



CIENCIAS BIOMÉDICAS

Premio Anual Academia de Ciencias de Cuba, 2020

Diversidad genética de *Treponema pallidum* en Cuba

Ángel Alberto Noda Ramos ^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-9849-7091>

Orestes Blanco González ¹ <https://orcid.org/0000-0001-9356-6043>

Yudeimys Espinosa López ¹ <https://orcid.org/0000-0002-2589-1028>

Arianna Amarilis Rojas Perelló ¹ <https://orcid.org/0000-0001-7153-1632>

Islay Rodríguez González ¹ <https://orcid.org/0000-0002-0723-4454>

¹Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. La Habana, Cuba

*Autor para la correspondencia: angelalberto@ipk.sld.cu; angelnoda25@gmail.com

RESUMEN

Introducción: *Treponema pallidum* es una bacteria monomórfica con muy pocas diferencias genómicas entre aislados y subespecies. La diversidad genética de este patógeno no ha sido explorada a profundidad, sin embargo, estos estudios impactan directamente en el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos, vacunas, entre otros. El objetivo de este trabajo fue evaluar la diversidad genética de este patógeno en Cuba (2012-2019). **Métodos:** Se realizaron 5 estudios moleculares exploratorios basados en caracterización molecular, detección de mutaciones puntuales y secuenciación de genoma completo de *T. pallidum*. **Resultados:** Se determinó la presencia de 8 subtipos de *T. pallidum* subsp. *pallidum* (TPA), 7 genotipos de TPA, la presencia de *T. pallidum* subsp. *endemicum* en pacientes diagnosticados de sífilis venérea, con mutaciones puntuales de resistencia a macrólidos en una elevada frecuencia y eventos de recombinación intra e inter-aislados en TPA aportando significativamente a la diversidad genética de este patógeno en Cuba y en el mundo. Lo anterior, sugiere como conclusión una significativa diversidad genética de *T. pallidum* en el contexto cubano con un predominio incrementado en el tiempo de genotipos recombinantes, a los que se les debe seguir más de cerca por su potencial implicación en el comportamiento de esta enfermedad.

Palabras clave

Treponema pallidum; diversidad genética; recombinación genética; mutaciones; ADN

Genetic diversity of *Treponema pallidum* in Cuba

ABSTRACT

Introduction: *Treponema pallidum* is considered as a monomorphic bacterium with very few genomic differences among isolates and subspecies. The genetic diversity of this pathogen has not been explored in depth; however, this kind of studies potentially has a direct impact on the development of new diagnostic methods and vaccines. The objective of this work was to evaluate the genetic diversity of this pathogen in Cuba (2012-2019). **Methods:** Five exploratory studies were carried out based on molecular characterization, detection of one-off mutations and whole genome sequencing of *T. pallidum*. **Results:** The high level of genetic diversity of *T. pallidum* in the Cuban context was demonstrated by the detection of 8 subtypes

Keywords

Treponema pallidum; genetic diversity; genetic recombination; mutations; DNA



of *T. pallidum* subsp. *pallidum* (TPA), 7 genotypes of TPA, the identification of *T. pallidum* subsp. *endemicum* in patients diagnosed with venereal syphilis, one-off mutations conferring resistance to macrolides with a high frequency and intra- and inter-strain recombination events in TPA. These findings suggest, as a conclusion, a significant genetic diversity of *T. pallidum* in the Cuban context with an increased predominance of recombinant genotypes over time, which should be further studied given their potential involvement in the development of this disease.

INTRODUCCIÓN

La especie *Treponema pallidum* se divide en 3 subespecies, *T. pallidum* subsp. *pallidum* (TPA) que causa la sífilis venérea, *T. pallidum* subsp. *pertenue* (TPE) causante del pian y *T. pallidum* subsp. *endemicum* (TEN) que provoca la sífilis endémica o bejel. Dichos patógenos a su vez constituyen los treponemas de mayor importancia clínica. ⁽¹⁾ La sífilis venérea constituye hoy día la infección de transmisión sexual (ITS) bacteriana de mayor incidencia en Cuba y una de las más frecuentes a nivel mundial. Desde el año 2010 ha existido un notable aumento en el número de casos de esta infección notificados en Cuba, en su mayoría en pacientes coinfectados con VIH y en hombres que tienen sexo con hombres. ⁽²⁾ A pesar de la considerable re-emergencia de la sífilis, globalmente son insuficientes los estudios encaminados al perfeccionamiento del diagnóstico y de las herramientas para entender su epidemiología y resistencia antimicrobiana. TPA no es cultivable hasta la fecha por lo que los métodos moleculares juegan un papel fundamental en su estudio, desde el punto de vista genético TPA se divide en los grupos SS14-like y Nichols-like con un amplio predominio en la contemporaneidad del grupo SS14-like.

