| <b>8.</b>   | <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | <b>79</b> |





## RESUMEN

---

La sífilis ha causado graves problemas de salud pública a lo largo de su historia y, a pesar de disponer de la penicilina como tratamiento efectivo, esta enfermedad está reemergiendo desde las últimas dos décadas. Durante muchos años, el principal obstáculo en la investigación de *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* ha sido la dificultad de su cultivo *in vitro*. Gracias a los métodos de epidemiología molecular, se ha podido estudiar su diversidad genética, así como relacionar algunas variantes genéticas con determinadas manifestaciones clínicas o colectivos con conductas sexuales concretas.

Esta tesis contribuye a ampliar el conocimiento existente relativo a la epidemiología molecular y la resistencia antibiótica de *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* y proporciona, además, los primeros datos a nivel español. El estudio se realizó a partir de muestras de úlcera genital y sangre procedentes de 183 pacientes diagnosticados de sífilis precoz en Barcelona durante el 2015. La diversidad genética de este patógeno se estudió empleando los métodos de tipificación *Enhanced CDC Typing* y *Multilocus Sequence Typing*. También se determinó la presencia de mutaciones que confieren resistencia a macrólidos y de mutaciones que confieren, hipotéticamente, resistencia a tetraciclinas mediante la secuenciación de los genes 23S y 16S del ARN ribosomal.

Se identificaron diferentes variantes genéticas de *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* circulantes en Barcelona y las más prevalentes coincidieron con las descritas en otros estudios europeos. Los dos métodos de tipificación mostraron rendimientos similares, pero presentaron distintas ventajas y debilidades en cuanto a la robustez y objetividad de las técnicas, al poder discriminativo y a la disponibilidad de bases de datos públicas. Se identificó un alto porcentaje de resistencia a macrólidos, lo cual ratifica que estos antibióticos ya no son recomendables para el tratamiento alternativo de la sífilis. En cambio, la ausencia de mutaciones en el gen 16S del ARN ribosomal sugiere que no circulan cepas resistentes a las tetraciclinas.

## ABSTRACT

---

Syphilis has been considered an important public health concern from the past and it is currently in resurgence despite the availability of penicillin as an effective treatment. For many years, the unfeasibility of *in vitro* culturing of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* has been the main difficulty for investigating it. Since 1998, molecular epidemiology tools have led us to study the genetic diversity of this pathogen and to make associations between genetic variants and some clinical manifestations or collectives.

This study contributes to further enlarging existing knowledge about the molecular epidemiology and antibiotic resistance of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* and provides the first data from Spain. The analyses were performed in genital ulcer and blood specimens from 183 patients diagnosed with early syphilis in Barcelona during 2015. The genetic diversity was studied following the Enhanced CDC Typing and Multilocus Sequence Typing methods. The presence of mutations conferring resistance to macrolides and (hypothetically) to tetracyclines was determined by the sequence analysis of the 23S and 16S ribosomal RNA genes, respectively.

Several genetic variants of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* were identified, and the most prevalent ones agreed with that described by other European studies. The two typing methods had similar yields, but showed different advantages and weaknesses in terms of discriminatory power, robustness and objectiveness of the techniques, as well as of the availability of public databases. A high percentage of macrolide resistance was identified, supporting that these antibiotics are no longer recommendable for the alternative treatment of syphilis. Instead, the absence of mutations at the 16S ribosomal RNA gene suggests that tetracycline resistant strains are not currently circulating.





# 1

## INTRODUCCIÓN

---





# 1. INTRODUCCIÓN

---

La sífilis es una enfermedad multisistémica de evolución crónica causada por la bacteria *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* (TPA), que se transmite por vía sexual, contacto directo con piel y mucosas o verticalmente durante el embarazo o a través del canal del parto.

Durante muchos años, la sífilis ha sido comúnmente denominada como “la gran simuladora” o “el patógeno sigiloso” por presentar un curso clínico muy variable con periodos sintomáticos y asintomáticos [1]. La sífilis es la tercera infección de transmisión sexual (ITS) de etiología bacteriana más prevalente después de la clamidia y la gonorrea [2]. Como ocurre con la mayoría de ITS, determinados colectivos presentan un mayor riesgo de infectarse de sífilis como las personas jóvenes, hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres (HSH) y grupos vulnerables como personas inmigrantes, trabajadoras del sexo y usuarios de drogas [3].

Esta enfermedad ha provocado grandes epidemias a lo largo de la historia, causando graves estragos, especialmente antes de la incorporación de los antibióticos en la medicina. No obstante, y aunque la introducción de la penicilina disminuyó de forma considerable la incidencia de la sífilis, esta se encuentra en reemergencia desde las dos últimas décadas [3, 4].

## 1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA SÍFILIS

El origen cronológico y geográfico de la sífilis es controvertido y actualmente sigue siendo objeto de debate. Los primeros registros históricos describen una gran epidemia causada por una enfermedad venérea que se extendió rápidamente por Europa a finales del siglo XV [4]. Una de las teorías más aceptadas se conoce como “hipótesis colombina”, según la cual la sífilis fue importada de América por la tripulación de Cristóbal Colón en 1493, difundiéndose por el territorio español y posteriormente por Europa. La “hipótesis precolombina”, basada en estudios microscópicos de esqueletos con lesiones óseas, sostiene que la sífilis ya estaba establecida en Europa antes de la vuelta de Cristóbal Colón y que se podría haber confundido con otras enfermedades como la lepra. No obstante, esta hipótesis no ha podido ser corroborada y se cuestiona la validez de estos estudios [4–6]. Probablemente debido a su origen desconocido, la sífilis ha tenido un sinnúmero de denominaciones, como por ejemplo lúes venérea, avariosis, morbo gálico, mentulagra o pudendagra [4].

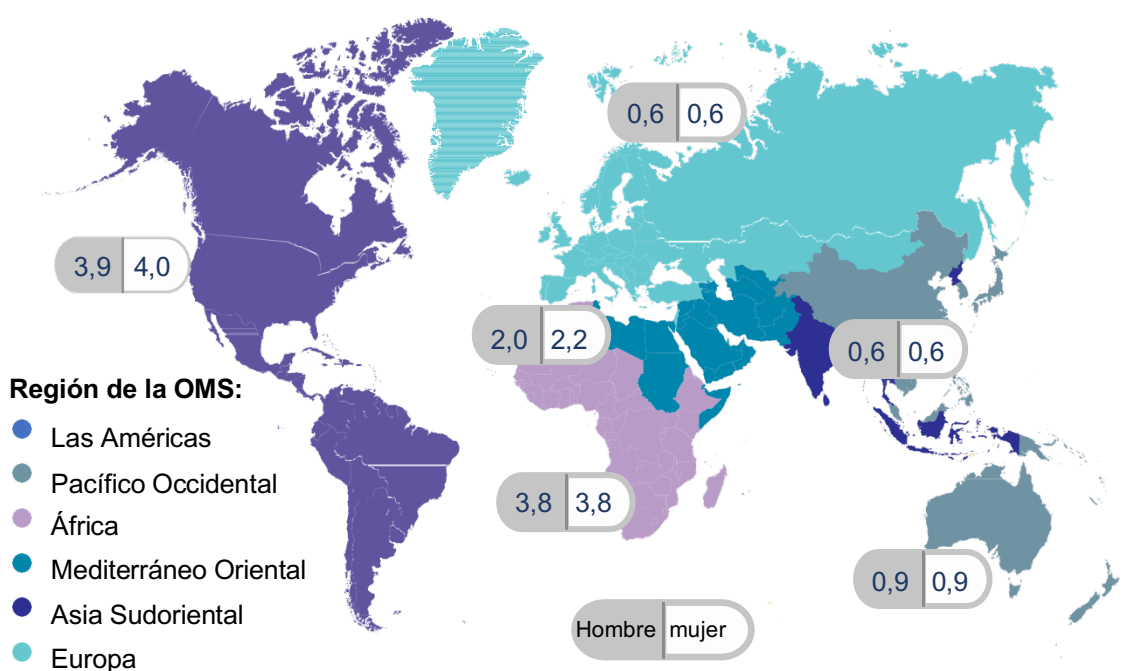
Girolamo Fracastoro, médico y poeta veronés, fue el primero en bautizar a la sífilis en su poema *Syphilis sive morbus gallicus* en 1530. Unos años más tarde, él mismo realizó una descripción detallada de los síntomas de la sífilis en su libro de enfermedades infecciosas *De contagione et contagiosis morbis* publicado en 1546 [4, 7]. No fue hasta 1905 que el zoólogo Fritz Shaudinn y el dermatólogo Erich Hoffman identificaron a *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* como el agente causal. Shaudinn y Hoffman visualizaron las espiroquetas en preparaciones sin colorante y, dado que no pudieron teñirlas con colorante de Giemsa, las denominaron como *Spirochaeta pallida* [8]. En 1906, el bacteriólogo August Paul von Wassermann y los dermatólogos y venereólogos Albert Neisser y Carl Bruck desarrollaron la primera técnica serológica para el diagnóstico de la sífilis [9].

Los primeros tratamientos que se usaron incluían el mercurio, el guayaco, los ioduros, los arsenicales (salvarsán y neosalvarsán) y el bismuto. Durante siglos, el mercurio fue el tratamiento más habitual y extendido a pesar de su dudosa eficacia y elevada toxicidad, conllevando efectos secundarios muy duros que podían incluso inducir la muerte. En 1943, John Mahoney, Richard Arnold y AD Harris introdujeron la penicilina como tratamiento para la sífilis, lo que supuso un antes y un después en la historia de esta enfermedad [4, 10].

La evolución natural de la sífilis y sus complicaciones se conocen, en cierto modo, por el experimento “Tuskegee”, llevado a cabo entre los años 1932 y 1972 en el estado de Alabama. Este estudio es conocido por sus implicaciones éticas, ya que los enfermos, sobre todo población negra infectada de sífilis, solo recibieron medicamentos placebo aún cuando la penicilina ya se había extendido como tratamiento eficaz. El experimento llegó a su fin tras filtrarse en la prensa estadounidense las violaciones éticas que se habían llevado a cabo durante los 40 años que duró el estudio [4].

### 1.2 EPIDEMIOLOGÍA

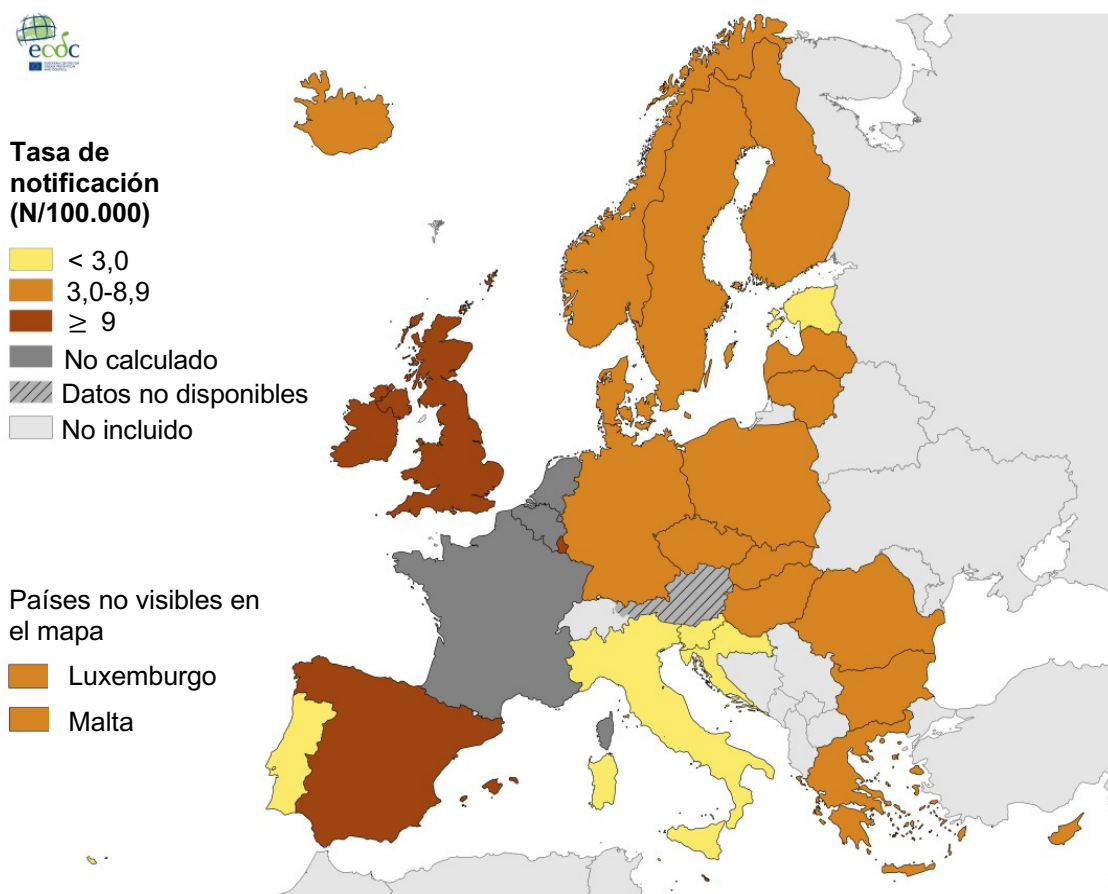
Según los datos más recientes de la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente 18 millones de personas de entre 15 y 49 años tenían sífilis en el año 2016, con una estimación de 6,3 millones de casos nuevos cada año [2]. La prevalencia e incidencia varía considerablemente según la región geográfica, siendo África y América los continentes en los que se estiman los valores de prevalencia e incidencia más elevados (**figura 1**) [11].



**Figura 1.** Estimación mundial de la tasa de incidencia de sífilis, 2016. Los datos se presentan por regiones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y según el sexo. Imagen adaptada de: Organización Mundial de la Salud, 2020 [11].

### 1.2.1 Situación epidemiológica de la sífilis en Europa

La incidencia de la sífilis en la Unión Europea ha sufrido un gran incremento desde el 2000, alcanzando en 2018 cifras globales de 33.927 casos confirmados declarados en 29 países, con una tasa de 7 casos por 100.000 habitantes. Los países con tasas más elevadas en 2018 fueron: Malta (17,9 por 100.000 habitantes), Luxemburgo (17,1 por 100.000), Reino Unido (12,6 por 100.000) y España (10,3 por 100.000) (**figura 2**).



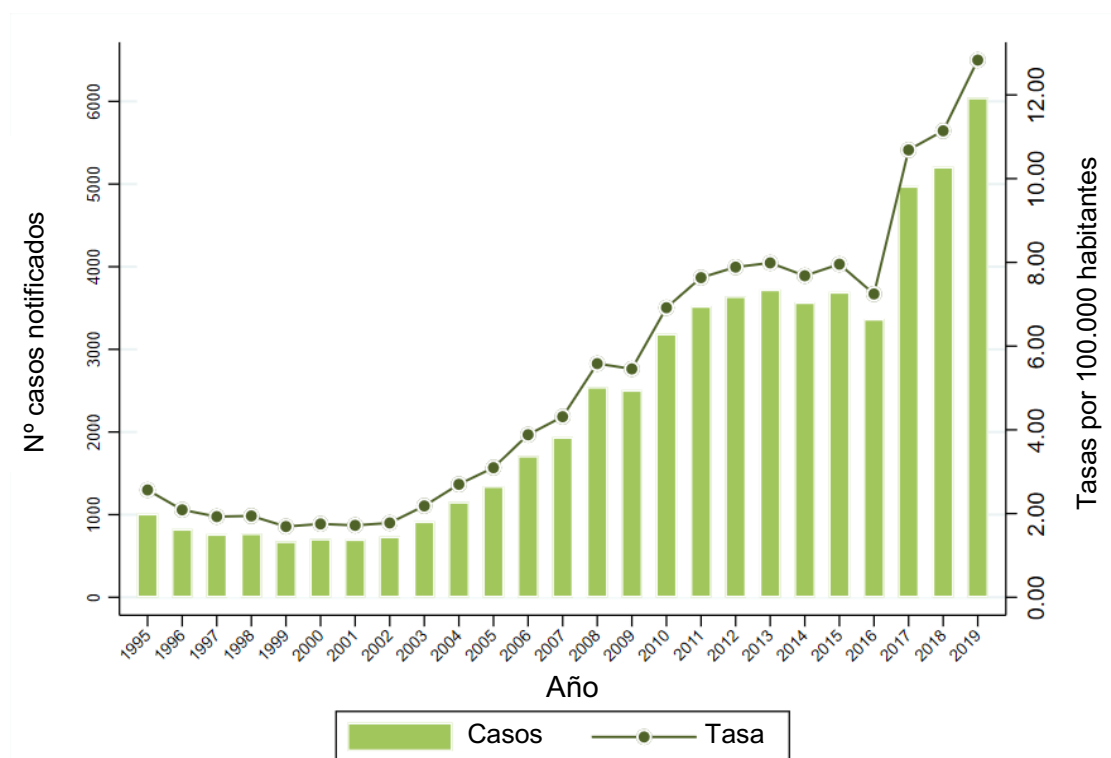
**Figura 2.** Casos notificados de sífilis en Europa, 2018. Imagen adaptada de: *European Center for Disease Prevention and Control*, 2020 [12].

La ratio entre hombres y mujeres fue de 8,5 frente a 1, alcanzando tasas de 12,1/100.000 habitantes en hombres (25.940 casos) y de 1,4/100.000 habitantes en mujeres (3.053 casos). Los grupos de edad de 25-34 años y los mayores de 45 años fueron los más afectados en 2018, representando el 60% de todos los casos [12].

### 1.2.2 Situación epidemiológica de la sífilis en España

En España la sífilis pasó a ser una enfermedad de declaración obligatoria en 1995, y actualmente en la mayoría de las comunidades autónomas es una enfermedad de declaración obligatoria individualizada. Durante la década de 2009-2019, los casos notificados en España aumentaron más del doble, partiendo de 2.506 (5,56 por 100.000

habitantes) hasta alcanzar los 5.822 casos (13,29 por 100.000 habitantes). Si bien de 2011 a 2016 se observó una estabilización de los casos, desde 2016 la tendencia es claramente ascendente (**figura 3**) [13]. Este incremento podría explicarse por un conjunto de factores, como el aumento de las prácticas sexuales de riesgo para la adquisición de ITS, así como el aumento en la sensibilidad tanto de los sistemas de vigilancia como de las técnicas de diagnóstico.

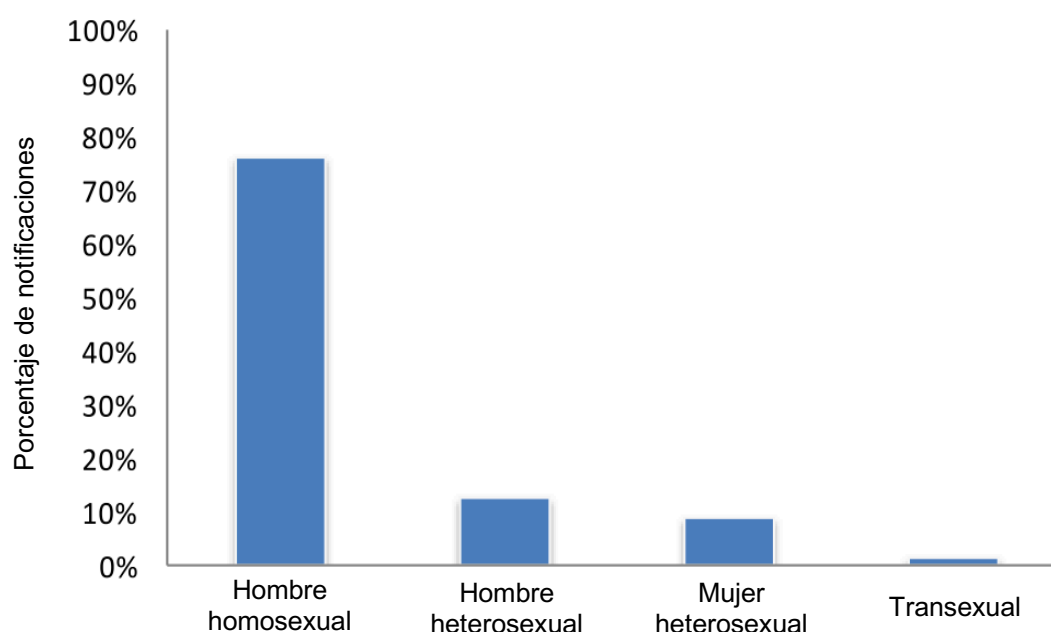


**Figura 3.** Casos notificados de sífilis en España entre 1995 y 2019. Fuente: Unidad de vigilancia de VIH, ITS y Hepatitis B y C, 2021 [13].

En 2019, el 60,1% de los casos de sífilis tenían entre 25 y 44 años y la mediana de edad era de 36 años. El 88,7% (4.853) fueron varones, siendo la proporción entre hombre y mujer de 7,4, con una tasa por 100.000 habitantes de 25,14 en hombres y 3,09 en mujeres [13].

