

Desafíos en el diagnóstico de sífilis congénita

Challenges in the diagnosis of congenital syphilis

Duran A.T.¹, Leguizamón L.D.¹, Pinilla G.¹

Recibido: 10 de noviembre de 2017

Aceptado: 11 de diciembre de 2017

Resumen

La sífilis es una enfermedad de transmisión sexual producida por *Treponema pallidum subsp pallidum*; ésta puede ser adquirida de forma congénita y las manifestaciones clínicas son muy variables. Uno de los desafíos en el diagnóstico de la sífilis congénita es la detección temprana de la enfermedad ya que es crucial para la prevención de las devastadoras complicaciones. El diagnóstico de la sífilis se basa en las características clínicas, la observación de los microorganismos mediante microscopía de campo oscuro y pruebas serológicas; la detección molecular del microorganismo se ha implementado con varios propósitos, ya que permitiría un diagnóstico precoz y efectivo de la sífilis que dará lugar a un tratamiento oportuno; la prevención de la progresión de la enfermedad y las complicaciones de la sífilis congénita.

Palabras claves: Sífilis congénita, diagnóstico, pruebas moleculares.

Abstract

Syphilis is a sexually transmitted disease caused by *Treponema pallidum subsp pallidum*; This can be acquired congenitally and the clinical manifestations are very variable. One of the challenges in the diagnosis of congenital syphilis is the early detection of the disease since it is crucial for the prevention of devastating complications. The diagnosis of syphilis is based on clinical characteristics, the observation of microorganisms by darkfield microscopy and serological tests; the molecular detection of the microorganism has been implemented with several purposes, since it would allow an early and effective diagnosis of the syphilis that will give rise to an opportune treatment; the prevention of the progression of the disease and the complications of congenital syphilis.

Keywords: Congenital syphilis, diagnosis, molecular tests.

1. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Facultad de Ciencias de la Salud. Programa de Bacteriología.

Introducción

Las zoonosis son enfermedades infecciosas transmitidas por animales. Las infecciones de transmisión sexual (ITS) se encuentran entre las principales causas de enfermedad en el mundo, especialmente en los países de América Latina y el Caribe, por tal razón, es un problema de salud pública; ya que la sífilis suele afectar de manera importante a las mujeres en edad reproductiva (1). La prevalencia de ITS tiende a ser mayor en los residentes urbanos, en los individuos no casados, y en los adultos jóvenes (2). Las adolescentes son más susceptibles de adquirir ITS debido a la inmadurez del cuello uterino. (3); por tanto, es importante el concepto de prevención en la población juvenil frente a las ITS en tres aspectos fundamentales: conocimiento, educación y conducta sexual (4).

Los casos de sífilis se dan en consecuencia a las falencias en las medidas de prevención, el acceso limitado a la atención médica, cambios en las conductas sexuales y las dificultades en su diagnóstico (5,6). La sífilis en la actualidad representa una alta morbilidad y mortalidad perinatal a nivel mundial (7), situación que de no modificarse se traducirá en el retroceso de los logros alcanzados por los Planes de Salud Reproductiva a nivel mundial (8).

La sífilis puede ser adquirida de forma congénita, por transfusiones de sangre o persona a persona a través del contacto directo de una mucosa con una úlcera sifilítica; el microorganismo se puede adquirir durante la relación sexual vía vaginal, anal u oral (9,10). La infección sifilítica se asocia con un mayor riesgo de adquisición y transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (11,12), con una probabilidad de 2 a 9 veces más (13). En cuanto a la sífilis congénita, la infección es transmitida al feto entre las semanas 16 y 28 de embarazo y conlleva un pronóstico fatal en el 30-50% de casos (14).

Historia:

En el año 1905, Schaudinn y Hoffman, revelaron la asociación entre *T. pallidum* y la sífilis, mostraron las espiroquetas en frotis teñidos con Giemsa de líquido de lesiones sifilíticas secundarias. En 1906, August Von realizó la invención de una prueba de identificación de *T. pallidum* en suero y se estima que en este momento surgieron las pruebas serológicas para sífilis. En 1943, Mahoney trató por primera vez con penicilina cuatro casos de sífilis, y en la actualidad este es el fármaco de elección (7).

