



Detección de *Treponema pallidum subespecie pallidum* en muestras clínicas para el diagnóstico de sífilis congénita mediante la utilización de variantes de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Milena Patricia Barbosa Barrero - Brigete Stephany Gonzalez Chaves

Asesor:

MSc. GLADYS PINILLA BERMUDEZ

SÍFILIS



12 millones de afectados

Sífilis Gestacional

60% asintomáticos

Sífilis Congénita :
Problema de salud pública

- Dificultades en el diagnóstico oportuno.



Morbilidad y
mortalidad
neonatal

DIAGNÓSTICO

Manifestaciones clínicas

Observación directa del microorganismo

Pruebas serológicas

Pruebas Moleculares

Treponémicas

No Treponémicas

(VDRL) y Reagina Plasmática Rápida (RPR)

Absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes (FTA-Abs) y Hemaglutinación de Treponema pallidum (TPHA)

OBJETIVOS

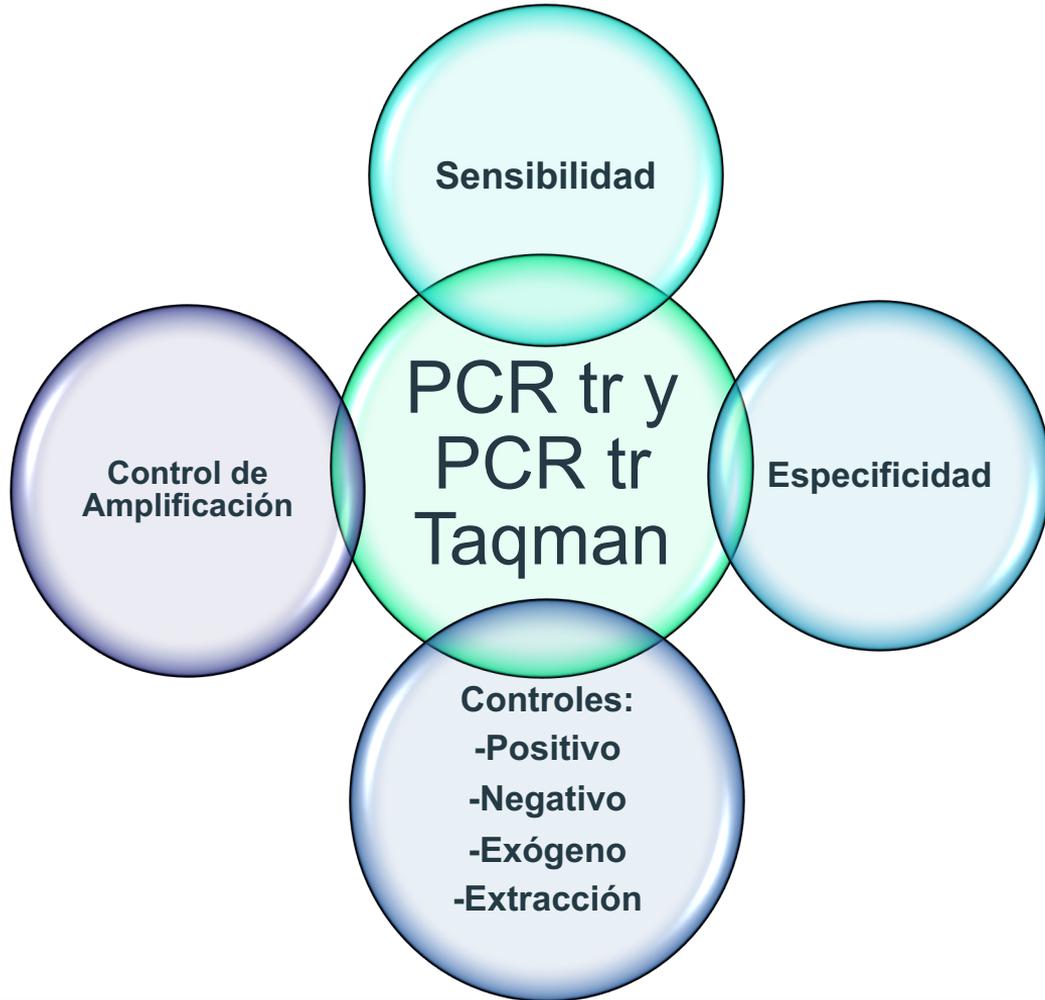
General

- Comparar la utilización de la PCR en tiempo real con y sin el uso de la sonda taqman 47 REMA en la detección de *Treponema pallidum subsp pallidum* en muestras clínicas para el diagnóstico de sífilis congénita.