### 1.2.3 Situación epidemiológica de la sífilis en Cataluña

En Cataluña se notificaron 2.454 casos de sífilis (32,21 casos por 100.000 habitantes) durante el 2019. Los grupos de edad más afectados fueron los de 30-39 años (29,9%) y de 20-29 años (24,9%), con una media de edad de 39 años. El 88% de los casos se registraron en hombres, alcanzando una tasa de 57,92 casos por 100.000 habitantes. La razón hombre:mujer se mantuvo en 7,4 desde el 2015. Desde el año 2000 se ha observado un resurgimiento importante de la sífilis entre HSH. En 2019, el 76,3% de los casos estaban registrados como HSH, el 12,7% como hombres heterosexuales, el 9,3% mujeres heterosexuales y el 1,7% transexuales (**figura 4**). Un 36,2% de los casos notificados presentaban coinfección con VIH, afectando sobre todo a HSH (49%) [14].

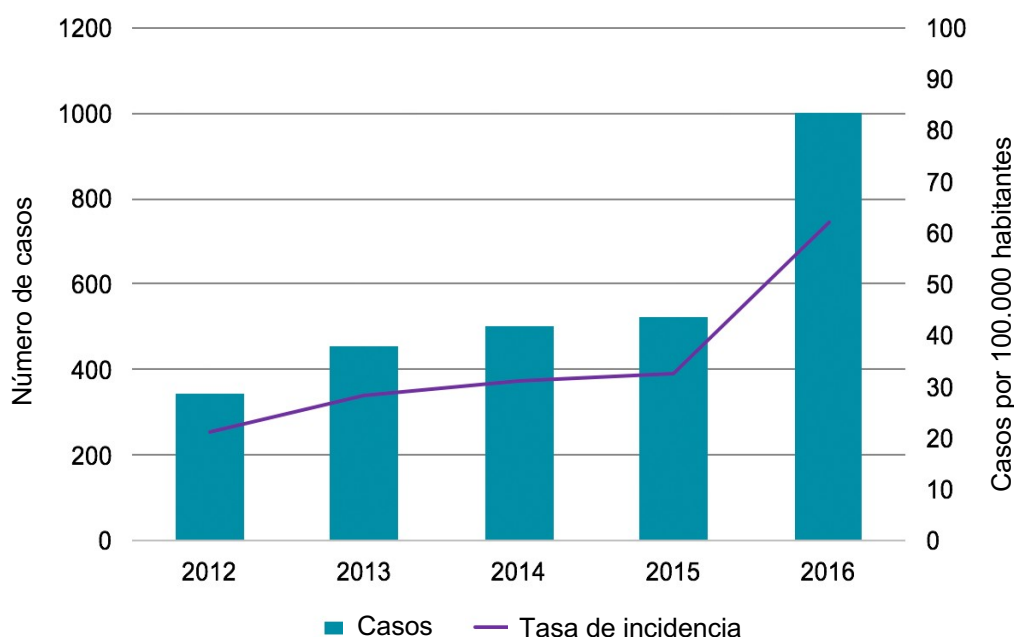


**Figura 4.** Casos de sífilis según la orientación sexual en Cataluña, 2019. Imagen adaptada de *Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les Infeccions de Transmissió Sexual i Sida de Catalunya (CEEISCAT)*, 2020 [14].

La Región Sanitaria de Barcelona presentó la mayor prevalencia y, concretamente, en el ámbito territorial de Barcelona ciudad se alcanzaron tasas de 85,4 casos por 100.000 habitantes [14].



Los datos más recientes de la Agencia de Salud Pública de Barcelona señalan un incremento importante de los casos notificados de sífilis entre los años 2015 y 2016 (figura 5), que se relaciona con el aumento de sensibilidad de los sistemas de notificación microbiológica [15].



**Figura 5.** Evolución anual de la sífilis en Barcelona. Casos y tasas de incidencia, 2012-2016. Imagen adaptada de: Agència de Salut Pública de Barcelona (ASPB), 2019 [15].

En consonancia con los datos anteriores, en Barcelona el 93,9% de los casos fueron detectados en hombres y el grupo de edad más afectado fue el de 30-39 años. El colectivo HSH fue, de nuevo, el más afectado con un 84,4% de los casos con la variable de orientación sexual informada [15].

## 1.3 FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA TRANSMISIÓN DE LA SÍFILIS

El incremento de los casos de sífilis en los últimos años se vincula a factores conductuales durante las relaciones sexuales, especialmente entre HSH [14–17]. Estos factores conductuales probablemente son debidos a una disminución de la percepción de riesgo en la adquisición de VIH debido a la eficacia del tratamiento antirretroviral de gran actividad. Las conductas de mayor riesgo para la adquisición y transmisión de la sífilis son las relaciones sexuales desprotegidas (sobre todo en el sexo anal), un mayor número de encuentros sexuales, contactos realizados en redes sociales y/o en lugares como clubs nocturnos o saunas, el consumo de drogas y *chemsex* (consumo de drogas con fines sexuales), el sexo en grupo y el uso de juguetes sexuales. Otros factores de riesgo son ser portador del virus VIH, tener antecedentes de otras ITS o haber padecido sífilis previamente [16, 17].

## 1.4 CARACTERÍSTICAS DE *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*

### 1.4.1 Taxonomía

*Treponema pallidum* subespecie *pallidum* es una espiroqueta perteneciente al género *Treponema* (filo Spirochaetae, clase Spirochaetes, orden Spirochaetales y familia Spirochaetaceae). Las espiroquetas son bacterias Gram negativas delgadas y pequeñas (de 0,1 a 0,4  $\mu\text{m}$  de diámetro y 5 a 20  $\mu\text{m}$  de largo), con espiras regulares y apretadas y extremos afilados [18].

Dentro del género *Treponema* existen especies cultivables *in vitro* (p. ej. *Treponema denticola* o *Treponema socranskii*, entre otras) que están asociadas con enfermedades periodontales. Entre las especies no cultivables, *Treponema pallidum* y *Treponema*

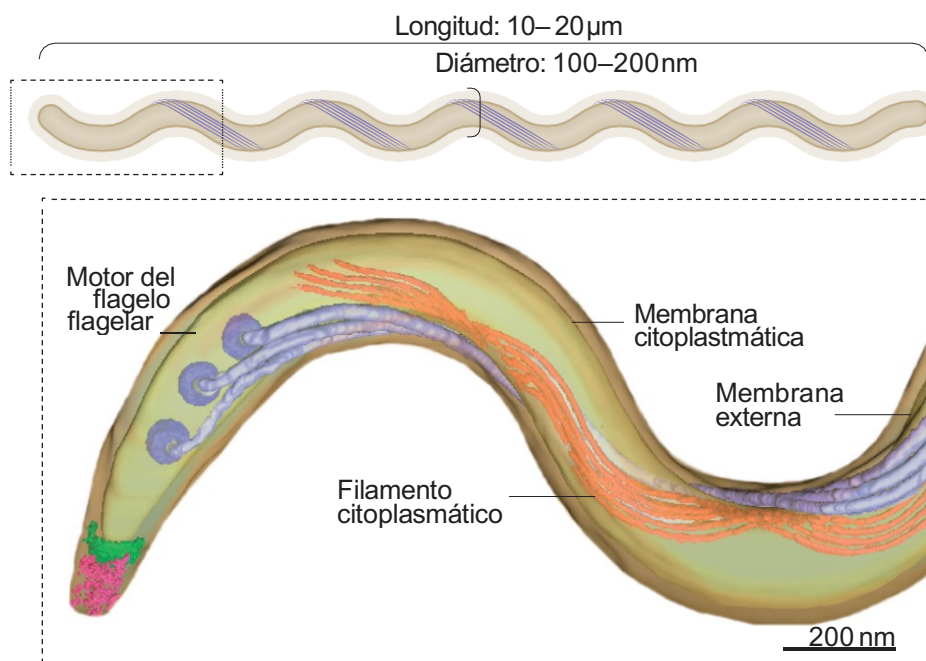
*carateum* son patógenas para el ser humano. La infección por *Treponema carateum* causa la enfermedad denominada pinta. *Treponema pallidum* se divide en tres subespecies: *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*, *Treponema pallidum* subespecie *pertenue* ([TPE], agente etiológico del pian o la frambesia) y *Treponema pallidum* subespecie *endemicum* ([TEN], agente etiológico del bejel) [19]. Si bien la sífilis es una enfermedad venérea y de distribución global, el pian, el bejel y la pinta son treponematosis endémicas de zonas tropicales y áridas alejadas de servicios sanitarios y se transmiten por contacto directo con las lesiones mucocutáneas [20–22].

Las diferentes especies y subespecies de *Treponema* causantes de infección son idénticas morfológica y antigénicamente y presentan entre ellas una similitud genética y proteica superior al 95%. No obstante, las distintas enfermedades se diagnostican según el contexto geográfico, la vía de transmisión, las manifestaciones clínicas, y/o mediante análisis moleculares [20, 21].

#### 1.4.2 Estructura y fisiología

La estructura de TPA consiste en un cilindro protoplasmático envuelto por una membrana citoplasmática. Una pared fina de peptidoglucano recubre la membrana citoplasmática proporcionándole estabilidad estructural y flexibilidad. Esta pared, a su vez, está rodeada por una membrana externa rica en fosfolípidos (**figura 6**) [23, 24].

Debido a la presencia de esta membrana externa, TPA es considerado Gram negativo; sin embargo, esta membrana carece de lipopolisacáridos (LPS) expuestos en la superficie y su composición fosfolipídica difiere de las típicas membranas externas de las bacterias Gram negativas [25–27]. TPA contiene lipoproteínas pero se encuentran, en su mayoría, debajo de la membrana externa, lo que le permite evitar el sistema inmune del organismo hospedador [28–31].



**Figura 6.** Estructura de *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*. Imagen adaptada de: Izard et al., 2009 y Peeling et al., 2017 [23, 42].

En el espacio periplásmico, entre el peptidoglucano y la membrana externa, encontramos los endoflagelos que proporcionan la motilidad celular. Los endoflagelos ejercen una fuerza contra el peptidoglucano elástico creando la morfología de onda plana característica de las espiroquetas, en que cada segmento está orientado a  $90^\circ$  del siguiente. Los endoflagelos se originan a partir de nanomotores situados en cada polo y se enrollan alrededor del cilindro sobre la pared de peptidoglucano, superponiéndose en la mitad de la célula [23, 24, 32]. La motilidad flagelar se produce gracias a un motor rotativo que es impulsado por un gradiente de protones en la membrana citoplasmática, aunque los mecanismos precisos todavía no se conocen con certeza [33].

TPA es un parásito obligado de los humanos ya que es muy frágil en ambientes extra-hospedadores por sus estrictas condiciones de reproducción y su simplicidad genética. Además, es extremadamente sensible a la desecación y a los cambios de temperatura, así como a los detergentes y desinfectantes, debido a la carencia de LPS en la

membrana externa. Las condiciones óptimas para el crecimiento de TPA se sitúan dentro de unos rangos muy estrechos tanto de pH (7,2 y 7,4), como de temperatura (30°C y 37°C) [34]. Se considera una bacteria microaerófila con un rango de oxígeno ambiental óptimo de 3-5%, lo que explica su preferencia por los tejidos, donde la concentración de oxígeno es inferior a la atmosférica [30, 34–37]. Su tolerancia al estrés oxidativo es limitada porque no contiene genes que codifiquen para las enzimas catalasa y superóxido dismutasa, encargadas de la depuración de radicales libres de oxígeno [25, 36]. Sin embargo, sí que expresa una superóxido reductasa que cataliza la reducción del superóxido a peróxido de hidrógeno, mecanismo por el cual parece protegerse relativamente de las especies reactivas de oxígeno [38–40].

TPA se divide por fisión binaria transversal y tiene un tiempo de generación especialmente lento, de entre 30 y 33 horas [34, 36, 41]. Durante más de un siglo, y a pesar de los exhaustivos intentos de diferentes investigadores, ha sido prácticamente imposible mantener la viabilidad de TPA mediante el cultivo *in vitro* [42]. No fue hasta el año 2018 que investigadores de la Universidad de Texas consiguieron mantener con éxito su crecimiento en cultivos con células epiteliales de conejo durante seis meses [35]. Recientemente, Edmondson y Norris [43] han conseguido mantener un cultivo viable durante tres años, hallazgo que, sin duda, marcará un cambio en la historia de la investigación de TPA. Aunque la inoculación de este patógeno se ha intentado en diferentes modelos animales [44–46], el conejo sigue siendo el organismo modelo para el cultivo *in vivo*, ya que es el único animal que desarrolla lesiones que se asemejan a los chancros de la infección en humanos de forma macroscópica e histopatológica [30, 47]. Así, el cultivo *in vivo* en testículos de conejos ha permitido aislar las cepas de TPA a partir de muestras clínicas y propagarlas en el laboratorio y, a pesar de que ciertos aspectos clínicos e inmunológicos no se reproducen con exactitud, ha sido fundamental para establecer los mecanismos patogénicos e inmunológicos que conocemos

actualmente [30, 42]. La principal limitación del estudio *in vivo* en conejos es que los procedimientos de propagación y aislamiento suelen ser laboriosos y costosos.

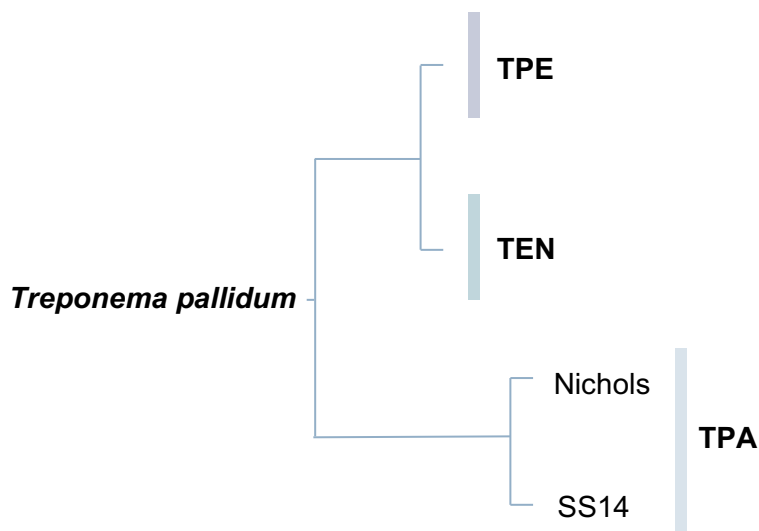
### 1.4.3 Características genéticas

El genoma de TPA fue secuenciado por primera vez en 1998 [25]. TPA es una bacteria genéticamente monomórfica y presenta un genoma de 1,14 megabases que está contenido en un único cromosoma circular. Por el momento, se considera que solamente un 55% de los 1041 marcos abiertos de lectura que se conocen tienen una función biológica [48–50]. No se han identificado elementos genéticos como plásmidos, transposones ni bacteriófagos, pero hay evidencias de la presencia de genes mosaicos como resultado de eventos de recombinación tras la transferencia horizontal de genes entre las subespecies TPA, TEN y TPE [51–54].

Las tres subespecies de *Treponema pallidum* presentan un alto grado de similitud genética (97-100%) y son consideradas subespecies clonales pero que forman clústeres diferentes. Se cree que las pequeñas diferencias genéticas son las que provocan que tengan un modo de transmisión y unos procesos patológicos distintos. Se han identificado islas genómicas e islas patogénicas en las tres subespecies, pero distintas en número y en tipo. Concretamente, algunos genes de las islas genómicas e islas patogénicas relacionados con la biosíntesis de lípidos y aminoácidos se han detectado solamente en TPA [30, 50].

Filogenéticamente, la especie *Treponema pallidum* presenta dos linajes principales, el que comprende las subespecies TPE y TEN y el que comprende la subespecie TPA. TPA es un linaje monofilético formado por dos clados, Street Strain 14 (SS14) y Nichols (**figura 7**). La cepa Nichols (que da nombre al clado Nichols) ha sido durante muchos años la cepa de referencia usada en investigación. En general, las cepas agrupadas en

este clado presentan una mayor diversidad genética en comparación con las cepas del clado SS14. En la actualidad también se usan de referencia las cepas SS14 ya que los aislados clínicos actuales pertenecen mayoritariamente a este clado [53].

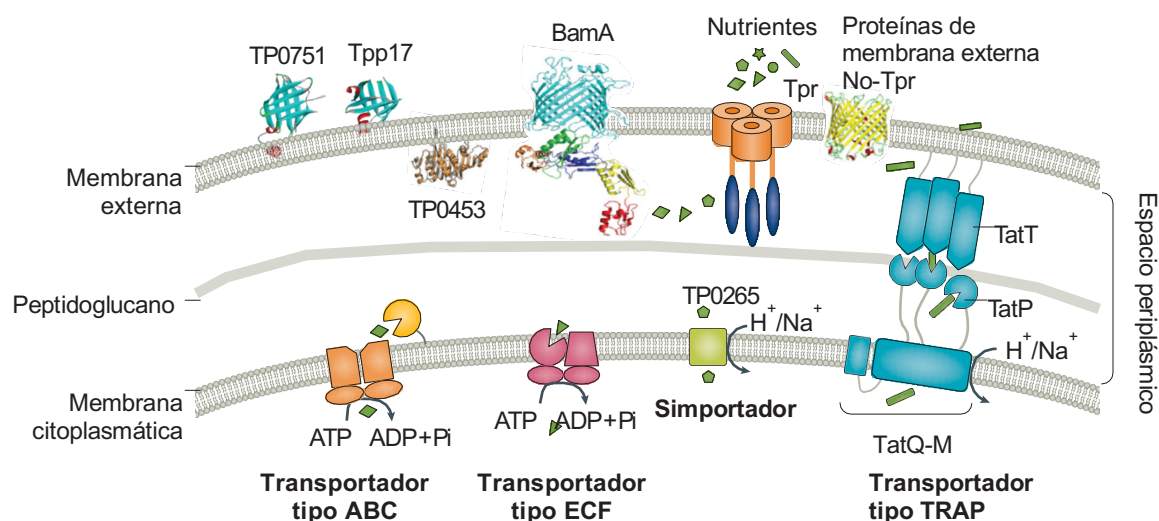


**Figura 7.** Filogenia de las subespecies de *Treponema pallidum*. TPE: *Treponema pallidum* subespecie *pertenue*; TEN: *Treponema pallidum* subespecie *endemicum*; TPA: *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*.

#### 1.4.4 Características moleculares y factores de virulencia

En la superficie de la membrana externa de TPA se encuentran algunas lipoproteínas que pueden estar implicadas en mecanismos de infectividad (**figura 8**). Por ejemplo, la proteína Tp0751, o palilisina, es una proteína de unión a laminina capaz de degradar la matriz extracelular. Por otro lado, la lipoproteína Tp0435 o Tpp17 parece tener función de citoadhesina y la Tp0453 (semiexpuesta a la superficie y unida a la parte interna de la membrana externa) se cree que funciona como transportadora de lípidos y glicolípidos. La proteína de membrana Tp0326, o  $\beta$ -barrel assembly machinery A, es un componente esencial de la maquinaria de ensamblaje de barril  $\beta$  que cataliza la inserción de proteínas en la membrana externa (biogénesis de la membrana externa). Además, las proteínas de la familia de genes *tpr* parecen tener función de porina, lo que

permite la entrada de nutrientes de la sangre y los fluidos del hospedador hacia el espacio periplásmico. En concreto, algunas proteínas de la familia Tpr (como la TprK o TP0897) se relacionan con mecanismos de evasión del sistema inmune. En la membrana citoplasmática se encuentran permeasas simportadoras y diferentes transportadores que conectan con el espacio periplásmico [30, 42, 55].



**Figura 8.** Proteínas de membrana de *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*. BamA: β-Barrel Assembly Machinery A; Tpr: *Treponema pallidum* repeat; ABC: ATP-binding cassette; ECF: Energy Coupling Factor; TRAP: Tripartite ATP-independent Periplasmic. Imagen adaptada de Peeling et al., 2017 [42].

### 1.4.5 Metabolismo

TPA carece de un número importante de genes que codifican proteínas con funciones metabólicas fundamentales para su supervivencia [25]. Esta limitada actividad metabólica podría explicar el crecimiento lento, así como la relación parasitaria que mantiene con su organismo hospedador, el humano, y la dificultad del cultivo *in vitro*. No se han encontrado genes que codifiquen para las enzimas involucradas en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos o de Krebs, en las vías de fosforilación oxidativa o de beta-



oxidación, ni para proteínas requeridas para la síntesis *de novo* de cofactores, nucleótidos y ácidos grasos [56].