La diversidad genética en los patógenos es un fenómeno de suma importancia a valorar ya que puede tener implicaciones en múltiples aristas, por ejemplo: en el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos, en la búsqueda de métodos confiables de caracterización molecular, en el establecimiento de tratamientos antimicrobianos adecuados, en el diseño de candidatos vacunales, en estudios de virulencia, vías de transmisión, especificidad de hospederos y evasión de los mecanismos de defensa, en estudios de determinados cuadros clínicos y su asociación con variantes genéticas del patógeno, entre otros. Todo lo anterior, a su vez garantiza un impacto positivo en las estrategias de manejo, prevención y control de estas enfermedades.

En el mundo son, en extremo, escasos los estudios que abordan la diversidad genética en los treponemas, y en el caso particular de Cuba se desconoce este fenómeno; por lo que con el objetivo de evaluar la diversidad genética de este

patógeno en el país, en el periodo 2012-2019, se realiza la presente investigación para dar respuestas a las siguientes interrogantes: ¿Son los aislados de *Treponema pallidum* en Cuba genéticamente diversos? En caso afirmativo. ¿En qué fenómenos se sustenta dicha diversidad?

MÉTODOS

En el Laboratorio Nacional de Referencia de Espiroquetas del IPK (LNRE-IPK) se realizaron 5 estudios de carácter exploratorio, en el periodo 2012-2019, para la evaluación de la diversidad genética de aislados de *T. pallidum* presentes en muestras de exudados de lesiones genitales en pacientes con sospechas clínicas de sífilis, que asistieron a la consulta de ITS del servicio de dermatología en el IPK. Se utilizaron extractos de ADN de *T. pallidum* de las muestras de exudados genitales previamente conservados a -80 °C.

Estudio 1: Caracterización molecular de 83 aislados de TPA de pacientes cubanos utilizando el sistema de los CDC mejorado (periodo 2012-2017). Este sistema de caracterización se basa en la determinación del número de secuencias repetidas de un fragmento de 60 pb del gen *arp*, en ensayos de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) para el gen *tpr* y la amplificación y secuenciación nucleotídica del locus TP0548. El protocolo se realizó según lo reportado por Marra *et al.* ⁽³⁾ respetando cada una de las condiciones experimentales.

Estudio 2: Genotipificación de TPA utilizando el sistema de análisis de secuencias multi-locus (MLSA) en 83 muestras de pacientes con lesiones ulceradas (periodo 2012-2017).

El esquema de tipificación MLSA está basado en la amplificación por PCR anidada y secuenciación de los loci TP0136, TP0548 y TP0705. ⁽⁴⁾ Cada locus, de acuerdo a su polimorfismo de secuencia, aporta un número al genotipo o perfil alélico que se conforma por la combinación de los 3 números (ej., genotipo 1.3.1).

Se generaron árboles filogenéticos de máxima verosimilitud mediante el programa Mega 6 y utilizando el modelo de Tamura-Nei con valores de *bootstraps* para 1000 réplicas. Se contaron las deleciones e inserciones como eventos simples.

Para la concatenación de las secuencias se usó el programa Sequence Matrix 1.8.

Estudio 3: Genotipificación de TPA utilizando el sistema de análisis de secuencias multi-*locus* (MLSA) en 22 muestras de pacientes con lesiones ulceradas (periodo 2018-2019).

La metodología utilizada en este estudio es exactamente igual a la del estudio anterior.

Estudio 4: Identificación de la mutación A2058G en el ADNr 23S de TPA en aislados cubanos.