Específicos

- Validar la utilización del gen *TpN47* para la identificación de *Treponema pallidum subsp pallidum* en diferentes muestras clínicas.
- Comparar la especificidad y sensibilidad de la PCR en tiempo real con y sin el uso de sonda taqman 47 REMA.
- Correlacionar los resultados obtenidos con el origen y tipo de muestra

METODOLOGIA



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

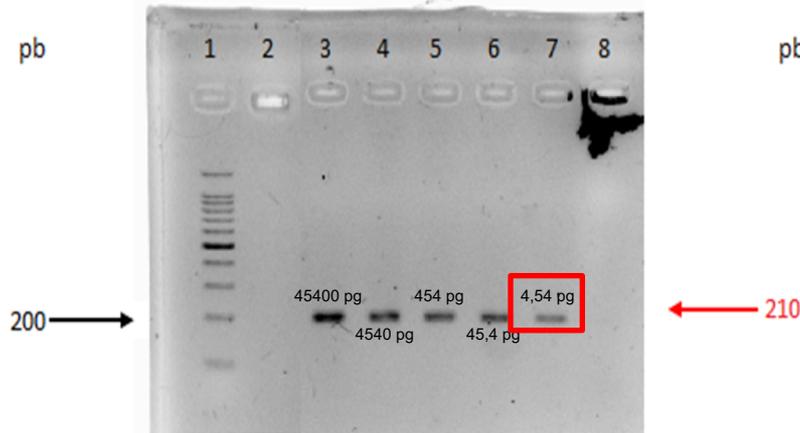
PCR Convencional

Inicio > Vol. 38, Núm. 1 (2018) > **Pinilla**

DOI: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3740>

Detección de *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* para el diagnóstico de sífilis congénita mediante reacción en cadena de la polimerasa anidada

Gladys Pinilla, Lesly Campos, Andrea Durán, Jeannette Navarrete, Liliana Muñoz

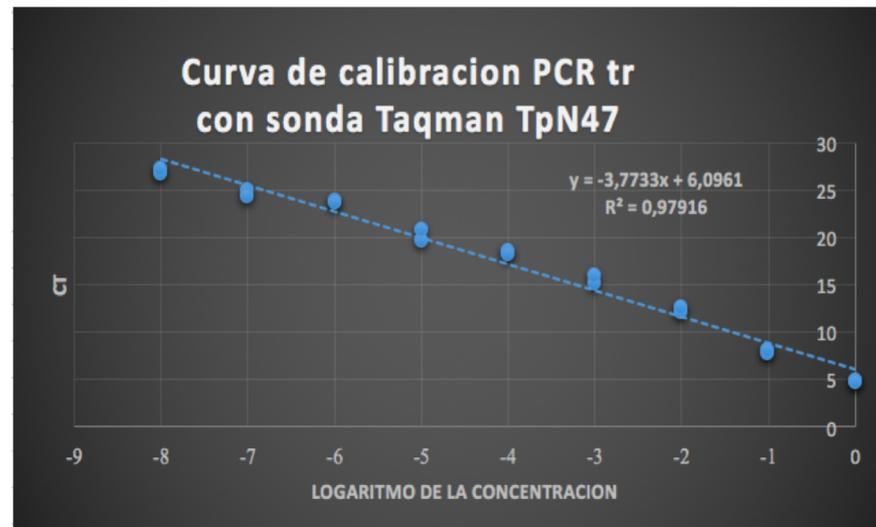
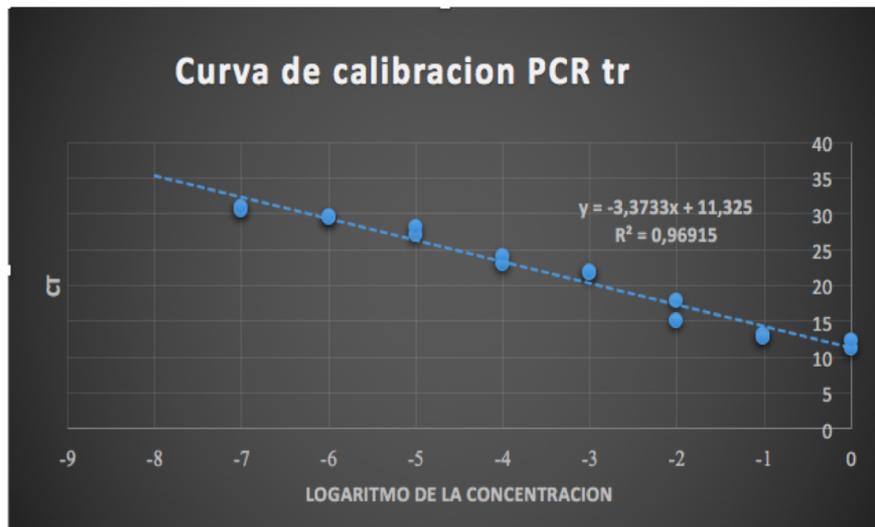