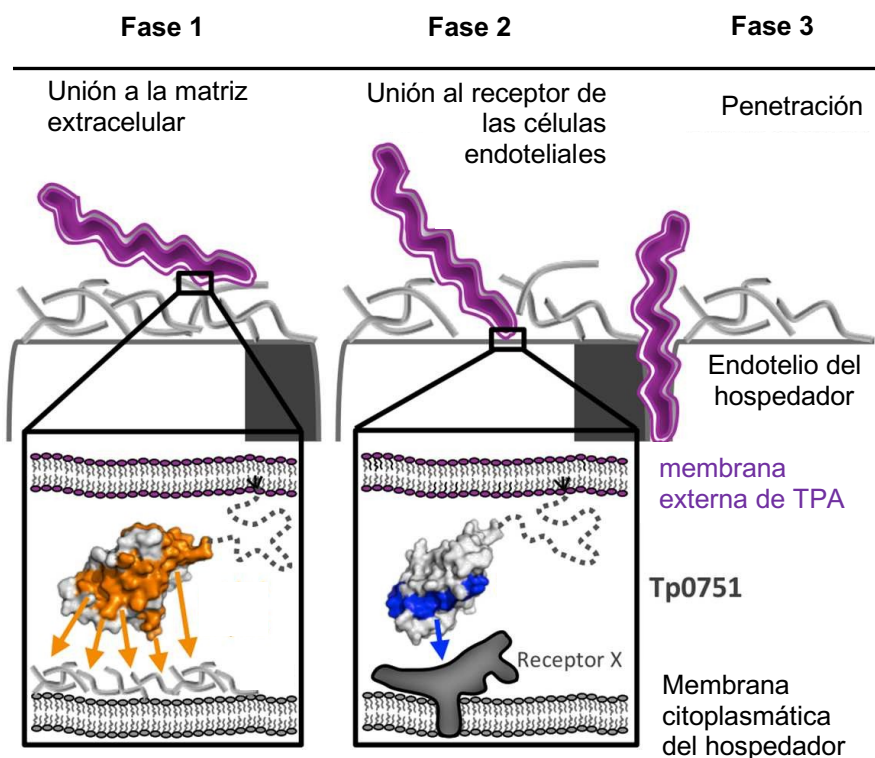
Para compensar la deficiente capacidad biosintética, TPA presenta un conjunto de porinas y proteínas transportadoras que facilitan la entrada de moléculas esenciales, propias del hospedador, hacia el espacio periplásmico y el citosol, como se ha mencionado en el apartado anterior (**figura 8**) [30]. Por ejemplo, contiene genes que codifican para el transportador tipo ABC de D-glucosa y todas las enzimas necesarias para realizar el catabolismo de la glucosa mediante la glucólisis [57]. Está demostrado que la privación de glucosa provoca la pérdida de motilidad en TPA, recuperándola tras su reposición. Por ello, se considera que la glucólisis es su principal fuente de energía [30, 35]. Aun así, la glucólisis genera tan solo 2 moléculas de ATP, y se cree que podría ser insuficiente para mantener su patogenicidad, ya que la motilidad flagelar (responsable de la alta capacidad invasiva), así como otras de sus funciones básicas, requieren altos niveles energéticos [33].

## 1.5 PATOGENIA Y RESPUESTA INMUNITARIA

### 1.5.1 Transmisión y diseminación

TPA se considera un patógeno altamente invasivo por su capacidad de infectar a una persona con tan solo 10 microorganismos y de penetrar y sobrevivir en una gran variedad de tejidos y órganos, a pesar de su labilidad en el medio ambiente [34, 36, 58]. Las mucosas genitales y orales, que presentan una baja queratinización, son las más susceptibles a la entrada de las espiroquetas, lo que explica que TPA sea un patógeno que se transmite principalmente durante el contacto sexual. Los mecanismos exactos mediante los cuales las espiroquetas invaden y se diseminan por todo el organismo todavía se desconocen. Diferentes estudios indican que TPA se adhiere a las células

epiteliales y a los componentes de la matriz extracelular mediante interacciones con moléculas de fibronectina y laminina. A continuación, penetra en los tejidos epiteliales gracias a la actividad de la palilisina (Tp0751) y el endoflagelo. Este proceso se denomina en inglés *stop and go* y coordina la adherencia y la motilidad [59–61]. Posteriormente, TPA se disemina a nivel sistémico por la sangre y los vasos linfáticos [36], proceso en el que la palilisina también parece tener un papel importante porque es específica para el receptor LamR de las células endoteliales (**figura 9**) [60, 62]. Una vez TPA se ha diseminado por la sangre puede penetrar de forma temprana la barrera hematoencefálica e invadir el sistema nervioso central. En caso de embarazo, puede penetrar la barrera placentaria e infectar el feto (sífilis congénita) [62].



**Figura 9.** Adherencia e invasión del endotelio por *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*. Imagen adaptada de Parker et al., 2016 [60].

### 1.5.2 Respuesta inmunitaria e inflamación

TPA, también denominado el patógeno sigiloso, es capaz de diseminarse y persistir a lo largo de los años, pese a la activación del sistema inmunitario del organismo hospedador [63]. Por un lado, la ausencia de LPS y la escasez de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) expuestos en la membrana externa limitan la antigenicidad de TPA [26, 27, 31]. De hecho, la mayoría de los PAMPs se encuentran en el espacio periplásmico, lo cual dificulta que puedan ser reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones de las células fagocíticas. Esto favorece que las espiroquetas no sean detectadas inicialmente por el sistema de inmunidad innata y se puedan multiplicar en el lugar de inoculación y diseminarse con relativa facilidad [34, 42, 64, 65]. Sin embargo, algunas lipoproteínas sí que son reconocidas por las células dendríticas y son las responsables de iniciar la respuesta inflamatoria. En primer lugar, las células dendríticas fagocitan los treponemas y migran hasta los ganglios linfáticos para presentar los antígenos treponémicos a los linfocitos B y los linfocitos T [65]. Por un lado, los linfocitos B generan anticuerpos opsonizadores que permiten un mejor reconocimiento por parte de los macrófagos. Durante la fagocitosis, se liberan lipopéptidos y PAMPs treponémicos en el interior de los macrófagos que son reconocidos por los receptores tipo Toll de la superficie de los fagosomas y, paralelamente, otros péptidos antigénicos liberados son también presentados a los linfocitos T. Los linfocitos T CD4+, CD8+ y las células *Natural Killer* secretan Interferon- $\gamma$  que refuerza la acción de los macrófagos y promueve una cascada de citoquinas como el factor de necrosis tumoral y la Interleucina-6 [66–70].

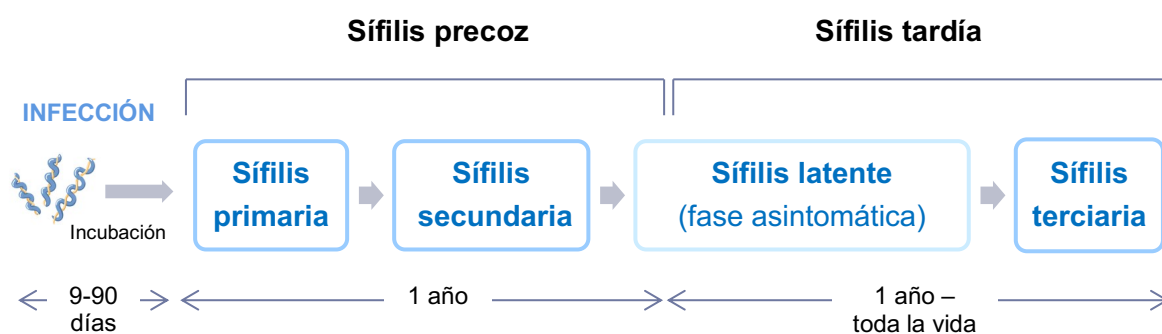
La mayor parte de los treponemas son eliminados por el sistema inmunitario en la lesión primaria (chancro), aunque algunos de ellos consiguen escapar y diseminarse para establecer una infección crónica con largos periodos de latencia [30, 36, 65]. Pese a que la escasez de antígenos expuestos en la superficie parece ser el principal

mecanismo de evasión inmunológica de TPA, la baja carga bacteriana durante la infección y la producción de variantes antigénicas (mediante fenómenos de recombinación intra-genómica en el gen *tprK* y variación de fase en algunas lipoproteínas) también podrían contribuir en la capacidad de persistencia de este microorganismo [55].

## 1.6 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La sífilis es una infección sistémica que evoluciona de forma crónica si no se trata adecuadamente. El período de incubación, comprendido entre el momento del contacto con una persona infectada y la aparición de la primera lesión cutáneomucosa, presenta una duración media de 21 días (rango de 9 a 90 días). La infección se desarrolla en etapas diferenciadas (aunque solapables) que se categorizan según la duración [71]. Las manifestaciones clínicas son muy variadas, razón por la cual la sífilis es conocida como “la gran simuladora”. Según el estadio, se clasifica en sífilis precoz (primaria, secundaria y precoz latente) y sífilis tardía (tardía latente y terciaria) (**figura 10**).

El riesgo de transmisión por contacto sexual es mayor durante los dos primeros años de haber adquirido la infección y especialmente cuando existen lesiones sífilíticas, con una infectividad de alrededor del 10-30% [16, 72]. La transmisión vertical (vía transplacentaria o por el canal del parto) de TPA causa la sífilis congénita [34, 36].



**Figura 10.** Estadios de la sífilis. Elaboración propia.

### 1.6.1 Sífilis precoz

Según el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades, la sífilis precoz es la que se ha adquirido en el último año y según la Organización Mundial de la Salud, en los 2 últimos años [73, 74]. Es la etapa con más riesgo de transmisión, especialmente cuando hay lesiones en los genitales y en las mucosas [16, 72, 75, 76].

#### **Sífilis primaria**

La sífilis primaria, primera etapa de la enfermedad, puede durar entre 3 y 6 semanas y se caracteriza por el desarrollo de una única pápula de 0,5 a 2 cm que se erosiona y forma el conocido chancro sifilítico [77]. El chancro es una úlcera superficial y aislada, indolora y endurecida de base limpia, no purulenta, con bordes firmes y sobreelevados. Aparece en el lugar de inoculación, generalmente localizado en el área anogenital (pene o vulva, cuello del útero, zona perianal o recto) aunque puede aparecer en regiones extragenitales (mayoritariamente en la boca). Frecuentemente, está acompañado por una linfadenopatía regional indolora y no supurativa. Las presentaciones atípicas pueden incluir úlceras múltiples; úlceras dolorosas blandas y/o purulentas que pueden confundirse con las ampollas causadas por el Virus del Herpes Simple; o bien la infección puede evolucionar sin presencia del chancro (Balanitis sifilítica de Follmann). El chancro suele desaparecer de forma espontánea en 3-10 semanas sin dejar cicatriz, excepto en formas atípicas [16, 72, 75].

#### **Sífilis secundaria**

La sífilis secundaria aparece entre 6 semanas y 6 meses después de la aparición del chancro primario, y consiste en un estado bacteriémico en el que se ven involucrados diversos sistemas del organismo. En un 25% de los casos, las manifestaciones típicas de la sífilis secundaria aparecerán cuando el chancro aún esté presente [16]. Entre los signos más comunes se encuentran erupciones mucocutáneas (especialmente en el

tronco) y linfadenopatía generalizada. En el 90% de los casos aparecerá un sarpullido cutáneo con lesiones maculares, maculopapulares, papulares o pustulosas, que frecuentemente se localizan en las palmas de las manos y las plantas de los pies. En áreas intertriginosas pueden formarse condilomas planos o condylomata lata, y en las mucosas pueden aparecer placas mucosas, siendo ambas lesiones altamente infecciosas. En la lengua podemos encontrar zonas depapiladas (lengua en prado segado) y en el cuero cabelludo zonas de alopecia (alopecia apolillada). Además de las manifestaciones dermatológicas, puede haber malestar general, febrícula, anorexia, artralgias y mialgias. Afectaciones como hepatitis, esplenomegalia, periostitis, aortitis, glomerulonefritis, uveítis, retinitis, entre otras, también pueden ser manifestaciones de sífilis secundaria [16, 75, 78]. Las manifestaciones neurológicas pueden darse en un 25-60% de los pacientes con secundarismo y deben tratarse como neurosífilis precoz [72, 75, 78]. Las manifestaciones más frecuentes son meningitis, parálisis de los nervios craneales y afectación auditiva y ocular y sífilis meningovascular [16, 75].

### 1.6.2 Sífilis latente

Durante la sífilis latente no hay manifestaciones clínicas ni evidencias de infección treponémica, pero sí reactividad serológica. La sífilis latente se clasifica, según el tiempo que ha transcurrido desde que se ha contraído la enfermedad, en sífilis latente precoz (durante el primer año de infección) y sífilis latente tardía (más de un año) [73, 75].

### 1.6.3 Sífilis terciaria

La sífilis terciaria afecta aproximadamente a un 10-30% de los pacientes no tratados adecuadamente, aunque hoy en día es poco habitual gracias al extenso uso de antimicrobianos [16, 75]. Esta fase de la enfermedad ocurre tras varios años desde la infección (entre 10 y 40 años) y provoca daños severos, pudiéndose ver afectados

prácticamente todos los órganos y tejidos. Los cuadros más comunes son la sífilis gomatosa (15%), la sífilis cardiovascular (10%) y la neurosífilis (7%) [16, 72, 75].

La goma es una lesión granulomatosa destructiva que puede desarrollarse en cualquier tejido de manera aislada o múltiple y presentar tamaños variables. Las localizaciones más habituales son la piel, con nódulos más o menos profundos, y los huesos, provocando fracturas y/o afectación articular [16, 72, 75]. En la sífilis cardiovascular encontramos una endoarteritis obliterante que afecta a los vasos sanguíneos que recubren la aorta, provocando necrosis de la capa media y tejido elástico, aortitis y la posible formación de un aneurisma que puede causar afectación valvular si se da en la aorta ascendente [16, 75]. La neurosífilis es la infección por TPA del sistema nervioso central que puede darse en cualquier momento de la infección, pero está típicamente asociada a un estadio más avanzado (neurosífilis tardía). La neurosífilis puede causar meningitis, sífilis meningovascular (afectación isquémica en cerebro o médula) y neurosífilis parenquimatosa (paresia general y/o tabes dorsal) [1, 16, 72, 75].

### 1.6.4 Sífilis congénita

La transmisión vertical puede producirse en cualquier estadio de la sífilis, siendo más probable durante los dos primeros años de infección [1, 16, 75]. Suele transmitirse en un estado avanzado de la gestación (a partir de las 28 semanas), por lo que un tratamiento adecuado prematuro consigue evitar la infección del feto [75]. La sífilis congénita puede ser causa de muerte fetal, muerte perinatal, parto pretérmino, enfermedad neonatal o infección latente. Durante la sífilis congénita temprana (2 primeros años) suele haber afectación osteocondral y mucocutánea y puede haber hepatoesplenomegalia y síntomas neurológicos. En la sífilis congénita tardía (tras los 2 primeros años), se pueden desarrollar lesiones inflamatorias crónicas, queratitis intersticial, sordera, artropatías, malformaciones craneofaciales y dentales, neurosífilis, entre otros [1, 16, 75].

## 1.7 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA SÍFILIS

El diagnóstico de la sífilis se fundamenta en la evaluación clínica del paciente (manifestaciones clínicas y riesgo epidemiológico) y la confirmación mediante pruebas de laboratorio. El diagnóstico microbiológico de la sífilis viene condicionado principalmente por la presencia o ausencia de manifestaciones clínicas en el paciente (cribado asintomático o sospecha clínica), por el tipo de manifestaciones clínicas y el tipo de muestras que se hayan podido recoger.

Los métodos diagnósticos de la sífilis se clasifican en métodos directos (demuestran explícitamente la presencia de TPA) y métodos indirectos (demuestran la respuesta inmunitaria después de una infección), siendo estas últimas el principal método diagnóstico [79].

### 1.7.1 Diagnóstico directo

El diagnóstico mediante métodos directos se puede realizar en las úlceras o lesiones cutáneas, adenopatías, tejidos o LCR y es especialmente útil durante el período ventana, cuando aún no hay respuesta inmunitaria detectable [80]. Las metodologías principales incluyen la microscopía y las técnicas de biología molecular:

#### **Microscopía en campo oscuro**

La microscopía en campo oscuro proporciona un diagnóstico inmediato ya que permite visualizar las espiroquetas y su movimiento rotatorio característico. Debe hacerse en menos de 30 minutos tras la obtención de la muestra, por lo que es una técnica que queda limitada a laboratorios de microbiología que están muy cerca de la consulta médica. Podría considerarse una técnica de laboratorio en el lugar de asistencia (*point of care*). Es una técnica laboriosa y su sensibilidad y especificidad son limitadas, por lo



que requiere un especialista con elevada experiencia en microscopía [16, 75, 79]. Si bien un resultado positivo es definitivo, un resultado negativo nunca excluye un diagnóstico de sífilis ya que una baja concentración de espiroquetas en la muestra podría pasar desapercibida. La microscopía no está indicada en muestras de lesiones orales y anales debido a la presencia de treponemas saprófitos en estas localizaciones [79, 80].

### **Reacción en cadena de la polimerasa**

Las técnicas de biología molecular están ganando terreno a la microscopía ya que no requieren la inmediatez entre la obtención de la muestra y el análisis, son técnicas muy sensibles y específicas, y no son tan subjetivas como la microscopía [16, 79]. Además, aunque la muestra de elección es el exudado del chancro, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) también se puede realizar a partir de lesiones orales y anales, sangre, tejidos, LCR, humor vítreo y líquido amniótico [16, 75]. Los principales genes diana descritos son el gen *tmpA* (codifica para la proteína A treponémica de membrana), el gen *4D* (codifica para la lipoproteína de subsuperficie 4D), el gen *bmp* (codifica para la proteína de membrana básica), el gen *tpp47* (codifica para una proteína de membrana de 47 Kilodalton), y el gen *poIA* (codifica para la ADN polimerasa I), siendo estos dos últimos los más usados habitualmente para la detección de TPA [81].

Existen otras técnicas que permiten la detección directa de TPA pero que actualmente se utilizan poco en los laboratorios de diagnóstico debido a su laboriosidad. Entre ellas se encuentran la detección inmunohistoquímica mediante anticuerpos policlonales; la hibridación en tejidos; la tinción de Warthin-Starry en tejidos o la inmunofluorescencia directa [75].

## 1.7.2 Diagnóstico indirecto o serológico

Los métodos indirectos permiten tanto la detección de la infección activa como de la infección pasada, así como realizar un seguimiento de la evolución de la infección. Sin embargo, proporcionan un diagnóstico presuntivo y no definitivo, precisando la combinación de pruebas treponémicas y no treponémicas para poder informar de un resultado positivo [16, 79, 80].

### **Pruebas no treponémicas**

Las pruebas no treponémicas, o reagínicas, permiten determinar mediante floculación la presencia de inmunoglobulinas G y M frente al complejo antigénico formado por cardiolipina, lecitina y colesterol, resultado de la interacción de TPA con los tejidos del huésped [75, 79].

Por un lado, los anticuerpos reagínicos son buenos marcadores en fase aguda ya que sus valores son altos durante las fases tempranas de la infección (suelen positivizar a los 10-15 días de la aparición del chancro). Además, las pruebas no treponémicas proporcionan resultados semi-cuantitativos y se expresan en forma de diluciones o títulos (1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16...), que se correlacionan con la actividad de la enfermedad, permitiendo la monitorización de la evolución de la infección y la eficacia del tratamiento [79]. Una disminución de 2 títulos (o más) sugiere una respuesta favorable al tratamiento y una buena evolución de la infección [16]. Por otro lado, los anticuerpos reagínicos no son específicos para TPA y también se desarrollan en respuesta a otras enfermedades, lo que puede dar lugar a reacciones cruzadas o falsos positivos. Los falsos negativos pueden darse por una baja cantidad de anticuerpos o por un exceso de anticuerpos. Esto último se conoce como fenómeno prozona, que consiste en la ausencia de aglutinación o presencia de aglutinación completa en las diluciones altas [16, 75, 79, 82]. Las dos pruebas no treponémicas principales son: *VDRL (Venereal*

*Diseases Research Laboratory*) (floculación microscópica) y RPR (*Rapid Plasma Reagin*) (floculación macroscópica). Ambas técnicas son sencillas, baratas y sensibles, aunque manuales y no automatizadas [75, 79]. Como toda técnica observador-dependiente, puede haber variación entre la interpretación del título, hecho que debe tenerse en cuenta si el seguimiento se hace en laboratorios diferentes.

### Pruebas treponémicas

Las pruebas treponémicas detectan anticuerpos específicos frente a antígenos treponémicos. Estos anticuerpos son detectables de manera precoz (5-15 días desde la aparición del chancro) y permanecen en el organismo hospedador por muchos años aún después de su curación, o incluso toda la vida [75]. Por consiguiente, estas pruebas son muy específicas, pero no son útiles para diferenciar entre infección aguda o pasada. Algunas de las pruebas treponémicas se realizan en plataformas automatizadas, facilitando su uso como técnica de cribado [16, 75]. Las técnicas más comunes son: la quimioluminiscencia; los enzoinmunoensayos; la hemaglutinación y aglutinación como el TPHA (*Treponema pallidum hemagglutination test*) y el TPPA (*Treponema pallidum particle agglutination*); y la inmunofluorescencia como el FTA-abs (*fluorescent treponemal antibody absorption test*) [75, 79].

#### 1.7.3 Algoritmos de cribado

Hoy en día no hay disponible una técnica específica que pueda utilizarse como único método diagnóstico, sino que deben emplearse diferentes pruebas de forma conjunta para confirmar la infección. Las guías internacionales para el manejo de la sífilis describen dos algoritmos diagnósticos para el cribado de la población:

- El denominado algoritmo tradicional solía usarse antes de la implementación de pruebas automatizadas y se sigue empleando en laboratorios pequeños que no

tienen un gran volumen de muestras o que tienen pocos recursos. Primero se realiza una prueba no treponémica, que de ser positiva debe confirmarse con una prueba treponémica. Este algoritmo solamente detecta sífilis activa [79].