Epidemiología:

La sífilis congénita tiene un alto impacto socioeconómico ya que durante el embarazo provoca cerca de 305.000 muertes fetales y neonatales, y deja 215.000 lactantes en riesgo de muerte cada año, en Colombia es considerada como una enfermedad venérea de notificación y declaración obligatoria y se realiza la tamización para sífilis en mujeres gestantes durante el control prenatal y al momento del parto (15). Se estima que cerca de 1.5 millones de mujeres embarazadas están infectadas con sífilis cada año en todo el mundo (16) y la mayoría de casos no se diagnostican ni se tratan (17). Se calcula que cada año hay más de doce millones de nuevas infecciones por *T. pallidum* de las cuales más de dos millones se producen en mujeres embarazadas. En Costa Rica, Colombia, Perú, Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina la sífilis congénita constituye un problema de salud pública, es decir presentan más de 0.5 casos por cada 1000 nacidos vivos (18).

Agente etiológico:

Han sido identificados 4 treponemas patógenos para el hombre: *T. pallidum ssp pallidum* (sífilis), *T. pallidum ssp pertenue* (frambesia o pian), *T. pallidum ssp endemicum* (sífilis endémica o bejel), y *Treponema carateum* (pinta), su diferenciación se basa en la ubicación geográfica,

los modos de transmisión y las manifestaciones clínicas (19).

La sífilis es una enfermedad causada por *Treponema pallidum subsp pallidum* quien es un patógeno estricto de los seres humanos. *T. pallidum* es una espiroqueta fina enroscada, móvil, microaerófila y es incapaz de desarrollarse en los cultivos acelulares (20). Al igual que las bacterias Gram-negativas tiene una membrana externa, pero su membrana interna sólo contiene raras proteínas integrales de membrana (21).

T. pallidum es una bacteria altamente clonal cuya variabilidad genética es mínima, el genoma completo de la espiroqueta fue publicado en 1998 por Fraser y colaboradores, pero tuvo una resecuenciación en el 2013. Se describió su tamaño como relativamente pequeño, ya que esta constituido por 1.138.006 pares de bases que contienen 1041 marcos de lectura abiertos (ORFs) (22). Al caracterizar genéticamente las cepas de *T. pallidum* pueden ser divididas en dos grupos: como cepas Nichols y como cepas SS14 (23).

Inmunología:

En la sífilis temprana las células dendríticas contactan a diversos antígenos en la piel y en las membranas mucosas (sitios de infección sifilítica) para dar inicio a una respuesta de células T antígeno específicas; donde las células Th1 junto con su patrón de citoquinas (IL-2, INF- γ e IL-12) promueven la activación de macrófagos y la destrucción bacteriana. En la sífilis tardía se asume que los linfocitos Th1 sustentan la inmunidad hacia las reinfecciones; por otra parte, la inmunidad humoral confiere protección pasiva (24,25).

Clínica de la enfermedad:

La transmisión de la sífilis ocurre in útero, pero las manifestaciones clínicas en el fruto de la gestación son muy variables (26). Las mani-

festaciones de la sífilis congénita se dividen en tempranas cuando el diagnóstico se realiza durante los dos primeros años de vida incluyendo la muerte fetal intrauterina; y tardías, después de dos años de vida con manifestaciones principalmente en dientes, huesos y sistema nervioso central, esta fase es muy rara y ocurre en aproximadamente el 40% de los niños no tratados (27,28).

Sífilis congénita temprana: En esta etapa se evidencia temprana hepatomegalia. La ictericia ha sido registrada en el 33% de los casos, como consecuencia de la hepatitis sifilítica o de anemia hemolítica. La manifestación cutánea es común y la rinitis puede ser un síntoma temprano (9).

Sífilis congénita tardía: Es raro que se presente y cursa con vasculitis sifilítica que puede dar lugar a anomalías dentales (dientes de Hutchinson), queratitis intersticial es la manifestación ocular típica y la sordera nerviosa se produce en un 3% de los casos. Estas manifestaciones se denominan tríada de Hutchinson (9).

Diagnóstico:

Se basa en las características clínicas, la observación de los microorganismos mediante microscopía de campo oscuro y pruebas serológicas. La detección de la sífilis a través de la presentación clínica es altamente subjetiva y depende de factores como la presencia de lesiones, la experiencia del médico y de la historia clínica (29).