PCR Convencional	PCR Convencional
<i>TpN47</i>	<i>TpN47</i>
Sensibilidad 4,5 pg	Sensibilidad 52 pg

Alineamiento de los primers *TpN47* y sonda Taqman 47 REMA



CURVAS DE CALIBRACIÓN



Eficiencia 96%

Coeficiente de correlación R2
0,96

Pendiente -
3,3733

Eficiencia 96%

Coeficiente de correlación R2
0,97

Pendiente -
3,7733

ENSAYO DE SENSIBILIDAD

Diluciones seriadas en base 10

PCR Convencional	PCR en tiempo Real sin sonda	PCR en tiempo real con sonda
4540 fg	4,54 fg	1,135 fg
Sensibilidad con respecto a la serología		
	48,14%	81,48%

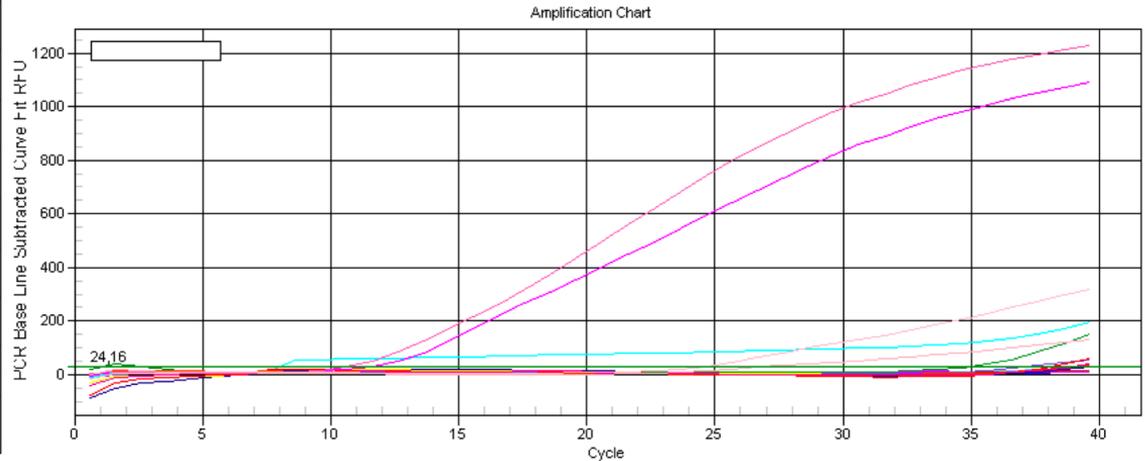
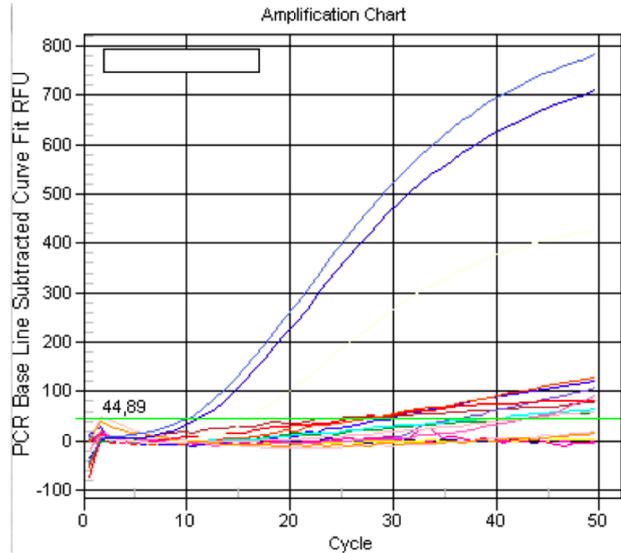
ENSAYO DE ESPECIFICIDAD