- El algoritmo inverso o reverso se emplea en la mayoría de los laboratorios con un elevado número de muestras, ya que la primera técnica suele ser una prueba treponémica automatizada (por quimioluminiscencia o enzimoimmunoensayo). Un resultado negativo excluye la infección en el contexto de cribado, pero debe repetirse a las 6 semanas ante un paciente con sospecha clínica. Como las pruebas treponémicas no son capaces de diferenciar entre infección activa, latente o pasada, un resultado positivo debe confirmarse con una prueba no treponémica [16, 75, 79, 82].

## 1.8 TRATAMIENTO

Desde el descubrimiento de la actividad treponemicida de la penicilina en 1943, este antibiótico ha sido y sigue siendo el tratamiento de elección para la sífilis [4]. Sin embargo, también se han usado otras pautas terapéuticas para aquellos pacientes alérgicos a la penicilina o que rechazan el tratamiento por vía parenteral. La azitromicina 2g oral en una única dosis ha sido el tratamiento alternativo durante muchos años por su facilidad de administración y la larga vida media de este antibiótico. No obstante, la rápida aparición de fracasos terapéuticos ha provocado que se excluya de las guías terapéuticas como tratamiento de primera elección [75]. Por el contrario, la doxiciclina sigue siendo una buena opción para el tratamiento alternativo de la sífilis cuando no es posible el uso de la penicilina [83].

Las pautas de tratamiento recomendadas se basan en el estadio de la infección en el momento del diagnóstico y varían ligeramente en todo el mundo. Los tratamientos recomendados por la guía de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica se resumen en la **tabla 1** [83].

**Tabla 1.** Guía para el tratamiento de la sífilis adquirida [83].

|  | <b>Tratamiento de elección</b>   | <b>Tratamiento alternativo</b>  |
|--|--|---|
| <b>Sífilis primaria, secundaria o sífilis latente precoz</b>                       | Penicilina benzatina G 2,4 M UI IM en dosis única  | Doxiciclina 100 mg oral diariamente cada 12 horas durante 14 días   |
| <b>Sífilis latente tardía, sífilis de duración desconocida o sífilis terciaria</b> | Penicilina benzatina G 2,4 M UI IM semanalmente durante 3 semanas (en los días 0, 7 y 14)                | Doxiciclina 100 mg oral diariamente cada 12 horas durante 28 días   |
| <b>Neurosífilis, sífilis oftalmológica o sífilis ótica</b>                         | Penicilina G sódica 3-4 M UI IV cada 4 horas o 18-24 M UI en infusión continua, ambas durante 10-14 días | Penicilina G procaína 2,4 M UI IM con probenecid (500 mg cada 6 horas) diariamente durante 10-14 días.<br><br>En caso de alergia a la misma, debe pautarse una desensibilización y tratamiento con penicilina IV.<br><br>*Ceftriaxona 2 g IV al día durante 10-14 días) |

M: millones; UI: unidades; IM: vía intramuscular; IV: vía intravenosa.

El tratamiento en mujeres gestantes debe ser adecuado al estadio de la enfermedad, pero, en caso de alergia a penicilina, debe pautarse una desensibilización y tratar con penicilina [83].

### **Reacción de Jarisch-Herxheimer**

La reacción de Jarisch-Herxheimer es una reacción sistémica autolimitada que se produce una o dos horas después del tratamiento de la sífilis, probablemente debido a la lisis masiva de las espiroquetas. Se da sobre todo en pacientes tratados con penicilina y es más frecuente en la sífilis secundaria. Se presenta comúnmente como un cuadro febril con mialgias y cefaleas y normalmente se resuelve a las 24 horas [16, 83].

## 1.9 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE TPA

Las técnicas de biología molecular permiten estudiar la diversidad genética y las dinámicas de transmisión de muchos microorganismos, así como relacionar variantes genéticas con determinadas manifestaciones clínicas de algunas enfermedades infecciosas.

Durante los últimos veinte años se han descrito diferentes métodos de tipificación para TPA (**tabla 2**), muchos de ellos centrados en loci altamente variables, ya que la diversidad genética de este microorganismo es bastante limitada (menos del 0,03%) [84]. En 1998, investigadores de los Centros para la Prevención y el Control de Enfermedades (CDC) propusieron el primer método de tipificación molecular conocido como *CDC typing* [85]. En el año 2010, este método fue modificado por Marra et al. [86] y fue denominado *Enhanced CDC Typing* (ECDCT). Existen otros métodos descritos como el *Sequenced-based molecular typing* (SBMT) [87]; el *CDC-rpsA* [88] y, el más reciente, el método *Multilocus Sequence Typing* (MLST) [84].

**Tabla 2.** *Métodos para la tipificación de Treponema pallidum subespecie pallidum.*

| Nombre del método | Metodología              | Genes           | Nomenclatura tipificación  | Referencia                            |
|-------------------|--------------------------|-----------------|----------------------------|---------------------------------------|
| <b>CDC typing</b> | Repeticiones de 60 pb    | <i>arp</i>      | Subtipo                    | <b>Pillay et al., 1998</b><br>[85]    |
|                   | RFLP                     | <i>tprE,G,J</i> |                            |                                       |
| <b>SBMT</b>       | Secuenciación por Sanger | <i>tp0136</i>   | Genotipo                   | <b>Flasarová et al., 2006</b><br>[87] |
|                   |                          | <i>tp0548</i>   |                            |                                       |
|                   |                          | ARNr            |                            |                                       |
|                   |                          | 23S             |                            |                                       |
| <b>ECDCT</b>      | Repeticiones de 60 pb    | <i>arp</i>      | Tipo                       | <b>Marra et al., 2010</b><br>[86]     |
|                   | RFLP                     | <i>tprE,G,J</i> |                            |                                       |
|                   | Secuenciación por Sanger | <i>tp0548</i>   |                            |                                       |
| <b>CDC-rpsA</b>   | Repeticiones de 60 pb    | <i>arp</i>      | Subtipo                    | <b>Katz et al., 2010</b> [88]         |
|                   | RFLP                     | <i>tprE,G,J</i> |                            |                                       |
|                   | Repeticiones de guaninas | <i>rpsA</i>     |                            |                                       |
| <b>MLST</b>       | Secuenciación por Sanger | <i>tp0136</i>   | Perfil alélico o haplotipo | <b>Grillová et al., 2018</b><br>[84]  |
|                   |                          | <i>tp0548</i>   |                            |                                       |
|                   |                          | <i>tp0705</i>   |                            |                                       |

CDC: Centers for Disease Control and Prevention; SBMT: Sequencing Based Molecular Typing; ECDCT: Enhanced CDC Typing Method; MLST: Multilocus Sequence Typing; pb: pares de bases; RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphisms

### 1.9.1 Caracterización molecular mediante los métodos de los CDC

El método propuesto por los CDC fue el primer sistema de tipificación molecular para TPA y, por ello, es el más conocido y ampliamente utilizado a nivel internacional. El método CDC consiste en la caracterización de los genes *arp* y *tpr*. Su versión ampliada se conoce como método ECDCT e incorpora la caracterización del gen *tp0548*.

- **Gen *arp* (acidic repeat protein) (*tp0433*):** codifica para una proteína de membrana que contiene un dominio de unión a fibronectina, por lo que se cree que podría tratarse de una región inmunogénica [89]. Su principal característica es la presencia de motivos de 60 pares de bases (pb) repetidos en tándem. Las diferentes variantes genéticas de TPA se pueden distinguir según el número de repeticiones de 60 pb presentes en este gen, que se determina mediante el peso molecular del producto amplificado por PCR [85].
  
- **Familia de genes *tpr* (*Treponema pallidum repeat*)** está constituida por tres subfamilias:
  - Subfamilia I (*tprC*, *tprD*, *tprF*, *tprI*)
  - Subfamilia II (*tprE*, *tprG*, *tprJ*)
  - Subfamilia III (*tprA*, *tprB*, *tprH*, *tprK*, *tprL*)

Estos genes actúan como factores de virulencia mediante mecanismos de evasión inmunogénica [49, 90]. Los genes *tprE* (*tp0313*), *tprG* (*tp0317*) y *tprJ* (*tp0621*) de la subfamilia II presentan múltiples dianas de restricción para la endonucleasa MseI. Tras la digestión enzimática de los genes amplificados previamente por PCR, es posible la diferenciación de variantes genéticas mediante la determinación de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphisms*). Cada fragmento de restricción o patrón de bandas lleva asignado una letra en minúscula [85].



- **Gen *tp0548*:** se cree que codifica para una proteína de membrana transportadora de ácidos grasos de cadena larga, aunque todavía no está bien establecida su función [55]. En este caso, el análisis consiste en secuenciar un fragmento de 81 pb del gen *tp0548* y caracterizarlo según los polimorfismos de un solo nucleótido con relación a las cepas de referencia. A cada tipo de secuencia se le asigna una letra en minúscula [86].

Al resultado de la tipificación por el método CDC se le denomina “subtipo” y se determina mediante la combinación del número de repeticiones del gen *arp* y la letra asignada al patrón de restricción de los genes *tpr* [85]. Al resultado de la tipificación por ECDCT se le denomina tipo y es producto de combinar el subtipo CDC y el tipo de secuencia del gen *tp0548* [86]. Por ejemplo, supongamos un aislado de TPA que presenta 14 repeticiones en el gen *arp*, un patrón de bandas del gen *tpr* denominado “d” y una secuencia del gen *tp0548* denominada “g”. Se determina que este aislado pertenece al subtipo 14d y al tipo 14d/g.

### 1.9.2 Caracterización molecular basada en análisis de secuencias de múltiples locus

El método MLST fue propuesto por Grillová y su grupo de la Universidad Masaryk (República Checa) [84] en el 2018. Este esquema consiste en la combinación de tres números asociados a las secuencias de los genes *tp0136*, *tp0548* y *tp0705*.

- **Gen *tp0136*:** codifica para una adhesina (proteína de membrana) que se une a fibronectina, un componente importante de la matriz extracelular del huésped y se cree que juega un papel importante en la persistencia de la infección [91]. Se determinan el tipo de secuencia según la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido en una región amplificada de 1206 pb [84].

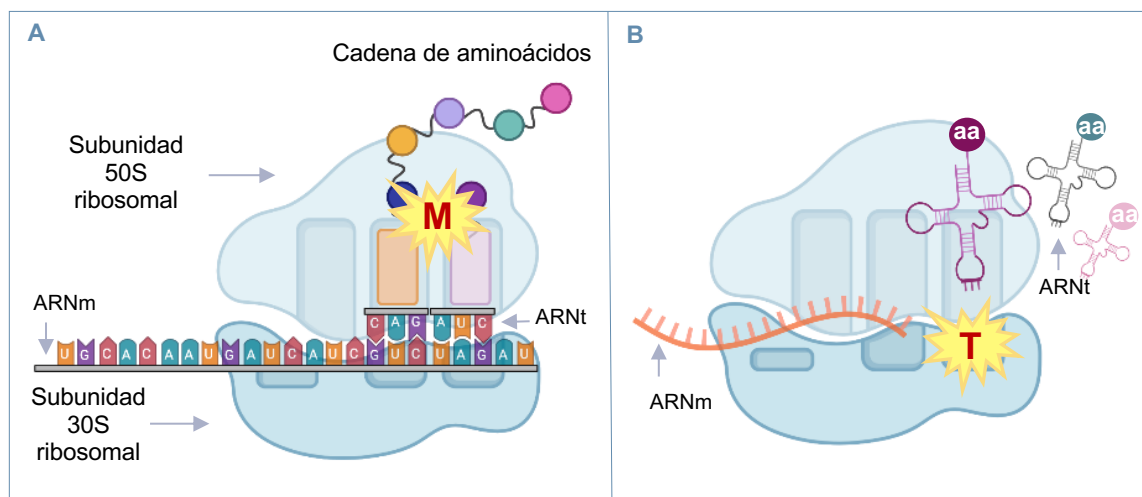
- **Gen *tp0548*:** como se ha mencionado anteriormente, se cree que codifica para una proteína de membrana transportadora de ácidos grasos de cadena larga [55]. En este caso, la caracterización se realiza en una región amplificada de 1065 pb [84].
- **Gen *tp0705*:** este gen codifica para una proteína de unión a penicilina [92]. La región amplificada que se analiza en este gen presenta una longitud de 803 pb [84].

El resultado del método MLST se denomina perfil alélico o haplotipo y es producto de unir los tres números de cada gen separados por puntos. Por ejemplo, supongamos un caso que presenta la secuencia “1” del gen *tp0136*, la secuencia “3” del gen *tp0548* y la secuencia “1” del gen *tp0705*, determinaremos que pertenece al perfil alélico o haplotipo 1.3.1. Cada perfil alélico o haplotipo es, a su vez, renombrado con un número para definir el secuenciotipo (ST), atendiendo a los datos disponibles en la plataforma pública PubMLST [93, 94].

## 1.10 RESISTENCIAS ANTIBIÓTICAS

### 1.10.1 Resistencia a los macrólidos

Los macrólidos actúan inhibiendo la síntesis proteica bacteriana uniéndose a la subunidad 50S ribosomal. La subunidad 23 del ARN ribosomal (ARNr 23S) forma parte del complejo 50S del ribosoma y presenta función peptidil-transferasa, es decir, cataliza la formación de enlaces peptídicos entre los aminoácidos durante la traducción a proteínas. Los macrólidos se unen al sitio P del ARNr 23S bloqueando la translocación del peptidil ARN de transferencia durante la elongación y, por tanto, impidiendo la unión de la cadena aminoacídica [95] (**figura 11A**).



**Figura 11.** Mecanismo de acción de los macrólidos y las tetraciclinas. **A)** Macrólido (M) impide la translocación del ARN de transferencia. **B)** Tetraciclina (T) unida a la subunidad 16 del ribosoma impide la unión del ARN mensajero.

M: macrólido; T: tetraciclina; ARNm: ARN mensajero; ARNt: ARN de transferencia; aa: aminoácido. Elaborado con BioRender.com (2021).

Se han descrito diferentes mutaciones puntuales en el gen del ARNr 23S de diversos microorganismos que confieren un fenotipo de resistencia frente a los macrólidos. En el año 2004, investigadores de la Universidad de Washington [96] demostraron la transición de una guanina por una adenina en la posición 2058 (A2058G) en el gen del ARNr 23S (posición en la secuencia de *Escherichia coli*) de TPA en dos pacientes con

sífilis con sospecha de fracaso de tratamiento a azitromicina. Este hallazgo fue confirmado mediante estudios *in vivo*. Los conejos infectados con la cepa salvaje de TPA respondieron al tratamiento con azitromicina y eritromicina mientras que los conejos con la cepa con la mutación A2058G mantuvieron las lesiones. En 2009, se identificó la presencia de la misma mutación pero en una posición inmediatamente después (A2059G) en un paciente con sospecha de fracaso de tratamiento a espiramicina [97].

### 1.10.2 Potencial desarrollo de resistencia a las tetraciclinas

Las tetraciclinas son antibióticos bacteriostáticos que actúan inhibiendo la síntesis proteica mediante la unión al ARNr 16S de la subunidad 30S del ribosoma. El ARNr 16S es complementario a la secuencia Shine-Dalgarno del ARN mensajero y la unión de ambas secuencias permiten el inicio de la traducción a proteínas. Así, la traducción del ARN bacteriano es inhibida por las tetraciclinas al bloquear el acoplamiento del ribosoma [98] (**figura 11B**). Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro eficaces en el tratamiento de diferentes ITS y otras infecciones bacterianas. No obstante, se han identificado resistencias secundarias a mutaciones en el *loop* de la hélice 31 del gen ARNr 16S en algunas bacterias como *Helicobacter pylori* [99–102] y *Propionibacterium acnes* [103] (**tabla 3**).

**Tabla 3.** Mutaciones que confieren resistencia a las tetraciclinas en *Helicobacter pylori* y *Propionibacterium acnes*.

| Microorganismo                 | Posición<br>( <i>Escherichia coli</i> ) | Secuencia original | Secuencia de resistencia |
|--------------------------------|---|--------------------|--------------------------|
| <i>Helicobacter pylori</i>     | 965-967                                 | AGA                | TTC                      |
|                                | 939                                     | A                  | C                        |
| <i>Propionibacterium acnes</i> | 1058                                    | G                  | C                        |

TPA: *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*; A: adenina; G; guanina; T; timina; C: citosina.

Se cree que el mecanismo por el cual TPA podría desarrollar resistencia a las tetraciclinas bajo presión antibiótica sería mediante mutaciones espontáneas en el gen ARNr 16S, puesto que carece de elementos genéticos típicamente asociados a mecanismos de transferencia horizontal. Sin embargo, la literatura científica existente hasta el momento no muestra evidencia de mutaciones en esta región del genoma de TPA [104–110].

# 2

## JUSTIFICACIÓN

---



## 2. JUSTIFICACIÓN

---

La sífilis ha causado graves problemas de salud pública en todo el mundo a lo largo de su historia. En la actualidad, la sífilis presenta una elevada incidencia en países en vías de desarrollo, causando grandes estragos debido al acceso limitado a antibióticos y a las escasas medidas higiénico-preventivas. En los países desarrollados es una enfermedad reemergente, sobre todo entre los grupos con más riesgo para la adquisición de ITS como los HSH. Barcelona es una ciudad cosmopolita, altamente poblada y con una gran diversidad cultural. Además, en los últimos años han proliferado tanto los locales de ocio nocturno como las redes sociales de intercambio sexual, lo que puede haber favorecido el aumento en la incidencia de las ITS. La reemergencia de la sífilis justifica la necesidad de profundizar en el conocimiento sobre el patógeno que causa esta enfermedad. Dado que el cultivo *in vitro* de TPA ha sido prácticamente utópico hasta la fecha, muchas de las investigaciones se basan en estudios moleculares de aislados clínicos. La caracterización molecular de TPA permite conocer la distribución geográfica de sus variantes, la identificación de cepas predominantes y su asociación con diferentes manifestaciones clínicas, y la identificación de brotes y redes de transmisión. Afortunadamente, el tratamiento de primera línea de la sífilis sigue siendo efectivo, sin que se hayan documentado casos de fracaso terapéutico. Sin embargo, el extenso uso de antibióticos puede desencadenar el desarrollo de mecanismos de resistencia, tal y como ha sucedido con otras ITS. Los análisis de sensibilidad antimicrobiana también se han visto obstaculizados por la dificultad del cultivo de TPA, por lo que se fundamentan en la búsqueda de mutaciones presentes en su genoma que puedan conferir resistencia. Existen varios estudios sobre la epidemiología molecular y la resistencia a macrólidos y tetraciclinas de TPA en numerosos países durante las últimas dos décadas. Sin embargo, según nuestro conocimiento, no hay datos disponibles a nivel local ni tampoco a nivel nacional.





# 3

## OBJETIVOS

---



## 3. OBJETIVOS

---

### Objetivo general:

El objetivo principal de esta tesis es estudiar la epidemiología molecular de TPA a partir de una cohorte de pacientes diagnosticados de sífilis precoz durante el año 2015 en la ciudad de Barcelona.

### Objetivos específicos:

1. Analizar el rendimiento de las muestras de exudado de úlcera genital y de sangre total para la detección molecular de TPA y para su uso en estudios de epidemiología molecular.
2. Describir las variantes genéticas de TPA circulantes en Barcelona durante el 2015 según el método ECDCT.
3. Describir los perfiles genéticos de TPA circulantes en Barcelona durante el 2015 según el método MLST.
4. Comparar los métodos de tipificación molecular de TPA: ECDCT y MLST
5. Identificar la presencia de mutaciones en TPA que confieren resistencia a macrólidos
6. Identificar la presencia de mutaciones en TPA potencialmente asociadas a resistencia a tetraciclinas



# 4

## RESULTADOS

---



## 4. RESULTADOS

---

A continuación, se presentan las tres publicaciones que constituyen esta tesis doctoral por compendio de artículos:

### 4.1. Primer trabajo: Nueva variante del gen *tp0548* de *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* identificado en Barcelona, España.

**Título original:** Novel *tp0548* sequence-type of *Treponema pallidum* identified in Barcelona, Spain.

**Fernández-Naval C**, Arando M, Espasa M, Antón A, Gimferrer L, Piñana M, Fernández-Huerta M, González-López JJ, Serra-Pladevall J, Pumarola T, Vall-Mayans M, Esperalba J.

Sexually Transmitted Diseases. 2019 May; 46(5):e50-e52.

DOI: 10.1097/OLQ.0000000000000947

### RESUMEN

Una nueva variante del gen *tp0548* de TPA fue identificada en una muestra de úlcera genital de un paciente con sífilis primaria diagnosticado en el Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona). La nueva variante fue denominada con la letra "z" siguiendo la nomenclatura del método ECDCT.



**4.2. Segundo trabajo:** Tipificación molecular de *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* mediante el método *Enhanced CDC Typing* y estudio de resistencias a macrólidos y tetraciclinas en Barcelona.

**Título original:** Enhanced molecular typing and macrolide and tetracycline-resistance mutations of *Treponema pallidum* in Barcelona.

**Fernández-Naval C**, Arando M, Espasa M, Antón A, Fernández-Huerta M, Silgado A, Jimenez I, Villatoro AM, González-López JJ, Serra-Pladevall J, Sulleiro E, Pumarola T, Vall-Mayans M, Esperalba J.

Future Microbiology. 2019 Sep;14:1099-1108.