Se amplificó, por PCR anidada, y se sometió a secuenciación nucleotídica el gen ADNr 23S de los aislados de TPA según lo reportado por Lukehart y colaboradores.⁽⁵⁾

Estudio 5: Secuenciación de genoma completo de 11 aislados de TPA. La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el estuche comercial Qiamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se utilizó el protocolo de MLST descrito previamente para la caracterización molecular de los aislados y el número de copias de ADN de *Treponema* y ADN humano se determinó mediante PCR cuantitativa utilizando el gen *diana* *poLA* para *Treponema*⁽⁶⁾ y el gen de la ARNasa P humano.⁽⁷⁾

Para el enriquecimiento de ADN de *Treponema* utilizando la endonucleasa de restricción DpnI, se tomaron de 10 µL a 40 µL de extracto de ADN se añadió a un tubo conteniendo perlas acopladas a la endonucleasa de restricción hasta un volumen final de 50 µL. Las perlas se mezclaron en rotación por 30 min y se separaron usando un dispositivo magnético. Seguidamente las perlas se sometieron a tampón de lavado (10mM Tris, 50 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ y 0,01 % de Tween 20). El ADN se precipitó utilizando 20 µL de tiocianato de guanidinio a temperatura ambiente por 5 min.

Para la preparación de las librerías de genes de las fracciones enriquecidas por DpnI se utilizó el estuche comercial Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos). Los productos de la librería se amplificaron utilizando 19 ciclos y el ADN se purificó con AMPure XP beads (New England BioLabs, Ipswich, MA, Estados Unidos) con 20 µL de volumen de elución.

Los análisis bioinformáticos (identificación de Indels y SNP, construcción de árboles filogenéticos, detección de eventos de recombinación y anotación de los genomas completos) se desarrollaron de acuerdo a lo descrito por Grillová *et al.*⁽⁴⁾

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio 1: Caracterización molecular de 83 aislados de TPA de pacientes cubanos utilizando el sistema de los CDC mejorado (periodo 2012-2017).

De las 83 muestras positivas por las 3 RT-PCR utilizadas para el diagnóstico molecular, 76 % (63/83) resultaron carac-

terizadas completamente (*loci arp, tpr* y TP0548). La frecuencia de aislados caracterizados superó completamente el 75 % de los mismos lo que denota una eficacia adecuada de amplificación, restricción y análisis de secuencias utilizando los *loci* estudiados.

Los resultados reflejados en el presente estudio, muestran una elevada diversidad de aislados de TPA con 8 subtipos diferentes (7 f/c, 10 d/f, 10 f/f, 12 a/d, 12 f/g, 14 a/g, 14 d/g y 14 f/g) considerando solo aquellos que fueron completamente caracterizados, con predominio de los subtipos 14 f/g y 14 d/g, este último es el de mayor distribución mundial.

Si se compara la frecuencia de aparición de subtipos diferentes en Cuba (12,6 %; 8/63) con estudios realizados en Estados Unidos (4,5 %; 7/154), Colombia (8 %; 4/50), Francia (4,2 %; 5/119) y Rusia (8,5 %; 6/70);^(8,9,10) se puede observar que en Cuba se reporta una frecuencia superior de subtipos circulantes lo que refuerza la elevada variabilidad genética de los aislados cubanos.

El subtipo encontrado con mayor frecuencia fue 14 f/g (39,7 %; 25/63), que solo ha sido reportado en Argentina (15 %), Dinamarca (3,6 %) y Australia (0,5 %).^(11,12,13) Esto demuestra una pobre circulación del mismo a nivel mundial, o al menos en aquellos países donde se ha llevado a cabo este tipo de estudios.

El subtipo 14 d/g es el subtipo de TPA con mayor distribución a nivel mundial y cuya circulación se da a conocer por primera vez en Cuba a partir de los resultados del presente estudio. En una investigación llevada a cabo en Estados Unidos, se informó una frecuencia de 38 % de este subtipo en pacientes diagnosticados con sífilis en estadios primario y secundario.⁽⁸⁾ Es necesario tener en cuenta que la prevalencia de un subtipo u otro constituye un factor intrínseco de cada región, aunque evidentemente entre regiones cercanas debe existir similitud en cuanto a los subtipos que más circulan, sobre todo si existe un constante intercambio entre las poblaciones de ambas zonas geográficas. El subtipo 14 d/g también circula en otros países como Sudáfrica, Canadá, Dinamarca, Italia y Australia con frecuencias mayores a 25 %.^(11,12,14,15,16) En cada uno de estos estudios el número de muestras analizadas fue superior al de la presente investigación, por lo que podría existir una mayor probabilidad de encontrar dicho subtipo.