PCR tr

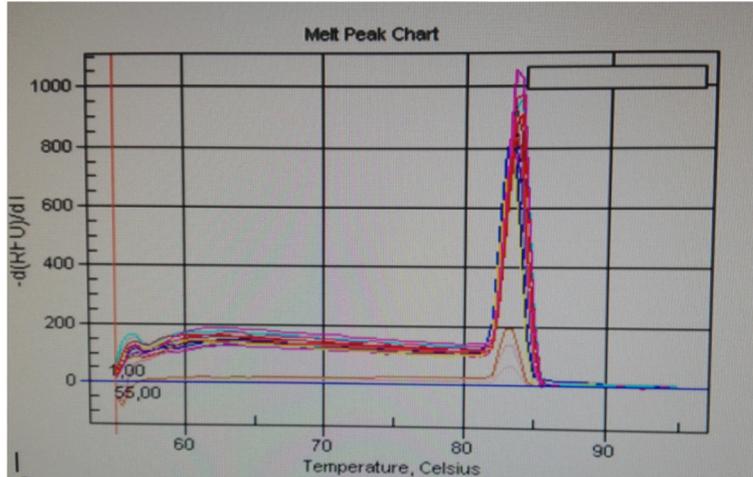
PCR tr Taqman

Análisis Bioinformático

PCR con ADN de bacterias de importancia clínica



Curva Melting PCR tr



Muestras	Valor de Ct	Interpretación
Control negativo	N/A	Negativo
Cepa ATCC 35984 y 12228 de <i>S. epidermidis</i>	N/A	Negativo
Cepa USA 300 de <i>S. aureus</i>	N/A	Negativo
Cepa 2239 de <i>S. aureus</i>	35,03	Negativo
Cepa C478 de <i>Escherichia coli</i>	38,20	Negativo
Cepa 2260 de <i>Klebsiella spp</i>	N/A	Negativo
Control positivo	11,17	Positivo

100% de Especificidad

PCR tr Taqman

Muestras	Valor de Ct	Interpretación
Control negativo	N/A	Negativo
Cepa ATCC 12228 y 35984 <i>S. epidermidis</i>	N/A	Negativo
Cepa USA 300 de <i>S. aureus</i>	N/A	Negativo
Cepa 2239 de <i>S. aureus</i>	N/A	Negativo
Cepa C478 de <i>Escherichia coli</i>	N/A	Negativo
Cepa 2260 de <i>Klebsiella spp</i>	N/A	Negativo
Control positivo	15,72	Positivo

100% de Especificidad

Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom

H M Palmer, S P Higgins, A J Herring, M A Kingston

Sex Transm Infect 2003;**79**:479–483

Palmer y col.	PCR	Gen que codifica para la lipoproteína de membrana de 47 Kd	Límite de detección de 1 pg de ADN <i>T. pallidum subsp pallidum</i>	800 copias del genoma
	PCR tr	<i>TpN 47</i>	Límite de detección de 4,5 fg	3,6 copias
Gamma y col.	PCR tr Taqman	<i>poIA</i>		2,3 copias
	PCR tr Taqman	<i>TpN47</i>	1,135 fg	0,908 copias

Getting the measure of syphilis: qPCR to better understand early infection

[Craig Tittle](#),^{✉1} [Mariam O F Hanna](#),¹ [Samantha Hill](#),² [Jessica Daniel](#),² [David Goldmeier](#),² [Myra O McClure](#),¹ and [Graham P Taylor](#)¹

Tipo de muestras	Variante de PCR	Sensibilidad	Especificidad	Sensibilidad con respecto a la tècnica serològica
Úlceras	PCR tr	100%	97,14%	
Sangre total	PCR tr	34,1% SP 57,89% SS	100%	27,7%
Sangre total perifèrica de gestantes	PCR tr y PCR tr Taqman		100%	100%
Sangre de Neonato	PCR tr y PCR tr Taqman	No concordancia con tècnica serològica		

[J Clin Microbiol.](#) 2007 Jan;45(1):93-6. Epub 2006 Oct 25.

Development of a real-time PCR assay to detect *Treponema pallidum* in clinical specimens and assessment of the assay's performance by comparison with serological testing.

Leslie DE¹, Azzato F, Karapanagiotidis T, Leydon J, Eyme J.