DOI: 10.2217/fmb-2019-0123

## RESUMEN

**Objetivo:** describir los tipos moleculares de TPA y el porcentaje de muestras con mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos y tetraciclinas en Barcelona.

**Material y métodos:** la determinación de los tipos moleculares se realizó siguiendo el método ECDCT (genes *arp*, *tpr* y *tp0548*). El estudio de resistencia antibiótica se realizó mediante la secuenciación de una región de los genes ARNr 23S y 16S.

**Resultados:** 183 pacientes fueron incluidos en el estudio, de los cuales se recogieron 213 muestras (99 muestras de exudado de úlcera genital y 114 muestras de sangre total). De las 88 muestras de úlcera positivas, se pudieron caracterizar completamente 62 (70,5%), pero ninguna de las 42 muestras positivas de sangre se pudo tipificar totalmente. Se detectaron 21 tipos diferentes, siendo los más frecuentes el 14d/g (27,4%) y el 14f/g (14,5%). El 94% de las muestras presentó alguna de las mutaciones de resistencia a macrólidos, pero no se detectó ninguna mutación potencialmente asociada a resistencia a tetraciclinas.

**Conclusiones:** se identificaron diferentes tipos genéticos de TPA circulando en Barcelona además de un elevado porcentaje de resistencias a macrólidos, pero no se detectaron mutaciones de resistencia a tetraciclinas.

### 4.3. Tercer trabajo: Tipificación molecular de *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* mediante el método *Multilocus Sequence Typing* en Barcelona

**Título original:** Multilocus sequence typing of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Barcelona.

**Fernández-Naval C**, Arando M, Espasa M, Antón A, Fernández-Huerta M, Silgado A, Pinatar C, Zarzuela F, González-López JJ, Serra-Pladevall J, Sulleiro E, Pumarola T, Vall-Mayans M, Esperalba J.

Future Microbiology. 2021 Sep;16:967-976.

DOI: 10.2217/fmb-2021-0037

## RESUMEN

**Objetivo:** realizar la tipificación de TPA mediante el método MLST en muestras clínicas de sífilis previamente caracterizadas por el método ECDCT y en las que se habían estudiado mutaciones de resistencia a macrólidos y tetraciclinas.

**Material y métodos:** el método MLST se realizó en muestras de exudado de úlcera genital y sangre total mediante la secuenciación Sanger de los loci *tp0136*, *tp0548* y *tp0705*.

**Resultados:** se pudieron caracterizar completamente un total de 59/85 (69,4%) muestras de exudado de úlcera genital y 4/39 (10,3%) muestras de sangre total. El perfil alélico más frecuente fue el 1.3.1 (56%) y el 1.1.1 (11%). Todas las muestras tipificadas como 1.3.1 presentaban también la mutación A2058G, responsable de la resistencia a macrólidos. Ambas metodologías, MLST y ECDCT, presentaron rendimientos de tipificación similares.

**Conclusiones:** se identificaron diferentes perfiles alélicos en Barcelona, que fueron agrupados y diferenciados en los dos clados principales de TPA. Los resultados obtenidos en este estudio fueron similares a los descritos previamente en Europa.



# 5

## DISCUSIÓN

---



## 5. DISCUSIÓN

---

La sífilis ha sido causa de grandes epidemias desde finales del siglo XV y sigue siendo un asunto importante de salud pública en todo el mundo. A pesar de su larga historia, todavía no se conocen muchas de las características y mecanismos de su agente patógeno causal, TPA, en parte por las dificultades técnicas para su cultivo *in vitro*. No obstante, los avances en los métodos de biología molecular han permitido salvar algunos de estos impedimentos y han resultado ser un gran recurso tanto para el diagnóstico como para la investigación de la sífilis.

Esta tesis doctoral, constituida por los tres trabajos mencionados en el apartado anterior, presenta los primeros y únicos datos publicados de epidemiología molecular y resistencia antibiótica de TPA en España. Dado que los hallazgos obtenidos en los tres estudios se complementan, se realiza una discusión conjunta.

### Rendimiento de la PCR de detección y de los métodos de tipificación de TPA

Existen diferentes factores que pueden alterar la sensibilidad de las técnicas de biología molecular, entre ellos el tipo de muestra primaria, la cantidad y calidad del material genético, la presencia de sustancias inhibitorias y la diana genética analizada. La carga bacteriana de la muestra es una de las variables más vinculadas al rendimiento de la técnica de PCR y depende, en gran medida, del tipo de muestra primaria. En el presente estudio y tal como se detalla en los resultados del segundo trabajo de esta tesis, se comparó el rendimiento de la PCR en dos tipos de muestra: exudado de úlcera genital y sangre. Atendiendo al tipo de muestra, se observó que el porcentaje de positividad de la PCR de detección fue significativamente más elevado en las muestras de úlcera



genital (88,9%; IC: 82,7–95,1) que en las de sangre total (36,8%; IC: 28,5–46) (valor  $p < 0,0001$ ). Asimismo, las muestras de úlcera presentaron un valor medio del ciclo de amplificación (Ct, del inglés *Cycle threshold*) significativamente inferior al de las muestras sanguíneas (34,4 respecto 39,4) (valor  $p < 0,0001$ ). Aunque no se puede establecer la carga bacteriana (espiroquetas/mL) sin una curva de calibración, el valor de Ct proporciona una idea aproximada de la carga bacteriana ya que es inversamente proporcional a la cantidad de ADN treponémico. Los resultados obtenidos en este estudio indican que, aunque TPA es detectable en sangre en un tercio de los casos, la cantidad de espiroquetas es mucho más elevada en el lugar de inoculación (chancro primario). Además de contener una concentración de espiroquetas inferior, la sangre presenta sustancias inhibitorias, inherentes a este tipo de muestra, que pueden disminuir el rendimiento diagnóstico de la PCR [111, 112]. Estudios anteriores también han descrito valores de sensibilidad mucho más elevados en muestras de úlcera (75%-95%) [113–117] que en muestras sanguíneas (sangre total, suero o plasma) (0 a 55%) [113–115, 118, 119]. Junto con lo descrito previamente, nuestros datos refuerzan que la muestra de úlcera sea la muestra de elección para la detección de TPA debido a su mayor rendimiento. Esto, no obstante, dificulta que aquellos pacientes que no presenten este tipo de lesión se puedan incluir en estudios basados en métodos moleculares. Si bien en algunas ocasiones se pueden observar úlceras primarias en casos de sífilis secundaria, esta es una manifestación relativamente atípica [16]. De hecho, de los 120 pacientes diagnosticados de sífilis secundaria en el presente estudio, se obtuvieron 34 muestras de úlcera (28,3%), en 29 de las cuales (85,3%) se detectó TPA.

Ante esta limitación, varios trabajos han evaluado tipos de muestra alternativos para la detección de TPA en diferentes etapas de la sífilis [118–121]. Castro et al. [118, 120] y Lu et al. [120] obtuvieron un rendimiento diagnóstico en muestras de sangre capilar del lóbulo de la oreja de en torno al 54-66%. Este rendimiento es inferior al que se puede obtener de las úlceras, pero bastante superior al de otras fracciones de la sangre. Por

otro lado, Wang et al. [119] evaluaron en paralelo el rendimiento de la saliva y el plasma de pacientes con diferentes estadios de sífilis, mostrando un rendimiento global del 44% en saliva frente al 29% en plasma. Sorprendentemente, la sensibilidad de la PCR en saliva aumentó hasta el 87,5% en pacientes con sífilis secundaria. El futuro de la muestra de saliva como alternativa a la sangre en casos de sífilis secundaria o en fases latentes parece prometedor. No solo por presentar una elevada sensibilidad, sino también porque su obtención es muy poco invasiva para el paciente.

A lo largo de los años, también se han evaluado diferentes genes para el diagnóstico molecular de la sífilis: el gen de la proteína A treponémica de membrana (*tmpA*), el de la lipoproteína de subsuperficie 4D (*4D*), el de la proteína de membrana básica (*bmp*) y los genes *tpp47* y *polA*, siendo estos dos últimos los utilizados con mayor frecuencia. A pesar de que el gen diana también puede ser una variable que influya en el rendimiento de la PCR, según los metaanálisis de Theel et al. [81] y Gayet-Ageron et al. [122], los genes *tpp47* y *polA* muestran valores de sensibilidad y especificidad similares y pueden usarse indistintamente.

Los métodos de tipificación de TPA se basan en técnicas moleculares, por lo que su rendimiento también viene condicionado por los factores ya mencionados. Siguiendo el método ECDCT, TPA se pudo caracterizar total o parcialmente (por uno, dos o tres genes) en el 81,5% del total de las muestras. La caracterización completa (los tres genes) fue posible en el 47,7% de las muestras, todas ellas procedentes de úlceras genitales. Igual que en la detección molecular de TPA, el rendimiento de tipificación completa en muestras de exudado de úlcera genital también fue significativamente superior que en muestras de sangre (70,5% vs 0%; valor  $p < 0,0001$ ). De hecho, las muestras de sangre solo se pudieron caracterizar parcialmente. Se han descrito rendimientos de tipificación del método ECDCT muy variables entre diferentes estudios. Según la revisión realizada por Fu et al. [123], en los 21 estudios analizados de entre

2010 y 2019, el rendimiento global del ECDCT fue del 72,3%, con un rango de entre el 31% y el 97,5%. Posteriormente, se han publicado tres artículos más que presentan rendimientos del 64% [124], 73% [125] y 92% [110].

Siguiendo el método MLST, y tal como se muestra en el tercer trabajo de esta tesis, el 87,9% de las muestras pudieron ser caracterizadas total o parcialmente (por uno, dos o tres genes). La tipificación completa se consiguió en el 50,8% del total de las muestras. De nuevo, el rendimiento de tipificación fue superior en muestras de úlceras genitales (69,4%) que en muestras de sangre (10,3%) (valor  $p < 0.001$ ). Los estudios publicados previamente muestran unos rendimientos de MLST de entre el 45% y el 100% [84, 107, 108, 110, 126–128]. Según nuestro conocimiento, únicamente otros dos estudios incluyeron muestras de sangre para la caracterización por MLST [126, 128]. En el primero de ellos, Vrbová et al. [126] mostraron un porcentaje de caracterización completa similar al del presente trabajo (48,4% y 50,8% respectivamente). También obtuvieron un mejor rendimiento en las muestras de lesiones primarias y secundarias (82,2%) que en sangre (16,7%). El estudio de Sahi et al. [128] presentó un rendimiento superior en las muestras de úlcera (90%) que en las de sangre (80%), aunque la diferencia no fue tan acusada. El rendimiento global que obtuvieron fue superior al nuestro (76,7% y 50,8% respectivamente). Cabe indicar que las muestras que seleccionaron ya habían sido caracterizadas completamente con el método ECDCT, lo que podría estar sesgando la interpretación de estos resultados [128].

La gran variabilidad entre los rendimientos de tipificación de los diferentes estudios publicados se debe, probablemente, a la heterogeneidad de las variables (criterios de inclusión, número de muestras analizadas, tipo de muestra primaria, parámetros y condiciones de almacenaje y de los protocolos de las técnicas moleculares, etc.) [123]. En nuestro estudio, uno de los factores que más pudo influir es que todas las muestras positivas en la PCR de detección fueron incluidas independientemente del valor de Ct.

Es decir, que las muestras con carga bacteriana más baja también fueron analizadas. De hecho, la media de los valores de Ct fueron inferiores en las muestras caracterizadas completamente (ECDCT: 33,6; MLST: 33,7), en comparación con las muestras que solo se pudieron caracterizar parcialmente (ECDCT: 37,5; MLST: 38,1), o las no caracterizadas (ECDCT: 39,7; MLST: 39,3). Estos valores vuelven a manifestar que la carga bacteriana es un factor crucial en la eficiencia de las técnicas moleculares.

En general, el rendimiento global de los dos métodos utilizados en este estudio, ECDCT y MLST, fue similar. Considerando solo las muestras de úlcera genital, tampoco se observaron diferencias entre ambos métodos. Por el contrario, el rendimiento del método MLST fue superior al del ECDCT en las muestras de sangre. Concretamente, el MLST proporcionó un mayor porcentaje de muestras de sangre parcialmente caracterizadas que el ECDCT (76,9% y 42,9%, respectivamente) y, además, permitió la caracterización completa en el 10,3% de este tipo de muestra.

Es conveniente indicar que el tiempo de congelación y el número de ciclos de congelación-descongelación de las muestras fue superior en los análisis por MLST que por ECDCT (ya que el MLST se realizó posteriormente). Dado que los procesos de congelación pueden provocar un deterioro progresivo del material genético, la comparación de los rendimientos debe tomarse con cautela. Además, el único estudio publicado en el que los dos métodos fueron comparados en paralelo mostró un rendimiento superior del MLST (100%) que del ECDCT (del 91,8%) [110]. Considerando este dato y que las muestras de nuestro estudio podrían estar más deterioradas en los análisis de MLST, podemos sospechar que el método MLST presenta, en realidad, un mayor rendimiento. Sin embargo, se necesitan estudios comparativos adicionales para poder sacar conclusiones más firmes.

## Epidemiología molecular de TPA

Más de 3.000 muestras clínicas han sido estudiadas a nivel internacional desde la implementación del sistema de tipificación de los CDC (genes *arp* y *tpr*) [85] y su posterior ampliación (incluyendo el gen *tp0548*) (método ECDCT) [86].

Teniendo en cuenta los genes del método CDC, se identificaron 12 subtipos diferentes entre las 62 muestras caracterizadas de forma completa, siendo el 14d el predominante (37,1%). Según una revisión reciente basada en 35 publicaciones, el 14d es el subtipo más prevalente (35%) y con mayor distribución mundial, por lo que se cree que podría tener una mayor capacidad de transmisión [123]. En términos generales, los datos obtenidos en Barcelona coinciden con lo descrito internacionalmente [123]. Concretamente en Europa, nuestros datos son muy similares a los descritos en Italia [109], Lisboa [129], y Ámsterdam [125], donde la prevalencia del subtipo 14d fue del 40%, 45% y 48%, respectivamente. En cambio, en un estudio realizado en Dinamarca la prevalencia de este subtipo fue del 73% [130] y en París del 97% [131].

Por otro lado, el subtipo 14f fue el segundo más frecuente en Barcelona (22,6%). Este se ha identificado en China (79%) [132], Taiwán (61%) [133, 134], Estados Unidos de América (EUA) (52-52%) [135, 136], Cuba (40%) [137], Portugal (5%-40%) [120, 129], Canadá (7%) [138], Dinamarca (5%) [130], Países Bajos (1%) [125] y Australia (0,5%) [139]. Es destacable que el subtipo 14f se ha identificado únicamente en otros tres países europeos y en frecuencias bajas (1-5%), excepto por uno de los estudios realizados en Portugal, donde también fue el segundo más prevalente [120].

El tercer subtipo identificado en Barcelona fue el 14a aunque en una proporción mucho más baja (9,7%) que los dos anteriores. Este subtipo ha sido identificado en distintos

países con prevalencias muy variables: Portugal (50-65%) [120, 129]; Sudáfrica (10-54%) [140, 141]; Madagascar (20%) [86]; Cuba (8%) [137]; China (11%) [105] y EUA (4%) [135, 142]. Los únicos países europeos que han identificado el 14a son colindantes (Portugal y España), aunque con prevalencias muy distintas, ya que en Lisboa fue el subtipo predominante (50-65%) [120, 129]. Aun así, es importante destacar la diferencia del periodo de análisis entre ambos estudios, ya que las muestras del nuestro se recogieron en 2015 y las de Portugal entre los años 2003 y 2007.

Con la inclusión del tercer componente del sistema ECDCT, los 12 subtipos CDC se diferenciaron en 21 tipos ECDCT distintos (Índice de diversidad de tipos, TDI: 0,3), revelando que el gen *tp0548* aporta más poder discriminativo al método de tipificación. En el primer trabajo que compone esta tesis, se describió una nueva variante del gen *tp0548* y se le asignó la letra “z”, considerando la nomenclatura del método y la última variante publicada [86, 143]. Esta nueva secuencia “z” se agrupó en la subespecie *pallidum* y en el clado SS14, presentando una alta similitud genética con las secuencias “g” (predominante en Europa) y “m”. La secuencia “z” difería de la “g” en una sustitución no sinónima (A164G) y de la “m” en dos sustituciones no sinónimas (A164G y C141T). La mutación A164G provoca un cambio en la cadena de aminoácidos de una serina por una glicina (S55G) y la C141T provoca el reemplazamiento de una valina por una alanina (V47A). Aunque se hipotetiza que el gen *tp0548* codifica para una proteína de membrana, aún no se conoce la función precisa de esta. Asimismo, y dada la dificultad del cultivo *in vitro* de TPA, comprobar si estas mutaciones afectan a la virulencia o a la capacidad de transmisión es todavía un reto.

Recientemente, Liu et al. han actualizado la lista de variantes del gen *tp0548*, renombrando algunas que habían sido publicadas en paralelo, denominadas con la misma letra. Esto ha conllevado que la secuencia “z” haya sido redefinida como secuencia “al” [144].

Según los resultados obtenidos mediante el método ECDCT, el tipo predominante en Barcelona fue el 14d/g, detectado en un 27,4% (17/62) de las muestras, en concordancia con los datos disponibles en Europa [123]. La prevalencia de este tipo fue bastante similar en Ámsterdam (23%) [125], aunque inferior en comparación con los resultados de los demás estudios publicados previamente: Dublín (70%) [86]; Londres (80%) [145]; París (69%) [131]; Sídney (48%) [139]; Dinamarca (54%) [130]; Italia (40%) [109] y Manitoba (63%) [146].

El 14f/g fue el segundo tipo más prevalente (14,5%) en el presente trabajo. Según la revisión más reciente de la literatura, se han detectado casos esporádicos de este tipo, pero con baja prevalencia: Canadá (7%) [146]; Dinamarca (3,6%) [130]; Países Bajos (1%) [125] y Australia (0,5%) [139]; con la excepción de Cuba, donde fue el tipo más prevalente con un 39,7% [137].

En tercer lugar, se detectaron los tipos 14a/g, 14b/g y 14d/f, cada uno en un 8,1% (5/62) de las muestras. Los tipos 14a/g (Cuba 8% y Sudáfrica 10%) [137, 140] y 14b/g (Dinamarca 4%, Sídney y República Checa 6%) [130, 139, 147] no destacan especialmente en prevalencia a nivel mundial. En cambio, el 14d/f es el tipo predominante en diferentes localidades de América, Asia y África: Lima (43%) [148]; Buenos Aires (15%) [149]; República de Tuvá (91%) [150]; Osaka (71%) [124]; China (36-89%) [105, 151–153] y Sudáfrica (27%) [154]. En el presente estudio, el 14d/f se ha detectado en un porcentaje muy similar al descrito en Ámsterdam y Dublín (9% y 10%, respectivamente) [86, 125], mientras que en Dinamarca, Londres y París encontraron una frecuencia superior (18%, 20% y 27%, respectivamente) [130, 131, 145].

Tras revisar la literatura disponible hasta la fecha, los tipos 15f/g y 14f/al (previamente denominado como 14f/z) no han sido detectados antes en ningún estudio.

Gracias a los estudios de epidemiología molecular, no solo se ha comprobado el establecimiento de variantes predominantes en determinados lugares, sino que además se ha apreciado la introducción y desaparición de algunos tipos a lo largo del tiempo. De hecho, Marra et al. [86] estudiaron la evolución temporal de los tipos de TPA en Seattle durante diez años, observando un reemplazamiento del tipo 14d/f (predominante entre 2001 y 2004) por el 14d/g, que fue el más frecuente hasta el último año de estudio (2008). La introducción del tipo 14d/g coincidió, además, con un incremento en la incidencia de sífilis en Seattle [86]. Si bien la monitorización nos permite detectar los cambios en las cepas circulantes, la relación entre las variantes genéticas y la transmisibilidad debe interpretarse con cautela. En el caso de los tipos 14d/g y 14d/f, sabemos que las secuencias “g” y “f” del gen *tp0548* difieren entre ellas por dos mutaciones no sinónimas (cambio de guanina por adenina en las posiciones 154 y 158). Estas mutaciones se traducen, hipotéticamente, en el cambio de una glicina por una arginina y de una glicina por un ácido glutámico. Aunque podemos predecir la cadena de aminoácidos, todavía no se conoce con exactitud la funcionalidad de la proteína codificada por el gen *tp0548*, tal y como se ha mencionado antes. Por lo tanto, aún no es posible determinar si los cambios en la secuencia proteica pueden favorecer la evasión inmunológica y/o transmisibilidad de algunas variantes de TPA. Para profundizar en ello, son necesarios estudios adicionales que incluyan el análisis de la estructura final de la proteína, su función precisa y cómo interactúa con el medio.

Desde que se describió el método ECDCT, algunos tipos genéticos han sido asociados a determinadas manifestaciones clínicas de la sífilis. En dos estudios previos de nuestro grupo de investigación [155, 156], se pusieron en común los resultados de tipificación con las variables clínicas de los pacientes. Sin embargo, no se pudo encontrar ninguna asociación clara. Ese análisis tuvo como principal limitación que los grupos a comparar estaban poco representados, precisamente por haber obtenido una elevada diversidad de tipos ECDCT (n=21) en un número relativamente bajo de muestras (n=62) [155, 156].