Uno de los desafíos en el diagnóstico de la sífilis congénita es la detección temprana ya que es crucial para la prevención de las devastadoras complicaciones (30); sin embargo, se presentan dificultades en el diagnóstico debido a que en países en vía de desarrollo, las mujeres embarazadas no siempre tienen acceso a los controles prenatales, las técnicas

serológicas no presentan especificidad suficiente para la detección de la enfermedad en los neonatos, la sensibilidad de estas es baja, se pueden presentar falsos positivos o falsos negativos y los métodos diagnósticos no están ampliamente disponibles (31).

Pruebas directas:

Prueba de infectividad de conejo, tiene la limitación de que requiere el uso de animales vivos y la manipulación directa de *T. pallidum* y además no se realiza en laboratorios de rutina (10).

La microscopía de campo oscuro de muestras de las úlceras es fácil de realizar, sin embargo, este método es poco sensible, requiere un equipo especial (microscopio de campo oscuro) y laboratoristas capacitados y con experiencia y no permite distinguir las formas patógenas de *T. pallidum* de otras espiroquetas comensales (29,32).

La inmunotinción de muestras de úlcera con anticuerpos fluorescentes se utiliza para la confirmación del diagnóstico, no obstante, la interpretación de los resultados puede ser subjetiva y también requiere una buena dosis de experiencia (29,33). Estas técnicas son útiles cuando están presentes las lesiones primarias y secundarias, pero la sensibilidad de las técnicas disminuye a medida que la lesión mejora (34).

Pruebas serológicas:

El diagnóstico presuntivo de sífilis se realiza indirectamente por pruebas serológicas no treponémicas y pruebas treponémicas. Estas pruebas deben realizarse en conjunto para evitar falsos positivos (35).

Pruebas no treponémicas: Detectan anticuerpos frente a la cardiolipina, un componente de la membranas y tejidos de los mamíferos

(9), son útiles en la identificación de la infección activa, en el seguimiento de la eficacia del tratamiento; éstas son simples, rápidas y económicas, la principal desventaja es que no se puede usar sangre entera, requieren un rotador o microscopio para su procesamiento y pueden dar resultados falsos positivos (33).

Pruebas treponémicas: Detectan anticuerpos específicos contra *T. pallidum*; son caras, requieren equipo y experiencia técnica y por tanto no están ampliamente disponibles (33,36). Por otra parte, un resultado positivo en una prueba treponémica puede indicar una infección pasada en lugar de sífilis activa (37) y los resultados falsos negativos pueden generarse en los denominados periodos de ventana inmunológica (38).

Pruebas moleculares:

La PCR permite la detección directa de *T. pallidum* (39), esta tiene un enorme atractivo como estrategia de diagnóstico de sífilis, ya que proporciona evidencia inequívoca de infección activa (40), por tanto sería promisorio un ensayo de PCR para el diagnóstico de sífilis, ya que permitiría un diagnóstico precoz para aquellos pacientes que se encuentran en periodo de ventana y para aquellos que no pueden asistir a análisis serológico secuencial (39). Se considera relevante la realización de una PCR en los ambientes clínicos, adicional a las pruebas serológicas, debido a que esto puede impedir un diagnóstico falso negativo (38); se ha planteado, que la PCR podría ser una alternativa para el diagnóstico de sífilis en la madre, contribuyendo a la rápida identificación de la enfermedad (41). La detección molecular permitiría un diagnóstico precoz y efectivo de la sífilis congénita habilitado por un resultado rápido que dará lugar a un tratamiento oportuno; la prevención de la progresión de la enfermedad, complicaciones de la sífilis congénita, así como una reducción en la duración de la exposición de las parejas se-

xuales (38); esto, apoyado en el hecho de que ha sido posible la detección de *Treponema* en sangre completa y suero en pacientes con sífilis congénita (42). La transmisión de la sífilis al feto se puede prevenir a través de un tamizaje temprano que permite instaurar un tratamiento durante el embarazo. Por otro lado, cuando se realiza un tamizaje cercano al parto permite detectar casos congénitos y da la oportunidad de administrar un tratamiento precoz al neonato (27,38), ambas estrategias encaminadas a disminuir los efectos adversos de la sífilis congénita; no obstante, los resultados están ligados a la efectividad de las técnicas que hoy en día aún no son 100% seguras y por esta razón diversos autores plantean el desafío de implementar la PCR convencional y PCR en tiempo real para el diagnóstico de esta patología (37,38,41). Varios genes diana de *Treponema pallidum* se han utilizado para la detección por PCR. Estos genes incluyen *tpf-1*, gen *BMP*, genes *tmpA* y *tmpB*, el gen *polA* y el gen de la proteína de 47-kDa; más recientemente, RT-PCR se ha realizado utilizando el *16S ADNr* como gen blanco (41,43,44,45,46,47,48,49).