El subtipo 12 f/g, con una frecuencia de aparición en Cuba de 14,3 %, no ha sido reportado en otra zona geográfica hasta el momento. Los 5 subtipos restantes encontrados con frecuencias por debajo de 8 %, a excepción del 14 a/g (10 %), previamente reportado en Sudáfrica, constituyen subtipos detectados por primera vez en el presente estudio; por lo que se carece de información sobre la circulación geográfica de los mismos.

Estudio 2: Genotipificación de TPA utilizando el sistema de análisis de secuencias multi-locus (MLSA) en 83 muestras de pacientes con lesiones ulceradas (periodo 2012-2017).

De las 83 muestras identificadas previamente como positivas por las 3 RT-PCR para diagnóstico, 94 % (78/83) resultaron caracterizadas completamente (positivas por las PCR anidadas y secuenciadas para los 3 *loci*: TP0136, TP0548 y TP0705).

En la presente investigación se determinaron 7 perfiles alélicos o genotipos diferentes de TPA en los 69 aislados de pacientes completamente caracterizados por MLSA (Tabla 1).

La frecuencia de perfiles alélicos determinada en la presente investigación (10 %; 7/69) es ligeramente superior a la encontrada en los pocos países que han realizado estudios en este sentido, por ejemplo 8 % (6/75) en Argentina, 9 % (21/281) en República Checa y 7 % (15/197) en Suiza y Francia.^(4,13)

En cuanto a las particularidades genéticas encontradas, el genotipo 16.3.1 mostró una secuencia particular que consiste en una delección de 96 nucleótidos y 4 SNP en el *locus* TP0136, comparado con el de la cepa de referencia TPA SS14 (Código de acceso en *GenBank*, CP004011.2), lo que resulta en una disminución de secuencias repetidas, fenómeno característico de la estructura modular del gen TP0136 en TPA.⁽¹⁷⁾

Más relevante aún, resultó la identificación del genotipo 15.7.3; obtenido en las muestras de 4 pacientes, con la secuencia del *locus* TP0136 con mayor similitud nucleotídica al de la cepa SS14-like (953 nucleótidos idénticos de 964 que

posee la región analizada) y al mismo tiempo, el *locus* TP0548 exceptuando dos SNP (G170A, C208A) resultó ser idéntico a la cepa *Nichols-like* (TPANIC_0548; código de acceso en *GenBank*, CP004010.1). Lo anterior sugiere de manera preliminar que la variante alélica TP_0136_15 parece tener un carácter quimérico (Figura 1), dado probablemente por eventos previos de recombinación.

En correspondencia con las descripciones mundiales contemporáneas a partir de muestras clínicas humanas, en el presente estudio 91,3 % (63/69) de los aislados de TPA identificados pertenecieron al grupo SS14-like y solo 8,7 % (6/69) al grupo *Nichols-like*, aunque vale destacar que existió un equilibrio entre el número de genotipos diferentes pertenecientes a cada grupo genético (4 genotipos de SS14-like y 3 genotipos de *Nichols-like*).

Aunque se ha determinado la circulación de otros genotipos menos frecuentes en Europa, el perfil alélico identificado con mayor frecuencia en este estudio (1.3.1) se ha observado también con mayor frecuencia en Francia y Suiza.^(4,18) Se determinaron además 5 perfiles alélicos únicos en las muestras cubanas, de ellos 3 (9.24.8; 9.25.8 y 15.7.3) pertenecen al grupo filogenético *Nichols-like* y solo uno (16.3.1) se agrupó dentro del grupo SS14-like, lo que denota una emergencia de nuevos genotipos del grupo *Nichols-like*.