No obstante, otros estudios sí que han podido determinar alguna correlación. Por ejemplo, según Sahi et al. [128], el 14d/g se asocia a un menor riesgo de padecer neurosífilis (determinado por test VDRL positivo en muestra de LCR). En cambio, el 14d/f parece tener un mayor neurotropismo o capacidad neuroinvasiva [86]. En 2005, investigadoras de la Universidad de Washington evidenciaron que existían diferentes presentaciones clínicas en función de las cepas inoculadas en conejos. En concreto, observaron que los conejos infectados con los subtipos 14a/a y 14d/f tenían un grado de neuroinvasión superior [86, 157]. En 2010, observaron que la mayoría de los pacientes con neurosífilis estaban infectados con el subtipo 14d/f [86]. En Sídney, Read et al. [139] también encontraron esta asociación, aunque el número de muestras no era suficientemente elevado como para sacar conclusiones firmes. Por ello, se necesitan más estudios que analicen la relación entre la predisposición para desarrollar neurosífilis según el tipo genético de TPA.

Por otro lado, en Japón, el tipo 14d/f se observó con mayor frecuencia en hombres y mujeres heterosexuales en comparación con los tipos no-14d/f, que se detectaron más entre HSH. Esto sugiere que la población de TPA es distinta en las diferentes redes sexuales [124, 158]. En nuestro estudio, el número de pacientes heterosexuales fue demasiado bajo para poder realizar un análisis estadístico. En otros trabajos se ha analizado la relación entre subtipos y la co-infección con VIH, con el fin de determinar otras redes de transmisión: mientras que los subtipos 14j y 14e fueron los más prevalentes entre pacientes VIH-positivos en Bélgica [159]; en Francia, Reino Unido y Dinamarca el más frecuente fue el 14d [130, 131, 145]. En Melbourne, los subtipos más frecuentes entre este colectivo fueron el 14e y el 14d [160] y en Sídney encontraron la misma proporción entre los 14d/g y los no-14d/g [139]. En ningún estudio se ha podido asociar un único subtipo o tipo a la población VIH-positiva, lo que parece indicar que la predominancia de algunos tipos entre pacientes VIH-positivos se correlaciona más con la distribución geográfica que con el propio estatus de VIH.

El sistema de tipificación MLST fue propuesto por Grillová et al. en 2018 [84] como una posible alternativa al sistema ECDCT. En el tercer trabajo de esta tesis se describieron 11 perfiles alélicos o haplotipos distintos entre las 63 muestras que pudieron ser completamente caracterizadas (TDI: 0,18). El haplotipo predominante fue el 1.3.1 (ST1), que se detectó en más de la mitad de las muestras (35/63; 55,6%). Este perfil también se ha descrito como el más prevalente y en porcentajes similares en los demás estudios realizados en Europa: Suiza y Francia (46%) [84], Francia (59,3%) [161], República Checa (41,2%) [126] y Países Bajos (42%) [127]. Además, también fue el perfil MLST más común en Cuba incluso con porcentajes superiores (81-87%) [107, 108]. Por el contrario, en la investigación realizada en Xiamen (China) no se detectó el 1.3.1 en ninguna de las 49 muestras analizadas [110]. Este haplotipo se ha asociado a la presencia de úlceras múltiples [107, 108] y a un menor riesgo de padecer neurosífilis [128].

El 1.1.1 (ST2) representa el segundo haplotipo más común en Barcelona (11%), con un porcentaje relativamente similar a los descritos previamente en Europa, aunque ligeramente inferior: Suiza y Francia (20%) [84], Francia (13,6%) [161], República Checa (14,7%) [126] y Países Bajos (19%) [127]. Si bien parece ser un haplotipo prevalente en nuestro continente, este fue detectado casualmente en Cuba (1-1,5%) [107, 108] y no se identificó en ninguna de las muestras de China [110].

El haplotipo 1.1.8 (ST3) es poco frecuente en Barcelona (6,3%) y en otras ciudades europeas, pero es el más común en Xiamen (85,7%) [110]. El único país europeo donde se ha observado un predominio del 1.1.8 es en la República Checa durante los años 2010 y 2011, donde además fue más prevalente en mujeres que en hombres [126]. Aun así, la prevalencia de este haplotipo fue disminuyendo a lo largo del tiempo, hasta su desaparición en 2016-2017. Este fue desplazado por el perfil 1.3.1 que se hizo predominante a partir de 2012-2013 [126].

Los demás haplotipos identificados en Barcelona fueron detectados con frecuencias bajas. Según la actualización más reciente de PubMLST [94], el 1.17.9 también ha sido identificado en Francia y Países Bajos; el 1.5.1 en Suiza; el 3.2.3 en Suiza, Francia, Países Bajos y China; y el 9.7.3 en Estados Unidos de América, Francia, República Checa y Países Bajos. Los perfiles 1.52.1, 1.54.8, 1.55.1 y 9.7.8 no habían sido identificados previamente y se les asignaron los secuenciotipos ST73, ST74, ST75 y ST76, respectivamente, en la plataforma PubMLST [94].

En definitiva, las diferencias de genotipos entre Europa, América y Asia sugieren que la circulación de cepas se mantiene en áreas geográficas específicas, mostrando redes de transmisión bastante definidas.

Mediante el análisis filogenético de las secuencias obtenidas con el método MLST, las variantes genéticas de este estudio se pudieron diferenciar en los dos clados principales de TPA: Nichols y SS14. La mayor parte de muestras caracterizadas (completa y parcialmente) correspondieron al complejo SS14 (92/109; 84,4%), mientras que solo un 4,6% pertenecieron al complejo Nichols. El 11% restante no se pudo clasificar en ningún grupo porque solo fueron caracterizadas según el gen *tp0705*, el cual no discrimina entre ambos complejos. De los 11 perfiles MLST completos identificados en 63 muestras, 8 correspondieron al clado SS14, representando el 92% (58/63) de las muestras. Los 3 perfiles restantes correspondieron al clado Nichols, obtenidos en el 8% (5/63) de las muestras. Este resultado es consistente con el 6-7% estimado de muestras clínicas pertenecientes al grupo Nichols a nivel mundial [53, 84, 108, 126, 149]. En alguna ocasión, se han detectado porcentajes superiores del grupo Nichols: Países Bajos (17%) [125], Taiwán (20,2%) [134], Perú (21,4%) [148], Argentina (26,8%) [149], Sudáfrica (32%) [154], o incluso el 100% de las 20 muestras analizadas por Marra et al. procedentes de Madagascar [86]. Sin embargo, y en consonancia con los resultados obtenidos en Barcelona, en la mayoría de países la prevalencia de muestras que se

agrupan en el clado SS14 se aproxima o supera el 90%: Francia [84, 131, 161], Portugal [162], Suiza [53, 84], Irlanda [86], Dinamarca [130], la República Checa [126, 163, 164], Reino Unido y Austria [53], Rusia [150], Cuba [108], los EUA [86], China [105, 110, 151, 152] y Australia [139].

Arora et al. [53] observaron en sus análisis filogenéticos que las muestras agrupadas en el grupo Nichols procedían en su mayoría de pacientes norteamericanos de entre 1912 y 1986. Por contra, hallaron un evidente predominio del grupo SS14 en las muestras clínicas más recientes (1951-2013), en concordancia con la revisión del párrafo anterior. Según los estudios de Arora et al. [53], la expansión de este linaje coincide con la introducción de los antibióticos para el tratamiento de la sífilis a mediados del siglo pasado. De hecho, a diferencia del clado Nichols, el SS14 está fuertemente vinculado a la presencia de mutaciones de resistencia a macrólidos. Esto podría sugerir que la aparición de dichas mutaciones, junto con la presión selectiva ejercida por el tratamiento con azitromicina, sean la causa de la rápida y gran propagación de las cepas pertenecientes al grupo SS14. En ese estudio, las muestras procedentes del siglo pasado habían sido inoculadas en conejos antes de ser secuenciadas. De ahí que Smajs et al. [49] propusieran, como hipótesis alternativa, que la aparente dominancia de Nichols podría deberse en realidad a diferencias en la infectividad de las cepas en conejos y el ser humano. Sin embargo, los estudios genómicos más recientes de Beale et al. [166] demuestran la predominancia del clado Nichols en el siglo XX y que las cepas que circulaban antes de 1980 no son las que circulan actualmente. El cambio en la filogenia de TPA parece estar vinculado a la disminución de la incidencia de la sífilis durante la crisis del VIH (años 1980-1990), un cuello de botella generado, posiblemente, por el aumento de medidas preventivas, la profilaxis con antimicrobianos en población de riesgo e incluso por la mortalidad por VIH. La subsiguiente expansión de las cepas del clado SS14 seleccionadas en ese periodo se atribuye a tres posibles factores. Por un lado, el propio resurgimiento de la sífilis sufrido en las dos últimas décadas, asociado

a un incremento del riesgo durante las relaciones sexuales. Por otro lado, la adquisición de mecanismos de TPA aún desconocidos que favorezcan una mayor transmisibilidad. Y por último, y como se ha mencionado antes, la presencia de mutaciones de resistencia a macrólidos, junto con la presión selectiva ejercida por el tratamiento con azitromicina para la sífilis y para otras ITS [165, 166].

### Análisis de muestras pareadas en un mismo paciente

Está descrito que, en aproximadamente un 25% de los casos, los pacientes pueden presentar un solapamiento entre las manifestaciones clínicas típicas de sífilis primaria y de sífilis secundaria [16]. En el presente estudio, se pudieron recoger muestras pareadas de úlcera genital y de sangre total en 28 pacientes diagnosticados de sífilis secundaria que mantenían el chancro primario. En 11 de ellos, se pudieron comparar los resultados de tipificación de las dos muestras (por ECDCT, MLST o ambos). En 9 pacientes, los resultados fueron concordantes, pero en dos pacientes los resultados parciales obtenidos por ECDCT en úlcera y sangre fueron distintos. No se pudieron obtener resultados del MLST en las muestras de estos dos casos, por lo que no pudieron ser comparadas por este método. En el primer caso, se identificó la secuencia *tp0548* “f” en la úlcera genital y “g” en la sangre. Estas dos secuencias pertenecen al clado SS14 y se diferencian por 2 mutaciones no sinónimas. En el segundo caso, se identificó la secuencia *tp0548* “d” en la úlcera y la secuencia “g” en la sangre. La secuencia “d” se agrupa en el clado Nichols mientras que la secuencia “g” pertenece al SS14, diferenciándose por un codón y por 9 mutaciones simples (7 cambios a nivel de la cadena aminoacídica).

La estabilidad de los loci del método CDC (*arp* y *tpr*) fue cuestionada por Mikalová et al. [147] tras encontrar subtipos diferentes en muestras de un mismo paciente. Sin embargo, el presente estudio es el primero en detectar diferentes secuencias del gen *tp0548* en muestras pareadas en dos pacientes. Dicho hallazgo podría explicarse por fenómenos de variabilidad intra-aislado durante la infección. Esta hipótesis es poco plausible teniendo en cuenta que la estabilidad del gen *tp0548* ha sido demostrada en varias ocasiones [84, 86, 167] y que la tasa de mutación en TPA es relativamente baja [168]. Otra posible hipótesis es la coexistencia de dos subpoblaciones de TPA en el mismo organismo hospedador, bien sea por una coinfección inicial o por una reinfección. El hecho de identificar la misma secuencia (g) en las muestras de sangre podría sugerir una mejor diseminación de esta variante gracias a un mayor tropismo por el endotelio vascular y/o una mejor capacidad de evasión del sistema inmunitario [147]. Más allá de las posibles especulaciones, actualmente no disponemos de herramientas que nos permitan esclarecer si estos hallazgos corresponden a coinfecciones de dos subpoblaciones, o a fenómenos de inestabilidad genética y la consecuente variabilidad intra-aislado (aunque poco probable).

## Comparativa de los métodos ECDCT y MLST

El poder de discriminación es uno de los factores más importantes a la hora de escoger un método de tipificación. Según los autores del MLST, este método es el que presenta mayor poder discriminatorio en comparación con los demás sistemas [84, 93]. En el presente estudio, se obtuvieron 21 tipos diferentes por ECDCT (TDI: 0,3) frente los 11 haplotipos identificados por MLST (TDI: 0,18), revelando una mayor diversidad genética de TPA con el método ECDCT. Tal como reflejan nuestros resultados, así como los descritos por Liu et al. [110] y Sahi et al. [128], el método ECDCT muestra una mayor capacidad de discriminación. Estos resultados son sorprendentes considerando que la

región analizada del gen *tp0548* (compartido por ambos métodos) es más extensa en el MLST que en el ECDCT (810 bp vs 83 pb). Acorde a lo esperado, se identificaron más variantes del gen *tp0548* mediante el MLST que con el ECDCT. Sin embargo, el gen *tpr* fue el que presentó una mayor diversidad, lo que llevó a obtener, globalmente, más tipos completos de ECDCT que de MLST. Cabe indicar que el análisis de los resultados de la caracterización del gen *tpr* (patrones de restricción) puede resultar más complicado (especialmente en casos con baja resolución). Además, su interpretación es más subjetiva que en la de los demás loci, implicando una cierta variación dependiente del observador.

Por otro lado, la ausencia de una base de datos pública e internacional como PubMLST [93, 94] para el sistema ECDCT supone una limitación importante para este método. Dado que la única manera de comunicar o acceder a la información de tipificación es mediante los trabajos publicados en revistas científicas, es difícil disponer de los datos más actualizados. Esto, a su vez, favorece la superposición en la denominación de nuevas variantes, como ha ocurrido con la secuencia “z” o “al” del gen *tp0548*, descrita en el primer artículo de esta tesis [169].

Los dos clados principales de TPA (SS14 y Nichols) y las diferentes subespecies de *Treponema pallidum* (TPE, TEN y TPA) pueden diferenciarse mediante análisis filogenéticos. Esto es muy relevante ya que, tal como se ha mencionado anteriormente, el pian (TPE), el bejel (TEN) y la sífilis venérea (TPA) pueden mostrar manifestaciones clínicas solapadas y son indistinguibles por serología. Por ello, el diagnóstico final se basa en la combinación de los resultados serológicos, la sintomatología y el contexto geográfico. Teniendo en cuenta que, debido a la globalización, la información geográfica puede no ser un factor determinante, el uso de estas técnicas moleculares resulta una herramienta muy útil para poder establecer un diagnóstico final correcto. De hecho, se han detectado casos de bejel o pian por secuenciación en París, Cuba, Japón y

Sudáfrica, en pacientes que habían sido inicialmente diagnosticados de sífilis [158, 170, 171]. Tanto los resultados obtenidos mediante ECDCT como MLST admiten la realización de un estudio filogenético general. No obstante, el MLST permite llevar a cabo un análisis más detallado y exhaustivo ya que se pueden incluir las secuencias de sus tres componentes, mientras que con el ECDCT únicamente se dispone de la secuencia del gen *tp0548*, cuyo fragmento es además mucho más corto.

### Estudio de mutaciones de resistencia antimicrobiana

La penicilina sigue siendo el antibiótico de elección para el tratamiento de la sífilis desde su introducción en 1943. Durante muchos años, la azitromicina y la doxicilina han sido los antibióticos de segunda línea en pacientes alérgicos a betalactámicos o que rehúsan la vía parenteral como vía de administración. La azitromicina es una alternativa para el tratamiento de la sífilis, ya que alcanza niveles elevados en los distintos tejidos y presenta una vida media larga. Sin embargo, ha dejado de ser una opción terapéutica debido a la elevada tasa de fracasos terapéuticos documentados, secundarios a mutaciones en las posiciones 2058 y 2059 del gen ARNr 23S de TPA [96, 97]. De hecho, en la última década se han descrito tasas de mutaciones de resistencia alarmantemente elevadas en muchas regiones del planeta, algunas incluso alcanzan el 100% [172].

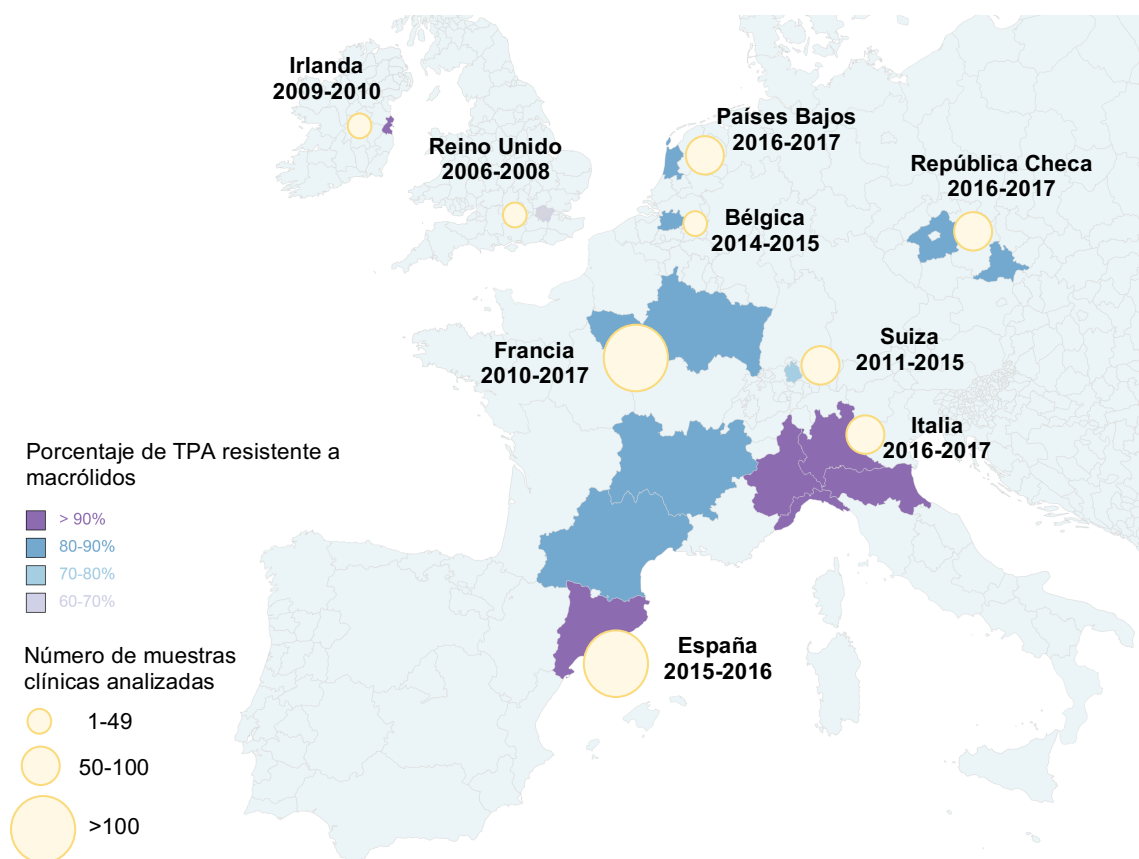
En el segundo trabajo de esta tesis, se identificaron mutaciones asociadas a resistencia a macrólidos en 112 de 118 (94%) muestras clínicas. En 111 muestras, se detectó la mutación A→G en la posición 2058, y solo una muestra presentó dicha mutación en la posición 2059. Acorde con lo previamente descrito, la mutación A2059G es significativamente menos frecuente, y se especula que presenta un mayor coste de *fitness* biológico que la mutación A2058G [126, 173].



Se han descrito tasas de resistencia a macrólidos muy variables en todo el planeta. Por ejemplo, en Taiwán, Rusia, Madagascar, Sudáfrica, Lesoto, Argentina y Perú las tasas varían entre 0-23% [148, 149, 154, 172], mientras que en EUA, Canadá, Cuba, Europa, China, Japón y Australia superan el 80% [53, 84, 106–110, 124, 126, 146, 159, 161, 172]. En general, la incidencia de estas mutaciones va aumentando a lo largo del tiempo, tal y como demuestran los estudios en los que se han estudiado muestras clínicas recogidas en diferentes periodos [126, 154, 172].

Según nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se estudia la prevalencia de mutaciones en TPA que confieren resistencia a macrólidos en España. Además, es el segundo trabajo a nivel Europeo en cuanto a número de muestras clínicas analizadas. Según los datos obtenidos en la presente investigación, España es uno de los países europeos con tasas más elevadas de resistencia a macrólidos (94%), junto con Italia [109] e Irlanda [174], seguidos de Francia [84, 106, 161], Bélgica [159], Países Bajos [125] y la República Checa [126] (**figura 12**).

En este estudio, todas las muestras pertenecientes a los subtipos 14d/g y 14f/g, así como las del haplotipo 1.3.1 contenían la mutación A2058G. También el 97% (86/89) de las muestras agrupadas en el complejo SS14 eran resistentes a macrólidos, frente al 60% (3/5) de las muestras del clado Nichols (valor  $p < 0,05$ ). Tal y como se ha mencionado anteriormente en esta tesis, esta asociación se ha observado en numerosas ocasiones [53, 84, 107, 108, 110, 126, 139, 161]. Aunque dichas mutaciones no son específicas de un variante genética o linaje en particular (también se han detectado en variantes frecuentes como el 1.1.1 o en el clado Nichols), es probable que hayan contribuido a la selección y expansión de determinadas cepas y grupos genéticos [53, 165, 166].