Tratamiento:

El tratamiento para la sífilis es la penicilina G benzatina, la resistencia a este antibiótico no se ha detectado en *T. pallidum*. En los pacientes alérgicos a la penicilina, las alternativas incluyen la azitromicina, esta tiene la ventaja de que se ofrece como una dosis oral única, sin embargo, se ha informado de fracasos del tratamiento con este antibiótico, y se han identificado marcadores de resistencia *in vitro* (6). La imparable diseminación de la comunidad bacteriana evidencia la necesidad del desarrollo constante de nuevas alternativas antimicrobianas efectivas a corto, mediano y largo plazo, capaces de responder a los retos propuestos para el siglo XXI (50).

Conclusiones

Las infecciones de transmisión sexual se encuentran entre las principales causas de enfermedad en el mundo, especialmente en la mayoría de los países de América Latina y el Caribe, por tal razón se han constituido como un problema de salud pública; éstas infecciones tienen consecuencias económicas, sociales y sanitarias muy importantes, ya que algunas como la sífilis suelen afectar de manera muy importante a las mujeres en edad reproductiva; las ITS van en aumento a pesar de las campañas de "protección o sexo seguro" en el ámbito mundial y desafían a enfrentar nuevos retos; por tanto, es imprescindible seguir desarrollando y optimizando nuevas técnicas que ayuden a solventar la problemática y frente a esto la PCR es una alternativa diagnóstica prometedora y una herramienta valiosa ya que mediante el diagnóstico oportuno puede contribuir al control de la sífilis materna, además de prevenir la transmisión de la sífilis al feto y aportar al diagnóstico y vigilancia epidemiológica de la sífilis congénita.

Referencias

1. Galban E, Benzaken AS. Situación de la sífilis en 20 países de Latinoamérica y el Caribe: Año 2006. *J obras Doencas Sex Trasm.* 2007; 19(3-4): p. 166-72.
2. World Health Organization. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections overview and estimates. World Health Organization. 2001; Geneva.
3. Acosta G, Ibáñez E, Alfonso A, Cifuentes L. Conductas de salud y factores de riesgo en la salud sexual y reproductiva de una población universitaria. *NOVA.* 2010; 8(13): p. 32-43.
4. Rodríguez F, Barreto P, Sánchez R. Detección de *Chlamydia trachomatis* en hombres que tienen sexo