[J Clin Microbiol.](#) 2010 Feb;48(2):497-502. doi: 10.1128/JCM.00720-09. Epub 2009 Dec 9.

Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis.

Heymans R¹, van der Helm JJ, de Vries HJ, Fennema HS, Coutinho RA, Bruisten SM.

	Variante de la PCR	Diana Molecular	Concordancia con respecto a otra técnica	Especificidad
David Leslie	PCR tr Taqman	<i>polA</i>	95% (serología)	98,40%
	PCR tr Taqman	<i>TpN47</i>	81,48% (serología)	100%
Heymans y col.	PCR Taqman	<i>polA</i>	87% (MCO)	93,1%

Comparación de la sensibilidad de las variantes

Tipo de Muestra	PCR tr	PCR tr Taqman
Sangre periférica de Gestantes	100%	100%
Suero de Gestantes	60%	60%
Suero de Neonato	25%	100%
Sangre de Cordón Umbilical	0%	50%
LCR	45,45%	90.9%

	PCR tr	PCR tr Taqman
Número de muestras positivas	13 /27*	22 /27*
Porcentaje	48,14 %	81,48 %

CONTROL INTERNO DE AMPLIFICACIÓN

PCR tr

Controles y Muestras	Valor de Ct
Control negativo agua ultrapura	N/A
Muestra 001 infectada en el laboratorio	13,07
Muestra 004 infectada en el laboratorio	13,60
Muestra 006 infectada en el laboratorio	12,89
Muestra 012 infectada en el laboratorio	12,70
Control positivo	21,09

PCR tr Taqman

Controles y Muestras	Valor de Ct
Control negativo agua ultrapura	N/A
Muestra 001 infectada en el laboratorio	11,92
Muestra 003a infectada en el laboratorio	10,49
Muestra 014 infectada en el laboratorio	9,92
Muestra 018 infectada en el laboratorio	10,23
Control positivo	10,46

Muestra	PCR tr			PCR tr Taqman		
	Valor de Ct	Interpretación	Cantidad aproximada de ADN (fg)	Valor de Ct	Interpretación	Cantidad aproximada de ADN (fg)
2	28,05	Positiva	454	18,40	Positiva	11350
8	30,07	Positiva	4,54	25,32	Positiva	11,35
22	30,07	Positiva	4,54	17,29	Positiva	11350
25	29,13	Positiva	45,5	12,34	Positiva	1135000

CONCLUSIONES

- Se validó la utilización del gen *TpN47* como diana molecular para detectar la presencia de *Treponema pallidum subsp pallidum* en muestras clínicas para el diagnóstico de SC
- Se determinó que el límite de detección de la técnica PCR tr y PCR tr-Taqman fue de 4,5 fg y 1,135 fg respectivamente, con especificidades del 100% para ambas variantes.
- Al comparar los resultados obtenidos en la PCR tr y PCR tr-Taqman, se estableció que esta última es más sensible con un 33,34% de diferencia.
- La validación de esta técnica molecular podrá ser implementada en laboratorios clínicos de referencia para diagnosticar oportunamente la SG y SC y proporcionar tratamiento adecuado, evitando así, secuelas graves e incluso la muerte neonatal o infantil.
- La muestra ideal para utilizar en el diagnóstico de sífilis haciendo uso de las técnicas moleculares, depende directamente del estadio clínico de la enfermedad.
- El uso de la sonda Taqman 47 *REMA* aumenta la sensibilidad de la PCR tr en el diagnóstico de sífilis congénita, disminuyendo los falsos positivos y negativos que se generan cuando se usan técnicas serológicas.

RECOMENDACIONES

- Disponer de la mayor parte de los datos clínicos de los pacientes incluidos en este tipo de estudios, tales como signos y síntomas, tiempo de evolución de la enfermedad, tratamiento, estado inmunológico, entre otros, para poder correlacionar mejor los resultados.
- Se requiere mayor número de muestras para validar la técnica en el campo clínico.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y a su cuerpo docente por brindarnos los conocimientos y las habilidades necesarias para desarrollar este proyecto.

A la docente Gladys Pinilla por su compromiso y entrega en la ejecución de este proyecto.

Al grupo de investigación REMA por acogernos en este semillero y proveernos los materiales y herramientas necesarias para la investigación.

A los hospitales de tercer nivel de la ciudad de Bogotá por facilitarnos las muestras analizadas.