**Figura 12.** Porcentaje de *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* resistente a macrólidos (según la presencia de mutaciones en el gen ARNr 23S) en Europa. El porcentaje se representa en colores, y el número de muestras clínicas analizadas por tamaño del círculo. Las referencias utilizadas para la elaboración de la figura se detallan a continuación: Reino Unido (Londres) [145]; Irlanda (Dublín) [174]; Bélgica (Amberes) [159]; Italia (Turín, Boloña, Milán y Génova) [109]; Suiza (Zúrich y Ginebra) [84]; Francia (París y Lyon) [84], (París, Marsella y Thionville) [161], (Paris y Marsella) [106]; República Checa (Praga y Brno) [126]; Países Bajos (Ámsterdam) [125]. Elaboración propia.

Si bien la azitromicina ya no está recomendada para el tratamiento de la sífilis, es un antibiótico ampliamente utilizado, especialmente para tratar otras ITS. Según los estudios genómicos de Beale et al. [165], las cepas resistentes que circulan actualmente procederían de diferentes sub-linajes sensibles que han evolucionado de forma independiente hacia el desarrollo de mutaciones de resistencia. Así, la expansión de la

resistencia a macrólidos parece estar sujeta a periodos intermitentes de presión antibiótica en que se han ido seleccionando las distintas cepas que circulan hoy en día [53, 165, 166]. Beale et al. [165] también observaron que los diferentes linajes resistentes se mantenían estables en el tiempo, sin identificar reversiones hacia el gen salvaje, lo cual sugiere que dichas mutaciones no afectan negativamente al *fitness* biológico de TPA.

La doxiciclina sigue siendo una alternativa terapéutica por su eficacia, ya que ha demostrado altas tasas de curación clínica y serológica. Gracias a los últimos avances en el cultivo *in vitro* de TPA, el grupo de Edmondson et al. [175] pudo evaluar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida de la doxiciclina. Los resultados que obtuvieron en ese estudio refuerzan que este antibiótico es un tratamiento eficaz para la sífilis precoz. Sin embargo, el uso generalizado de este antibiótico puede derivar en la aparición de mecanismos de resistencia en TPA, como ha ocurrido con los macrólidos.

Se sabe que la disminución de sensibilidad a tetraciclinas en otras bacterias como *Helicobacter pylori* y *Propionibacterium acnes* está asociada a mutaciones en el codón 965-967 y en las posiciones 939 y 1058 del gen ARNr 16S [102, 103, 176], lo cual sugiere la posible aparición de estas mutaciones en TPA. Según nuestro conocimiento, este es el primer trabajo en España en el que se estudian mutaciones en TPA que puedan conferir resistencia a las tetraciclinas. No se detectó ninguna de estas mutaciones en las 108 muestras que se pudieron analizar. Junto con nuestro trabajo, existen 7 estudios más que demuestran la ausencia de mutaciones en el gen ARNr 16S, en un total de 894 muestras clínicas originarias de diferentes continentes: Shandong (China) (438 muestras) [104]; Hunan (China) (158 muestras) [105]; Francia (127 muestras) [106]; Cuba (82 muestras) [107, 108]; Italia (53 muestras) [109]; y Xiamen (China) (36 muestras) [110].

En la era actual de las bacterias multi-resistentes, estos datos son tranquilizadores y esperanzadores. Aun así, es importante seguir con la vigilancia epidemiológica y la búsqueda de mecanismos que confieran resistencias antibióticas. Una detección temprana de cualquier indicio de resistencia de TPA podría incluso evitar la aparición de nuevos fracasos terapéuticos.



# 6

## CONCLUSIONES

---



## 6. CONCLUSIONES

---

1. La muestra de exudado de úlcera genital presenta un mayor rendimiento que la muestra de sangre, tanto en la técnica de PCR utilizada para la detección de TPA como en las técnicas de caracterización molecular.
2. En general, el rendimiento de tipificación de los métodos ECDCT y MLST es similar. En las muestras de úlcera genital no hubo diferencias entre ambos métodos, sin embargo, en las muestras de sangre el rendimiento del MLST fue superior al del método ECDCT.
3. El método ECDCT reveló 21 tipos diferentes en 62 muestras de úlcera caracterizadas completamente (índice de diversidad de tipos del 0,3), mostrando una mayor capacidad discriminativa que el esquema de tipificación MLST, con el que se identificaron 11 perfiles genéticos diferentes en 63 muestras (índice de diversidad de tipos del 0,18).
4. Según el método ECDCT, los tipos predominantes en Barcelona fueron el 14d/g (27%) y el 14f/g (14,5%). Mediante el método MLST, el haplotipo 1.3.1 se identificó como el más prevalente, detectándose en más de la mitad de las muestras (56%), seguido del 1.1.1 (11%). Estos datos coinciden, en general, con las variantes genéticas de TPA circulantes descritas a nivel europeo.
5. Este es el primer estudio en el que se han identificado secuencias distintas del gen *tp0548* en muestras pareadas (úlcera genital y sangre) de un mismo paciente. Sin embargo, no disponemos de herramientas que nos permitan dilucidar si las diferentes secuencias identificadas corresponden a una coinfección de dos subpoblaciones de TPA, o bien (aunque poco probable) a fenómenos de inestabilidad genética.



6. La mayor parte de las muestras caracterizadas completamente por MLST fueron agrupadas en el clado SS14 (92%), mientras que solo el 8% se agrupó en el clado Nichols. Los resultados del presente estudio son consistentes con el porcentaje estimado de cepas circulantes que pertenecen al clado Nichols a nivel global.
7. Tanto el ECDCT como el MLST son métodos útiles para la tipificación molecular de TPA. Si bien el ECDCT presenta un mayor poder discriminativo, las técnicas empleadas en el MLST son más robustas y objetivas. Además, existe una base de datos pública en la plataforma PubMLST que permite compartir y acceder a datos internacionales y recientes sobre la tipificación por MLST de TPA.
8. La ausencia de una base de datos pública para unificar la información del método ECDCT puede llevar a la duplicidad en la denominación de nuevas variantes genéticas de TPA. Por este motivo, la variante del gen *tp0548* “z”, descrita en el primer trabajo, ha tenido que ser renombrada recientemente como “al”.
9. El 94% de las 118 muestras clínicas analizadas en Barcelona presentaron mutaciones que confieren resistencia a macrólidos, reforzando que la azitromicina no es un antibiótico recomendable para el tratamiento actual de la sífilis. Además, se ha asociado la presencia de estas mutaciones a las variantes genéticas más prevalentes.
10. No se identificaron mutaciones en la región analizada del gen ARNr 16S de TPA en 108 muestras clínicas analizadas. La ausencia de mutaciones, demostrada en todos los estudios publicados hasta la fecha, sugiere que no circulan cepas de TPA resistentes a tetraciclinas.





# 7

## PERSPECTIVAS DE FUTURO

---



## 7. PRESPECTIVAS DE FUTURO

---

Esta tesis contribuye a ampliar el conocimiento relativo a la epidemiología molecular de TPA, aportando los primeros datos procedentes de España. A pesar de que se han realizado un sinfín de investigaciones enfocadas en el estudio de TPA, todavía son muchos los interrogantes por resolver respecto a este patógeno. A raíz de los trabajos realizados en el contexto de esta tesis doctoral se plantean las siguientes líneas de investigación:

- Relacionar los resultados de tipificación por MLST con las variables clínicas de los pacientes incluidos en este estudio con el fin de establecer posibles asociaciones entre la clínica y algún haplotipo en particular.
- Aplicar los dos métodos de tipificación (ECDCT y MLST) en muestras clínicas más actuales para estudiar cambios en la dinámica poblacional de las cepas de TPA circulantes en Barcelona.
- Realizar estudios de tipificación en muestras clínicas en que los grupos no-HSH (bisexuales, hombres heterosexuales, mujeres heterosexuales y transexuales) estén más representados, con el objetivo de identificar patrones y redes de transmisión. No obstante, hay que considerar que es complicado obtener un número de muestras representativo ya que la sífilis afecta sobre todo a HSH.
- Desarrollar un esquema de tipificación que unifique las ventajas de los métodos descritos hasta la fecha, es decir, que sea robusto e independiente del observador y que, a su vez, presente un gran poder discriminativo. Técnicas de tipificación altamente discriminativas y robustas pueden aportar información clínica útil. Por

ejemplo, en casos en los que no hay una cura serológica clara y se desconoce si se trata de un fracaso terapéutico o de una reinfección.

En términos generales, es fundamental insistir en las estrategias de prevención y el manejo de la sífilis para frenar su transmisión, así como la de las demás ITS. Para ello, es imprescindible la concienciación de la población en adoptar las medidas higiénico-preventivas necesarias para minimizar el riesgo durante las prácticas sexuales, así como reforzar los cribados poblacionales, enfocados especialmente en colectivos de riesgo.

Además, los avances en las técnicas de secuenciación masiva y en el cultivo *in vitro* abren las puertas a diferentes líneas de investigación. Entre ellas, el rastreo de mecanismos de resistencia antimicrobiana (estudios genotípicos y fenotípicos), el ensayo de tratamientos alternativos a los actuales y la búsqueda de una vacuna efectiva.

# 8

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---





## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Tudor ME, Al Aboud AM, Gossman WG. *Syphilis*. StatPearls Publishing, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534780/> (2021).
2. World Health Organisation. More than 1 million new curable sexually transmitted infections every day, <https://www.who.int/news/item/06-06-2019-more-than-1-million-new-curable-sexually-transmitted-infections-every-day> (2019).
3. López de Munain J. Epidemiología y control actual de las infecciones de transmisión sexual. Papel de las unidades de ITS. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2019; 37: 45-49.
4. Ros-Vivancos C, González-Hernández M, Navarro-Gracia JF, et al. Evolution of treatment of syphilis through history. *Rev Española Quimioter* 2018; 31: 485-492.
5. Harper KN, Zuckerman MK, Harper ML, et al. The origin and antiquity of syphilis revisited: An Appraisal of Old World pre-Columbian evidence for Treponemal infection. *Am J Phys Anthropol* 2011; 146: 99-133.
6. Baker BJ, Crane-Kramer G, Dee MW, et al. Advancing the understanding of Treponemal disease in the past and present. *Am J Phys Anthropol* 2020; 171: 5-41.
7. Berdasquera Corcho D, Lazo Álvarez MÁ, Galindo Santana, Belkys María Gala González A. Sífilis: pasado y presente. *Rev Cubana Hig Epidemiol*; 42.
8. Medina-De la Garza CE, Koschwitz, Martina-Christine Velasco-Castañón JG. Fritz Schaudinn: zoólogo y protozoólogo. *Med Univ* 2012; 14: 231-238.
9. Bialynicki-Birula R. The 100th anniversary of Wassermann-Neisser-Bruck reaction. *Clin Dermatol* 2008; 26: 79-88.
10. Frith J. Syphilis - Its early history and treatment until penicillin, and the debate on its origins. *J Mil Veterans Health* 2012; 20: 49-58.
11. World Health Organisation. Global adult estimates of chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis including maternal and congenital syphilis, 2016.
12. European Center for Disease Prevention and Control. *Syphilis Annual Epidemiological Report for 2018*. Stockholm, <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/syphilis-annual-epidemiological-report-2018> (2020).
13. Unidad de vigilancia de VIH ITS y hepatitis B y C. *Vigilancia epidemiológica de las infecciones de transmisión sexual, 2019*. Madrid, 2021.

14. Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les Infeccions de Transmissió Sexual i Sida de Catalunya (CEEISCAT). *Vigilància epidemiològica de les Infeccions de Transmissió Sexual (ITS) a Catalunya. Informe anual 2019*. Badalona: CEEISCAT, 2020.
15. Agència de Salut Pública de Barcelona (ASPB). *Morbiditat per malalties de declaració obligatòria a la ciutat de Barcelona, 2016*. Barcelona: ASPB, 2019.
16. Arando M, Guerra O. Sífilis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2019; 37: 398-404.
17. Arando M. *La reemergència de la sífilis en Barcelona*. Universitat Autònoma de Barcelona, 2019.
18. Norris SJ, Paster BJ, Moter A, et al. The Genus *Treponema*. En: *The Prokaryotes*. Springer New York, 2006, pp. 211-234.
19. Šmajš D, Strouhal M. Uncultivable Pathogenic Treponemes. En: *Molecular Medical Microbiology: Second Edition*. Elsevier Ltd, 2014, pp. 1421-1436.
20. Giacani L, Lukehart SA. The endemic Treponematoses. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27: 89-115.
21. Marks M, Solomon AW, Mabey DC. Endemic Treponemal diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2014; 108: 601-607.
22. World Health Organisation. Pian, <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/yaws> (2021).
23. Izard J, Renken C, Hsieh CE, et al. Cryo-electron tomography elucidates the molecular architecture of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *J Bacteriol* 2009; 191: 7566-7580.
24. Liu J, Howell JK, Bradley SD, et al. Cellular Architecture of *Treponema pallidum*: Novel Flagellum, Periplasmic Cone, and Cell Envelope as Revealed by Cryo Electron Tomography. *J Mol Biol* 2010; 403: 546-561.
25. Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science* 1998; 281: 375-388.
26. Radolf JD, Robinson EJ, Bourell KW, et al. Characterization of outer membranes isolated from *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Infect Immun* 1995; 63: 4244-4252.
27. Hardy PH, Levin J. Lack of Endotoxin in *Borrelia hispanica* and *Treponema pallidum*. *Proc Soc Exp Biol Med* 1983; 174: 47-52.
28. Stamm L V., Hodinka RL, Wyrick PB, et al. Changes in the cell surface properties of *Treponema pallidum* that occur during in vitro incubation of freshly extracted organisms. *Infect Immun* 1987; 55: 2255-2261.

29. Cox DL, Akins DR, Porcella SF, et al. *Treponema pallidum* in gel microdroplets: a novel strategy for investigation of Treponemal molecular architecture. *Mol Microbiol* 1995; 15: 1151-1164.
30. Radolf JD, Deka RK, Anand A, et al. *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete: making a living as a stealth pathogen HHS Public Access. *Nat Rev Microbiol* 2016; 14: 744-759.
31. Cox DL, Chang P, McDowall AW, et al. The outer membrane, not a coat of host proteins, limits antigenicity of virulent *Treponema pallidum*. *Infect Immun* 1992; 60: 1076-1083.
32. Harman M, Vig DK, Radolf JD, et al. Viscous dynamics of lyme disease and syphilis spirochetes reveal flagellar torque and drag. *Biophys J* 2013; 105: 2273-2280.
33. Deka RK, Liu WZ, Norgard M V., et al. Biophysical and biochemical characterization of tp0037, a d-lactate dehydrogenase, supports an acetogenic energy conservation pathway in *Treponema pallidum*. *MBio* 2020; 11: 1-17.
34. Radolf JD. Chapter 36 *Treponema*. En: *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996, pp. 1-15.
35. Edmondson DG, Hu B, Norris SJ. Long-term in vitro culture of the syphilis spirochete *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *MBio* 2018; 9: e01153-18.
36. Lafond RE, Lukehart SA. Biological Basis for Syphilis. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 29-49.
37. Cox DL, Riley B, Chang P, et al. Effects of molecular oxygen, oxidation-reduction potential, and antioxidants upon in vitro replication of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 3063-3072.
38. Hazlett KRO, Cox DL, Sikkink RA, et al. Contribution of neelaredoxin to oxygen tolerance by *Treponema pallidum*. *Methods Enzymol* 2002; 353: 140-156.
39. Lombard M, Touati D, Fontecave M, et al. Superoxide reductase as a unique defense system against superoxide stress in the microaerophile *Treponema pallidum*. *J Biol Chem* 2000; 275: 27021-27026.
40. Jovanović T, Ascenso C, Hazlett KRO, et al. Neelaredoxin, an iron-binding protein from the syphilis spirochete, *Treponema pallidum*, is a superoxide reductase. *J Biol Chem* 2000; 275: 28439-28448.
41. Cumberland M, Turner T. The rate of multiplication of *Treponema pallidum* in normal and immune rabbits - PubMed. *Am J Syph Gonorrhoea Vener Dis* 1949; 33: 201-12.
42. Peeling RW, Mabey D, Kamb ML, et al. Syphilis. *Nat Rev Dis Prim*; 3. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1038/nrdp.2017.73.

43. Edmondson DG, Norris SJ. In Vitro Cultivation of the Syphilis Spirochete *Treponema pallidum*. *Curr Protoc* 2021; 1: e44.
44. Klein JR, Monjan AA, Hardy PH, et al. Abrogation of genetically controlled resistance of mice to *Treponema pallidum* by irradiation [13]. *Nature* 1980; 283: 572-574.
45. Folds JD, Rauchbach AS, Shores E, et al. Evaluation of the Inbred Mouse as a Model for Experimental *Treponema pallidum* Infection. *Scand J Immunol* 1983; 18: 201-206.
46. Lu S, Zheng K, Wang J, et al. Characterization of *Treponema pallidum* Dissemination in C57BL/6 Mice. *Front Immunol* 2021; 8: 577129.
47. Lukehart SA, Marra CM. Isolation and Laboratory Maintenance of *Treponema pallidum*. *Curr Protoc Microbiol* 2007; A.1.1-12A.1.18.
48. Šmajš D, Norris SJ, Weinstock GM. Genetic diversity in *Treponema pallidum*: Implications for pathogenesis, evolution and molecular diagnostics of syphilis and yaws. *Infection, Genetics and Evolution* 2012; 12: 191-202.
49. Šmajš D, Strouhal M, Knauf S. Genetics of human and animal uncultivable Treponemal pathogens. *Infect Genet Evol* 2018; 61: 92-107.
50. Jaiswal AK, Tiwari S, Jamal SB, et al. The pan-genome of *Treponema pallidum* reveals differences in genome plasticity between subspecies related to venereal and non-venereal syphilis. *BMC Genomics*; 21. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.1186/s12864-019-6430-6.
51. Pětrošová H, Zobaníková Matejková DC, et al. Whole Genome Sequence of *Treponema pallidum* ssp. *pallidum*, Strain Mexico A, Suggests Recombination between Yaws and Syphilis Strains. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6: e1832.
52. Štaudová B, Strouhal M, Zobaníková M, et al. Whole Genome Sequence of the *Treponema pallidum* subsp. *endemicum* Strain Bosnia A: The Genome Is Related to Yaws Treponemes but Contains Few Loci Similar to Syphilis Treponemes. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8: e3261.
53. Arora N, Schuenemann VJ, Jäger G, et al. Origin of modern syphilis and emergence of a pandemic *Treponema pallidum* cluster. *Nat Microbiol* 2016; 5: 16245.
54. Mikalová L, Strouhal M, Oppelt J, et al. Human *Treponema pallidum* 11q/j isolate belongs to subsp. *endemicum* but contains two loci with a sequence in TP0548 and TP0488 similar to subsp. *pertenue* and subsp. *pallidum*, respectively. *PLoS Negl Trop Dis* 2017; 11: e0005434.

55. Radolf JD, Kumar S. The *Treponema pallidum* outer membrane. En: *Spirochete Biology: The Post Genomic Era. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Verlag, 2018, pp. 1-38.
56. Chen X, Zhao M, Qu H. Cellular Metabolic Network Analysis: Discovering Important Reactions in *Treponema pallidum*. *Biomed Res Int*. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.1155/2015/328568.
57. Brautigam CA, Deka RK, Liu WZ, et al. The Tp0684 (MgIB-2) Lipoprotein of *Treponema pallidum*: A Glucose-Binding Protein with Divergent Topology. *PLoS One* 2016; 11: e0161022.
58. Rosahn P, Rowe C. Experimental mouse syphilis; minimal infectious number of *Treponema pallidum* - PubMed. *Am J Syph Gonorrhea Vener Dis* 1950; 34: 40-4.
59. Cameron CE, Brouwer NL, Tisch LM, et al. Defining the interaction of the *Treponema pallidum* adhesin Tp0751 with laminin. *Infect Immun* 2005; 73: 7485-7494.
60. Parker ML, Houston S, Pětrošová H, et al. The Structure of *Treponema pallidum* Tp0751 (Pallilysin) Reveals a Non-canonical Lipocalin Fold That Mediates Adhesion to Extracellular Matrix Components and Interactions with Host Cells. *PLoS Pathog* 2016; 12: e1005919.
61. Houston S, Hof R, Honeyman L, et al. Activation and Proteolytic Activity of the *Treponema pallidum* Metalloprotease, Pallilysin. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002822.
62. Lithgow K V., Church B, Gomez A, et al. Identification of the Neuroinvasive Pathogen Host Target, LamR, as an Endothelial Receptor for the *Treponema pallidum* Adhesin Tp0751. *mSphere* 2020; 5: e00195-20.
63. Radolf JD. Role of outer membrane architecture in immune evasion by *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi*. *Trends in Microbiology* 1994; 2: 307-311.
64. Gherardini F, Boylan J, Brett P. *Pathogenic Treponema: Molecular and Cellular Biology*. Norfolk: Caister Academic Press, 2006. Epub ahead of print 2006. DOI: 10.21775/9781910190678.
65. Salazar JC, Hazlett KRO, Radolf JD. The immune response to infection with *Treponema pallidum*, the stealth pathogen. *Microbes Infect* 2002; 4: 1133-1140.
66. Moore MW, Cruz AR, LaVake CJ, et al. Phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum* potentiates innate immune activation and induces gamma interferon production. *Infect Immun* 2007; 75: 2046-2062.
67. Salazar JC, Cruz AR, Pope CD, et al. *Treponema pallidum* elicits innate and adaptive cellular immune responses in skin and blood during secondary syphilis: A flow-cytometric analysis. *J Infect Dis* 2007; 195: 879-887.