- con hombres en Bogotá: un estudio piloto. NOVA. 2016; 14(26): p. 24-25.
5. Luu M, et al. Syphilis testing in antenatal care: policies and practices among laboratories in the Americas. *Int J Gynaecol Obstet*. 2015; 130(1): p. S37-S42.
 6. Martin IE, Gu W, Yang Y, Tsang RS. Macrolide resistance and molecular types of *Treponema pallidum* causing primary syphilis in Shanghai, China. *Clin Infect Dis*. 2009; 49(4): p. 515-21.
 7. Chowdhary N, et al. Early detection of congenital syphilis. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2014; 32(4): p. 333-7.
 8. Valderrama J. Eliminación de sífilis congénita en América Latina y el Caribe: marco de referencia para su implementación. Organización Panamericana de la Salud. 2005; Washington, D.C.
 9. Santis M De, Luca C De, Mappa I, Spagnuolo T, Licameli A, Straface G, Scambia G. Syphilis infection during pregnancy: Fetal risks and clinical management. *Infect Dis Obstet Gynaecol*. 2012; 2012(Article ID 430585): p. 1-5.
 10. Martin IE, Tsang RS, 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(6): p. 1668-73.
 11. Pope V, Fox K, Liu H, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* from North and South Carolina. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(8): p. 3743-6.
 12. Valderrama J, Zacarías F, Mazin R. Sífilis materna y sífilis congénita en América Latina: un problema grave de solución sencilla. *Rev Panam Salud Publica*. 2004 sept; 16(3): p. 211-17.
 13. Equipo Infecciones de Transmisión Sexual, grupo de transmisibles, INS. Protocolo de vigilancia en salud pública, sífilis gestacional y sífilis congénita. INS. 2014; Bogotá.
 14. Organización Panamericana de la Salud. Guía clínica para la eliminación de la transmisión maternoinfantil del VIH y de la sífilis congénita en América Latina y el Caribe. Washington, D.C.: OPS. 2009.
 15. Pinilla G, Chavarro B, Moreno N, Navarrete J, Muñoz L. Determinación de los genes, 16S ADNr, *poIA*, y *TpN47*, en la detección de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* para el diagnóstico de sífilis congénita. NOVA. 2015; 13(24): p. 17-25.
 16. Wahab AA, Ali UK, Mohammad M, Md. Monoto EM, Rahman MM. Syphilis in pregnancy. *Pak J Med Sci*. 2015; 31(1): p. 217-9.
 17. Taylor MM, et al. Correlates of syphilis seropositivity and risk for syphilis-associated adverse pregnancy outcomes among women attending antenatal care clinics in the Democratic Republic of Congo. *Int J STD AIDS*. 2014; 25(10): p. 716-25.
 18. Tolosa N. Sífilis gestacional y sífilis congénita. Protocolo de vigilancia en salud pública. Instituto Nacional de Salud. 2014; version 01:2.
 19. Radolf JD. *Treponema*. In S B, editor. *Medical Microbiology 4a edición*. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. p. Capítulo 36.
 20. Ryan K, Ray G. Sherris. *Microbiología Médica*. Quinta edición ed. México: Mc Graw Hill; 2010.
 21. Berman SM. Maternal syphilis: pathophysiology and treatment. *Bull World Health Organ*. 2004; 82(6): p. 433-8.
 22. Fraser CM, Norris S, Weinstock GM, et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum* syphilis spirochete. *Science*. 1998 jul; 281(5375): p. 375-88.
 23. Pětrošová H, Pospíšilová P, Strouhal M, Čejková D, Zobaníková M, Mikalová L, Sodergren E, Weinstock GM, Šmajš D. Resequencing of *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* strains Nichols and SS14: correction of sequencing errors resulted in increased separation of syphilis treponeme subclusters. *PLoS One*. 2013 sept; 8(9): p. 1-8.
 24. Paz LE. *Treponema pallidum*: estructura y antigenicidad. *Univ. Cienc. Soc*. 2010; 1(2): p. 42-4.
 25. Garza-Velasco R, et al. La sífilis y los principales factores de virulencia de *Treponema pallidum*. Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de biología. [Internet]. ; Disponible en: <http://depa.fquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-Tpallidum.pdf>.