Al Departamento de Inmunopatología de la Sífilis de la Universidad de Washington Seattle USA por suministrarnos el control positivo para nuestros ensayos.



ENCUENTRO REGIONAL DE
SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN

REDCOLSI, NODO BOGOTÁ - CUNDINAMARCA

"Semilleros en conciencia"

La Red Colombiana de Semilleros de Investigación
Nodo Bogotá - Cundinamarca

otorga el certificado a:

Milena Patricia Barbosa

con cedula de ciudadanía **1.045.677.776**

en calidad de: **Ponente**

por su participación en el XVI encuentro regional de semilleros de investigación,
Nodo Bogotá - Cundinamarca, en la Universidad Jorge Tadeo Lozano durante
los días 10 y 11 de Mayo del 2018.

German Eduardo Vargas Zapata

Coordinador RedCOLSI
Nodo Bogotá - Cundinamarca



Nora Milena Roncancio Parra

Secretaria Nacional

Nodo Bogotá Cnd.
16 años



ENCUENTRO REGIONAL DE
SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN

REDCOLSI, NODO BOGOTÁ - CUNDINAMARCA

"Semilleros en conciencia"

La Red Colombiana de Semilleros de Investigación
Nodo Bogotá - Cundinamarca

otorga el certificado a:

Brigete Stephany González Chaves

con cedula de ciudadanía **1.010.216.925**

en calidad de: **Ponente**

por su participación en el XVI encuentro regional de semilleros de investigación,
Nodo Bogotá - Cundinamarca, en la Universidad Jorge Tadeo Lozano durante
los días 10 y 11 de Mayo del 2018.

German Eduardo Vargas Zapata

Coordinador RedCOLSI
Nodo Bogotá - Cundinamarca



Nora Milena Roncancio Parra

Secretaria Nacional





ENCUENTRO
INSTITUCIONAL
DE SEMILLEROS DE
INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE
CUNDINAMARCA

LA OFICINA DE INVESTIGACIONES

Certifica que :

BRIGETE STEPHANY GONZÁLEZ CHAVES

Del semillero:

REMA

Participó como **PONENTE** en el VII Encuentro Institucional de Semilleros de Investigación realizado el **26** septiembre del año 2017.

Myriam Sepúlveda L.

Myriam Sepúlveda López
Jefe de la Oficina de investigaciones

Salud humana & Animal 

Vegetal & Agricultura 

Biología & Microorganismos 

Ciencias ómicas & Bioinformática 

Medio ambiente & Enseñanza 

III Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular

www.c2b2.com.co

TE ESPERAMOS EN BOGOTÁ | HOTEL TEQUENDAMA CROWNE PLAZA | NOVIEMBRE 1- 3 DE 2018

ORGANIZAN



SOCIEDAD COLOMBIANA DE CIENCIAS QUÍMICAS



BIBLIOGRAFIA

Pinilla G., Campos L., Duran A., Navarrete J. ML. Detección de *Treponema pallidum* subespecie *pallidum* para el diagnóstico de sífilis congénita mediante reacción en cadena de la polimerasa anidada. *Biomédica* [Internet]. 2017 Mar 15 [cited 2018 May 29];38(1):128. Available from: <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/3740>

Palmer HM, Higgins SP, Herring AJ, Kingston MA, Palmer HM. Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. *Sex Transm Infect* [Internet]. 2003 [cited 2018 May 31];79:479–83. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1744778/pdf/v079p00479.pdf>

Gama A, Carrillo-Casas E, Hernández-Castro R, Vázquez-Aceituno V, Toussaint-Caire S, Xicohtencatl-Cortes J, et al. *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* identification by real-time PCR targetting the *poIA* gene in paraffin-embedded samples positive by immunohistochemistry. *Int J STD AIDS* [Internet]. 2017 Nov 11 [cited 2018 May 29];28(13):1299–304. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0956462417704123>

Leslie DE, Azzato F, Karapanagiotidis T, Leydon J, Fyfe J. Development of a real-time PCR assay to detect *Treponema pallidum* in clinical specimens and assessment of the assay's performance by comparison with serological testing. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2007 Jan [cited 2018 Jul 29];45(1):93–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17065262>

Cecilia Sanguinetti Diaz. Pruebas de Laboratorio en el diagnóstico de la sífilis. *Dermatología Peru* [Internet]. 2000 [cited 2018 Jul 29];10(1):1–6. Available from: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/dermatologia/v10_sup1/pruebas_lab.htm

GRACIAS