68. Cruz AR, Ramirez LG, Zuluaga A V., et al. Immune evasion and recognition of the syphilis spirochete in blood and skin of secondary syphilis patients: Two immunologically distinct compartments. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6: e1717.
69. Hawley KL, Cruz AR, Benjamin SJ, et al. IFN $\gamma$  enhances CD64-potentiated phagocytosis of *Treponema pallidum* opsonized with human syphilitic serum by human macrophages. *Front Immunol* 2017; 8: 1227.
70. Stary G, Klein I, Brügggen MC, et al. Host defense mechanisms in secondary syphilitic lesions: A role for IFN- $\gamma$ -/IL-17-producing CD8+ T cells? *Am J Pathol* 2010; 177: 2421-2432.
71. Singh A, Romanowski B. Syphilis: review with emphasis on clinical, epidemiologic, and some biologic features - PubMed. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 187-209.
72. O'Byrne P, Macpherson P. Syphilis. *BMJ*; 365. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1136/bmj.l4159.
73. European Center for Disease Prevention and Control. *Syphilis and congenital syphilis in Europe - A review of epidemiological trends (2007–2018) and options for response*. Stockholm: ECDC, 2019.
74. World Health Organisation. *WHO Guidelines for the treatment of Treponema pallidum (syphilis)*, <http://www.who.int> (2016).
75. Janier M, Unemo M, Dupin N, et al. 2020 European guideline on the management of syphilis. *J Eur Acad Dermatology Venereol* 2021; 35: 574-588.
76. French P. Syphilis. *Br Med J* 2007; 334: 143-147.
77. Nyatsanza F, Tipple C. Syphilis: Presentations in general medicine. *Clin Med J R Coll Physicians London* 2016; 16: 184-188.
78. Baughn RE, Musher DM. Secondary syphilitic lesions. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 205-216.
79. Galán-Montemayor J, Lepe-Jiménez J, Otero-Guerra L, et al. *Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales*. 2018. 24a ed. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), 2018.
80. Guerra LO, Valdés FV. Molecular diagnostic of syphilis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2020; 38: 7-11.
81. Theel ES, Katz SS, Pillay A. Molecular and Direct Detection Tests for *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*: A Review of the Literature, 1964–2017. *Clin Infect Dis An Off Publ Infect Dis Soc Am* 2020; 71: S4.
82. Ortiz DA, Shukla MR, Loeffelholz MJ. The Traditional or Reverse Algorithm for Diagnosis of Syphilis: Pros and Cons. *Clin Infect Dis* 2020; 71: S43-S51.

83. Grupo de expertos del grupo de estudio de sida de la SEIMC (GESIDA), Secretaria del Plan Nacional sobre el sida (SPNS), Grupo de Estudio de ITS de la SEIMC (GEITS) GE para la investigación de las enfermedades de transmisión sexual de la AE de D y V y S española de IP (SEIP). Consensus document on the diagnosis and treatment of sexually transmitted diseases in adults, children and adolescents - ClinicalKey. *Enfermedades Infecc y Microbiol Clínica* 2018; 36: 576-585.
84. Grillová L, Bawa T, Mikalová L, et al. Molecular characterization of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Switzerland and France with a new multilocus sequence typing scheme. *PLoS One* 2018; 13: e0200773.
85. Pillay A, Liu H, Chen CY, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. *Sex Transm Dis* 1998; 25: 408-414.
86. Marra CM, Sahi SK, Tantaló LC, et al. Enhanced molecular typing of *Treponema pallidum*: geographical distribution of strain types and association with neurosyphilis. *J Infect Dis* 2010; 202: 1380-1388.
87. Flasarová M, Smajs D, Matejková P, et al. Molecular detection and subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in clinical specimens. *Epidemiol Mikrobiol Immunol* 2006; 55: 105-111.
88. Katz KA, Pillay A, Ahrens K, et al. Molecular Epidemiology of Syphilis—San Francisco, 2004–2007. *Sex Transm Dis* 2010; 37: 1.
89. Liu H, Rodes B, George R, et al. Molecular characterization and analysis of a gene encoding the acidic repeat protein (Arp) of *Treponema pallidum*. *J Med Microbiol* 2007; 56: 715-721.
90. Sun ES, Molini BJ, Barrett LK, et al. Subfamily I *Treponema pallidum* repeat protein family: Sequence variation and immunity. *Microbes Infect* 2004; 6: 725-737.
91. Ke W, Molini BJ, Lukehart SA, et al. *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* TP0136 Protein Is Heterogeneous among Isolates and Binds Cellular and Plasma Fibronectin via its NH<sub>2</sub>-Terminal End. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9: 1-22.
92. Deka RK, Machius M, Norgard M V., et al. Crystal structure of the 47-kDa lipoprotein of *Treponema pallidum* reveals a novel penicillin-binding protein. *J Biol Chem* 2002; 277: 41857-41864.
93. Grillova L, Jolley K, Šmajs D, et al. A public database for the new MLST scheme for *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*: surveillance and epidemiology of the causative agent of syphilis. *PeerJ* 2019; 6: e6182.



94. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res* 2018; 24: 124.
95. Patel PH, Hashmi MF. *Macrolides*. StatPearls Publishing, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551495/> (2021).
96. Lukehart SA, Godornes C, Molini BJ, et al. Macrolide Resistance in *Treponema pallidum* in the United States and Ireland. *N Engl J Med* 2004; 351: 154-158.
97. Matějková P, Flasarová M, Záhová H, et al. Macrolide treatment failure in a case of secondary syphilis: a novel A2059G mutation in the 23S rRNA gene of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *J Med Microbiol* 2009; 58: 832-836.
98. Shutter MC, Akhondi H. *Tetracycline*. StatPearls Publishing, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549905/> (2021).
99. Nonaka L, Connell S, Taylor D. 16S rRNA mutations that confer tetracycline resistance in *Helicobacter pylori* decrease drug binding in *Escherichia coli* ribosomes. *J Bacteriol* 2005; 187: 3708-3712.
100. Dadashzadeh K, Milani M, Rahmati M, et al. Real-time PCR detection of 16S rRNA novel mutations associated with *Helicobacter pylori* tetracycline resistance in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15: 8883-8886.
101. Gerrits M, de Zoete M, Arents N, et al. 16S rRNA mutation-mediated tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2996-3000.
102. Wu JY, Kim JJ, Reddy R, et al. Tetracycline-Resistant Clinical *Helicobacter pylori* Isolates with and without Mutations in 16S rRNA-Encoding Genes. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 578-583.
103. Ross JI, Eady EA, Cove JH, et al. 16S rRNA Mutation Associated with Tetracycline Resistance in a Gram-Positive Bacterium. 1998; 42: 1702-1705.
104. Xiao H, Li Z, Li F, et al. Preliminary study of tetracycline resistance genes in *Treponema pallidum*. *J Glob Antimicrob Resist* 2017; 9: 1-2.
105. Xiao Y, Liu S, Liu Z, et al. Molecular Subtyping and Surveillance of Resistance Genes In *Treponema pallidum* DNA From Patients With Secondary and Latent Syphilis in Hunan, China. *Sex Transm Dis* 2016; 43: 310-316.
106. Sanchez A, Mayslich C, Malet I, et al. Surveillance of antibiotic resistance genes in *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* from patients with early syphilis in France. *Acta Derm Venereol* 2020; 100: adv00221.

107. Noda AA, Rodríguez I, Šmajš D. Genotyping of *Treponema pallidum* in Cuba (2018-2019): Increased Circulation of Recombinant Genotype and No New *Treponema pallidum* subspecies *endemicum* Infection among Syphilis Patients. *Sex Transm Dis* 2020; 47: e39-e41.
108. Grillová L, Noda AA, Lienhard R, et al. Multilocus Sequence Typing of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Cuba From 2012 to 2017. *J Infect Dis* 2019; 219: 1138-1145.
109. Giacani L, Ciccarese G, Puga-Salazar C, et al. Enhanced Molecular Typing of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* strains from four Italian hospitals shows geographical differences in strain type heterogeneity, widespread resistance to macrolides, and lack of mutations associated with doxycycline resistance. *Sex Transm Dis* 2018; 45: 237.
110. Liu D, He S-M, Zhu X-Z, et al. Molecular Characterization Based on MLST and ECDC Typing Schemes and Antibiotic Resistance Analyses of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Xiamen, China. *Front Cell Infect Microbiol* 2021; 19: 618747.
111. Peng R-R, Wang AL, Li J, et al. Molecular typing of *Treponema pallidum*: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5: e1273.
112. Al-Soud WA, Rådström P. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 485.
113. Grange PA, Gressier L, Dion PL, et al. Evaluation of a PCR Test for Detection of *Treponema pallidum* in Swabs and Blood. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 546-52.
114. Martin IE, Tsang RSW, Sutherland K, et al. Molecular Characterization of Syphilis in Patients in Canada: Azithromycin Resistance and Detection of *Treponema pallidum* DNA in Whole-Blood Samples versus Ulcerative Swabs. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1668.
115. 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: 264-269.
116. Palmer H, Higgins S, Herring A, et al. Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. *Sex Transm Infect* 2003; 79: 479.
117. Gayet-Ageron A, Sednaoui P, Lautenschlager S, et al. Use of *Treponema pallidum* PCR in Testing of Ulcers for Diagnosis of Primary Syphilis. *Emerg Infect Dis* 2015; 21: 127.
118. Castro R, Prieto E, Aguas M, et al. Detection of *Treponema pallidum* sp *pallidum* DNA in latent syphilis. *Int J STD AIDS* 2007; 18: 842-845.

119. Wang C, Hu Z, Zheng X, et al. A New Specimen for Syphilis Diagnosis: Evidence by High Loads of *Treponema pallidum* DNA in Saliva. *Clin Infect Dis* 2020; 73: e3250-e3258.
120. Castro R, Prieto E, Águas MJ, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Lisbon, Portugal. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2510-2512.
121. Lu Y, Wu Q, Wang L, et al. Molecular epidemiological survey of *Treponema pallidum* in pregnant women in the Zhabei District of Shanghai. *J Med Microbiol* 2017; 66: 391-396.
122. Gayet-Ageron A, Combescure C, Lautenschlager S, et al. 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.
123. Fu B, Li H, Zhao Y, et al. A comparison of genotyping tool in *Treponema pallidum*: Review and meta-analysis. *Infect Genet Evol* 2019; 78: 104049.
124. Nishiki S, Arima Y, Kanai M, et al. Epidemiology, molecular strain types, and macrolide resistance of *Treponema pallidum* in Japan, 2017–2018. *J Infect Chemother* 2020; 26: 1042-1047.
125. Zondag H, Cornelissen AR, Van Dam AP, et al. Molecular diversity of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* isolates in Amsterdam, the Netherlands. *Sex Transm Infect* 2020; 96: 223-226.
126. Vrbová E, Grillová L, Mikalová L, et al. MLST typing of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in the Czech Republic during 2004-2017: Clinical isolates belonged to 25 allelic profiles and harbored 8 novel allelic variants. *PLoS One* 2019; 14: e0217611.
127. Zondag H, Bruisten SM, Vrbová E, et al. No bejel among Surinamese, Antillean and Dutch syphilis diagnosed patients in Amsterdam between 2006–2018 evidenced by multi-locus sequence typing of *Treponema pallidum* isolates. *PLoS One* 2020; 15: e0230288.
128. Sahi SK, Zahlan JM, Tantalo LC, et al. A comparison of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* molecular typing systems. *Sex Transm Dis*. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1097/olq.0000000000001378.
129. Florindo C, Reigado V, Gomes JP, et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* clinical strains from Lisbon, Portugal. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3802-3803.
130. Salado-Rasmussen K, Cowan S, Gerstoft J, et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* in denmark: A nationwide study of syphilis. *Acta Derm Venereol* 2016; 96: 202-206.

131. Grange, Allix-Beguec C, Chanal J, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* in Paris, France. *Sex Transm Dis* 2013; 40: 641-644.
132. Martin I, Gu W, Yang Y, et al. Macrolide Resistance and Molecular Types of *Treponema pallidum* Causing Primary Syphilis in Shanghai, China. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 515-521.
133. Wu BR, Yang CJ, Tsai MS, et al. Multicentre surveillance of prevalence of the 23S rRNA A2058G and A2059G point mutations and molecular subtypes of *Treponema pallidum* in Taiwan, 2009-2013. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 802-807.
134. Wu H, Chang SY, Lee NY, et al. Evaluation of macrolide resistance and enhanced molecular typing of *Treponema pallidum* in patients with syphilis in taiwan: A prospective multicenter study. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2299-2304.
135. Sutton MY, Liu H, Steiner B, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* in an Arizona County with increasing syphilis morbidity: Use of specimens from ulcers and blood. *J Infect Dis* 2001; 183: 1601-1606.
136. Pope V, Fox K, Liu H, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* from North and South Carolina. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3743-3746.
137. Noda AA. *Detección, Caracterización Molecular y Resistencia a Antimicrobianos de Treponema pallidum subsp. pallidum en Cuba. 2012-2017*. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, 2019.
138. Martin IE, Tsang RSW, Sutherland K, et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* strains in western Canada: predominance of 14d subtypes. *Sex Transm Dis* 2010; 37: 544-548.
139. Read P, Tagg KA, Jeffreys N, et al. *Treponema pallidum* strain types and association with macrolide resistance in Sydney, Australia: New TP0548 gene types identified. *J Clin Microbiol* 2016; 54: 2172-2174.
140. Müller EE, Paz-Bailey G, Lewis DA. Macrolide resistance testing and molecular subtyping of *Treponema pallidum* strains from southern Africa. *Sex Transm Infect* 2012; 88: 470-474.
141. Molepo J, Pillay a, Weber B, et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* strains from patients with neurosyphilis in Pretoria, South Africa. *Sex Transm Infect* 2007; 83: 189-192.
142. Ho EL, Lukehart SA. Syphilis: using modern approaches to understand an old disease. *J Clin Invest* 2011; 121: 4584-92.

143. Kumar S, Caimano MJ, Anand A, et al. Sequence Variation of Rare Outer Membrane Protein  $\beta$ -Barrel Domains in Clinical Strains Provides Insights into the Evolution of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, the Syphilis Spirochete. *MBio* 2018; 9: e01006-18.
144. Liu D, Tong M-L, Liu L-L, et al. Characterisation of the novel clinical isolate X-4 containing a new *tp0548* sequence-type. *Sex Transm Infect* 2021; 97: 120-125.
145. Tipple C, McClure MO, Taylor GP. High prevalence of macrolide resistant *Treponema pallidum* strains in a London centre. *Sex Transm Infect* 2011; 87: 486-8.
146. Shuel M, Hayden K, Kadkhoda K, et al. Molecular typing and macrolide resistance of syphilis cases in Manitoba, Canada, from 2012 to 2016. *Sex Transm Dis* 2018; 45: 233-236.
147. Mikalová L, Pospíšilová P, Woznicová V, et al. Comparison of CDC and sequence-based molecular typing of syphilis treponemes: *Tpr* and *arp* loci are variable in multiple samples from the same patient. *BMC Microbiol* 2013; 13: 178.
148. Flores JA, Vargas SK, Leon SR, et al. *Treponema pallidum pallidum* genotypes and macrolide resistance status in syphilitic lesions among patients at 2 sexually transmitted infection clinics in Lima, Peru. *Sex Transm Dis* 2016; 43: 465-466.
149. Gallo Vaulet L, Grillová L, Mikalová 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* 2017; 12: e0172905.
150. Khairullin R, Vorobyev D, Obukhov A, et al. Syphilis epidemiology in 1994–2013, molecular epidemiological strain typing and determination of macrolide resistance in *Treponema pallidum* in 2013–2014 in Tuva Republic, Russia. *APMIS* 2016; 124: 595-602.
151. Dai T, Li K, Lu H, et al. Molecular typing of *Treponema pallidum*: A 5-year surveillance in Shanghai, China. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 3674-3677.
152. Peng RR, Yin YP, Wei WH, et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* causing early syphilis in China: a cross-sectional study. *Sex Transm Dis* 2012; 39: 42-45.
153. Tian H, Li Z, Li Z, et al. Molecular typing of *Treponema pallidum*: identification of a new sequence of *tp0548* in Shandong, China. *Sex Transm Dis* 2014; 42.
154. Venter JME, Müller EE, Mahlangu MP, et al. *Treponema pallidum* macrolide resistance and molecular epidemiology in southern Africa, 2008-2018. *J Clin Microbiol* 2021; 59: e02385-20.
155. Arando M, Fernández-Naval C, Mota-Foix M, et al. Early syphilis: risk factors and clinical manifestations focusing on HIV-positive patients. *BMC Infect Dis* 2019; 19: 727.

156. Arando M, Fernández-Naval C, Mota-Foix M, et al. The Jarisch-Herxheimer reaction in syphilis: could molecular typing help to understand it better? *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2018; 32: 1791-1795.
157. Tantaló LC, Lukehart SA, Marra CM. *Treponema pallidum* Strain-Specific Differences in Neuroinvasion and Clinical Phenotype in a Rabbit Model. *J Infect Dis* 2005; 191: 75-80.
158. Kojima Y, Furubayashi K, Kawahata T, et al. Circulation of Distinct *Treponema pallidum* Strains in Individuals with Heterosexual Orientation and Men Who Have Sex with Men. *J Clin Microbiol* 2019; 57: e01148-18.
159. Mikalová L, Grillová L, Osbak K, et al. Molecular Typing of Syphilis-Causing Strains Among Human Immunodeficiency Virus-Positive Patients in Antwerp, Belgium. *Sex Transm Dis* 2017; 44: 376-379.
160. Azzato F, Ryan N, Fyfe J, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* during a local syphilis epidemic in men who have sex with men in Melbourne, Australia. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 1895-1899.
161. Pospíšilová P, Alain Grange P, Grillová L, et al. Multi-locus sequence typing of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* present in clinical samples from France: Infecting treponemes are genetically diverse and belong to 18 allelic profiles. *PLoS One* 2018; 13: e0201068.
162. Pinto M, Borges V, Antelo M, et al. Genome-scale analysis of the non-cultivable *Treponema pallidum* reveals extensive within-patient genetic variation. *Nat Microbiol* 2016; 2: 16190.
163. Flasarová M, Pospíšilová P, Mikalová L, et al. Sequencing-based molecular typing of *Treponema pallidum* strains in the Czech Republic: All identified genotypes are related to the sequence of the SS14 strain. *Acta Derm Venereol* 2012; 92: 669-674.
164. Grillova L, Petrošova H, Mikalova L, et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* in the czech republic during 2011 to 2013: Increased prevalence of identified genotypes and of isolates with macrolide resistance. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 3693-3700.
165. Beale MA, Marks M, Sahi SK, et al. Genomic epidemiology of syphilis reveals independent emergence of macrolide resistance across multiple circulating lineages. *Nat Commun* 2019; 10: 3255.
166. Beale MA, Marks M, Cole MJ, et al. Global phylogeny of *Treponema pallidum* lineages reveals recent expansion and spread of contemporary syphilis. *Nat Microbiol* 2021 612 2021; 6: 1549-1560.

167. Grillová L, Šmajš D. Genetic Stability of the Typing Loci Used in the Multilocus Sequence Typing and Enhanced CDC Typing of Syphilis Treponemes. *Sex Transm Dis* 2019; 46: E70.
168. Grillová L, Giacani L, Mikalová L, et al. Sequencing of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* from isolate UZ1974 using Anti-Treponemal Antibodies Enrichment: First complete whole genome sequence obtained directly from human clinical material. *PLoS One* 2018; 13: e0202619.
169. Fernández-Naval C, Arando M, Espasa M, et al. Novel tp0548 Sequence-Type of *Treponema pallidum* Identified in Barcelona, Spain. *Sex Transm Dis* 2019; 46: e50-e52.
170. Noda AA, Grillov L, Lienhard R, et al. Bejel in Cuba: molecular identification of *Treponema pallidum* subsp. *endemicum* in patients diagnosed with venereal syphilis. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24: 1210.e1-1210.e5.
171. Grange P, Mikalová L, Gaudi C, et al. *Treponema pallidum* 11qj Subtype May Correspond to a *Treponema pallidum* subsp. *endemicum* Strain. *Sex Transm Dis* 2016; 43: 517-518.
172. Tipple C, Taylor GP. Syphilis testing, typing, and treatment follow-up. *Curr Opin Infect Dis* 2015; 28: 53-60.
173. Šmajš D, Pospíšilová P. Macrolide resistance in yaws. *Lancet* 2018; 391: 1555-1556.
174. Muldoon EG, Walsh A, Crowley B, et al. *Treponema pallidum* azithromycin resistance in Dublin, Ireland. *Sex Transm Dis* 2012; 39: 784-786.
175. Edmondson DG, Wormser GP, Norris SJ. In Vitro Susceptibility of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* to Doxycycline. *Antimicrob Agents Chemother* 2020; 64: e00979-20.
176. Pringle M, Fellström C, Johansson KE. Decreased susceptibility to doxycycline associated with a 16S rRNA gene mutation in *Brachyspira hyodysenteriae*. *Vet Microbiol* 2007; 123: 245-248.