26. Ministerio de la protección social, República de Colombia. Guía clínica de atención de la sífilis congénita. [Internet]. Bogotá. ; Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/GUIA%20DE%20ATENCIÓN%20DE%20LA%20SIFILIS%20CONGÉNITA.pdf>.
27. Singh AE, Levett PN, Fonseca K, Jayaraman GC, Lee BE. Canadian Public Health Laboratory Network laboratory guidelines for congenital syphilis and syphilis screening in pregnant women in Canada. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2015; 26(Suppl A): p. 23A-28A.
28. Phiske MM. Current trends in congenital syphilis. *Indian J Sex Transm Dis.* 2014; 35(1): p. 12-20.
29. Liu H, Rodes B, Chen C-Y, Steiner B. New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA Polymerase I Gene. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(5): p. 1941-46.
30. Herring A, Ballard R, Mabey D, Peeling RW. Evaluation of rapid diagnostic tests: syphilis. *Nat Rev Microbiol.* 2006; 4(Suppl 12): p. S33-40.
31. Pinilla G, et al. Detección de *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* para el diagnóstico de sífilis congénita mediante reacción en cadena de la polimerasa anidada. *Biomédica.* 2017; 38(ISSN 0120-4157).
32. Shields M, Guy RJ, Jeoffreys NJ, Finlayson RJ, Donovan B. A longitudinal evaluation of *Treponema pallidum* PCR testing in early syphilis. *BMC Infect Dis.* 2012 dic; 12: p. 353.
33. Peeling RW, Ye H. Diagnostic tools for preventing and managing maternal and congenital syphilis: an overview. *Bull World Health Organ.* 2004; 82(6): p. 439-46.
34. Centurion-Lara A, Castro C, Shaffer JM, Van Voorhis WC, Marra CM, Lukehart SA. Detection of *Treponema pallidum* by a sensitive reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(6): p. 1348-52.
35. Morales-Múnera CE, et al. Update on the diagnosis and treatment of syphilis. *Actas Dermosifiliogr.* 2015; 106(1): p. 68-9.
36. Ham DC, et al. Improving global estimates of syphilis in pregnancy by diagnostic test type: A systematic review and meta-analysis. *Int J Gynaecol Obstet.* 2015; 130(Suppl 1): p. S10-4.
37. Grange PA, Gressier L, Dion PL, et al. Evaluation of a PCR Test for Detection of *Treponema pallidum* in swabs and blood. *Journal of Clinical Microbiology.* 2012 mzo; 50(3): p. 546-52.
38. Heymans R, et al. Clinical value of *Treponema pallidum* Real-Time PCR for diagnosis of syphilis. *J. Clin. Microbiol.* 2010 febr; 48(2): p. 497-502.
39. Palmer HM, Higgins SP, Herring AJ, Kingston MA. Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. *Sex Transm Infect.* 2003 dic; 79(6): p. 479-83.
40. Burstain JM, Grimpel E, Lukehart SA, Norgard MV, Radolf JD. Sensitive detection of *Treponema pallidum* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1991 en; 29(1): p. 62-9.
41. Casal CA, Silva MO, Costa IB, Araújo Eda C, Corvelo TC. Molecular detection of *Treponema pallidum* sp. *pallidum* in blood samples of VDRL-seroreactive women with lethal pregnancy outcomes: a retrospective observational study in northern Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2011; 44(4): p. 451-6.
42. Woznicová V, Šmajš D, Wechsler D, Matějková P, Flasarová M. Detection of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* from skin lesions, serum, and cerebrospinal fluid in an infant with congenital syphilis after clindamycin treatment of the mother during pregnancy. *J Clin Microbiol.* 2007 febr; 45(2): p. 659-61.
43. Wicher K, Horowitz H, Wicher V. Laboratory methods of diagnosis of syphilis for the beginning of the third millennium. *Microbes Infect.* 1999 oct; 1(12): p. 1035-49.
44. Grimpel E, Sanchez PJ, Wendel GD, et al. Use of polymerase chain reaction and rabbit infectivity testing to detect *Treponema pallidum* in amniotic fluid, fetal and neonatal sera, and cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* 1991; 29(8): p. 1711-8.
45. Ferreira SC, de Almeida-Neto C, Nishiya AS, Di-Lorenzo-Oliveira C, et al. Prevalence of *Treponema pallidum* DNA among blood donors with two diffe-

- rent serologic tests profiles for syphilis in Sao Paulo, Brazil. *Vox Sang.* 2014; 106(4): p. 376-8.
46. Hsu PL, Chamberlain NR, Orth K, et al. Sequence analysis of the 47-kilodalton major integral membrane immunogen of *Treponema pallidum*. *Infect Immun.* 1989; 57(1): p. 196-203.
 47. Gayet-Ageron A, Laurent F, et. al. Performance of the 47-kilodalton membrane protein versus DNA polymerase i genes for detection of *Treponema pallidum* by PCR in ulcers. *J Clin Microbiol.* 2015 mzo; 53(3): p. 976-80.
 48. Strouhal M, Čejková D, Zobaníková M, Mikalová L, Sodergren E, Weinstock GM, Šmajš D. Resequencing of *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* strains Nichols and SS14: correction of sequencing errors resulted in increased separation of syphilis treponeme subclusters. *PLoS One.* 2013 sept; 8(9): p. 1-8.
 49. Castro R, Águas MJ, Batista T, Araujo C, Mansinho K, Pereira Fda L. Detection of *Treponema pallidum* sp. *pallidum* DNA in cerebrospinal fluid (CSF) by two PCR techniques. *J Clin Lab Anal.* 2016; 30(5): p. 628-32.
 50. Pinilla G, Muñoz L, Navarrete J, Arévalo P. El ataque de las bacterias: cómo prevenirlo sin morir en el intento. *NOVA.* 2012; 10(18): p. 227-236.