Contrario a lo esperado, en 9 de los pacientes estudiados (9/78; 11,5 %) se determinó que los aislados caracterizados tenían una mayor similitud nucleotídica con el genoma de la

Tabla 1. Frecuencia de genotipos y descripción de los *loci* TP0136, TP0548 y TP0705 de los aislados de *T. pallidum* subsp. *pallidum* identificados en el estudio (n = 69)

Genotipo	<i>Locus</i> TP0136 ^b	<i>Locus</i> TP0548 **	<i>Locus</i> TP0705 **	Grupo genético	Frecuencia (%)
1.1.1	Idéntico a SS14	Idéntico a SS14	A1973G, G2122A	SS14-like	1/69 (1,4)
1.1.10	Idéntico a SS14	Idéntico a SS14	Idéntico a SS14	SS14-like	1/69 (1,4)
1.3.1	Idéntico a SS14	G154A, G158A	A1973G, G2122A	SS14-like	60/69 (87)
9.24.8 *	G1205A	G170A, G478A	C1517T	<i>Nichols-like</i>	1/69 (1,4)
9.25.8 *	G154A, G170A, G478A	G154A, G170A, G478A	C1517T	<i>Nichols-like</i>	1/69 (1,4)
15.7.3 ^a	Quimérico (SS14/ <i>Nichols</i>)	G170A, C208A	G1516A	<i>Nichols-like</i>	4/69 (6)
16.3.1	Delección de 96 nt (229-324), G667A, G742A, G763C, G815A	G154A, G158A	A1973G, G2122A	SS14-like	1/69 (1,4)

Leyenda: * Las nuevas variantes alélicas se describen en letra negra. ** Las coordenadas de los polimorfismos de simple nucleótido se corresponden a las posiciones en los genes TPASS_0136, TPASS_0548 y TPASS_0705 (*T. pallidum* subsp. *pallidum* cepa SS14; CP004011.1) si los genotipos pertenecen al grupo SS14-like; o a las posiciones en los genes TPANIC_0136, TPANIC_0548 y TPA-NIC_0705 (*T. pallidum* subsp. *pallidum* cepa *Nichols*; CP004010.2), si los genotipos pertenecen al grupo *Nichols-like*.

cepa Bosnia A (Código de acceso en GenBank, CP007548.1) en los *loci* TP0136 y TP0548. Dicha cepa contiene el único genoma completo reportado de TEN, el agente infeccioso causante de bejel o sífilis endémica. O sea, se reportó 9 aislados de *T. pallidum* en pacientes caracterizados con sífilis venérea que resultaron no ser el agente causal de la sífilis venérea sino el de bejel o sífilis endémica.

Estudio 3: Genotipificación de TPA utilizando es sistema de análisis de secuencias multi-locus (MLSA) en 22 muestras de pacientes con lesiones ulceradas (periodo 2018-2019).

De las 22 muestras clínicas analizadas, se logró caracterizar completamente a 21 de estas (95 %) identificándose 2 genotipos circulantes. El genotipo 1.3.1 se detectó en 80 % de frecuencia lo que coincide con el genotipo más prevalente en Cuba en años precedentes y a nivel mundial (Figura 2); sin embargo, se identificó a 15.7.3 como segundo genotipo predominante con un incremento en su frecuencia de circulación de 3 veces con respecto al periodo anterior (19 % vs. 5,7 %).

El genotipo recombinante 15.7.3; que pertenece al grupo genético Nichols-like, se ha detectado solo en Cuba (por primera vez en el año 2014) y posee el *locus* TP0136 con mayor similitud nucleotídica a los integrantes del grupo SS14-like pero ha mantenido la misma secuencia desde su primera detección lo que sugiere la estabilidad genética de este recombinante por 5 años.

Aunque solo se detectaron 2 genotipos en el periodo de estudio (2 años), el hecho de comenzar a detectar aislados recombinantes con mayor frecuencia en la población sugiere que la variabilidad genética encontrada en los aislados cubanos está sujeta a una presión selectiva positiva o sea que algunos recombinantes (ej. 15.7.3) pueden estar ganando atributos a lo largo de su evolución que les permita instaurarse en las poblaciones. Sin embargo, se deben llevar a cabo estudios futuros encaminados a un mejor entendimiento de la epidemiología de los recombinantes de TPA lo que pudiera impactar en el desarrollo de nuevos métodos diagnósticos y vacunas.

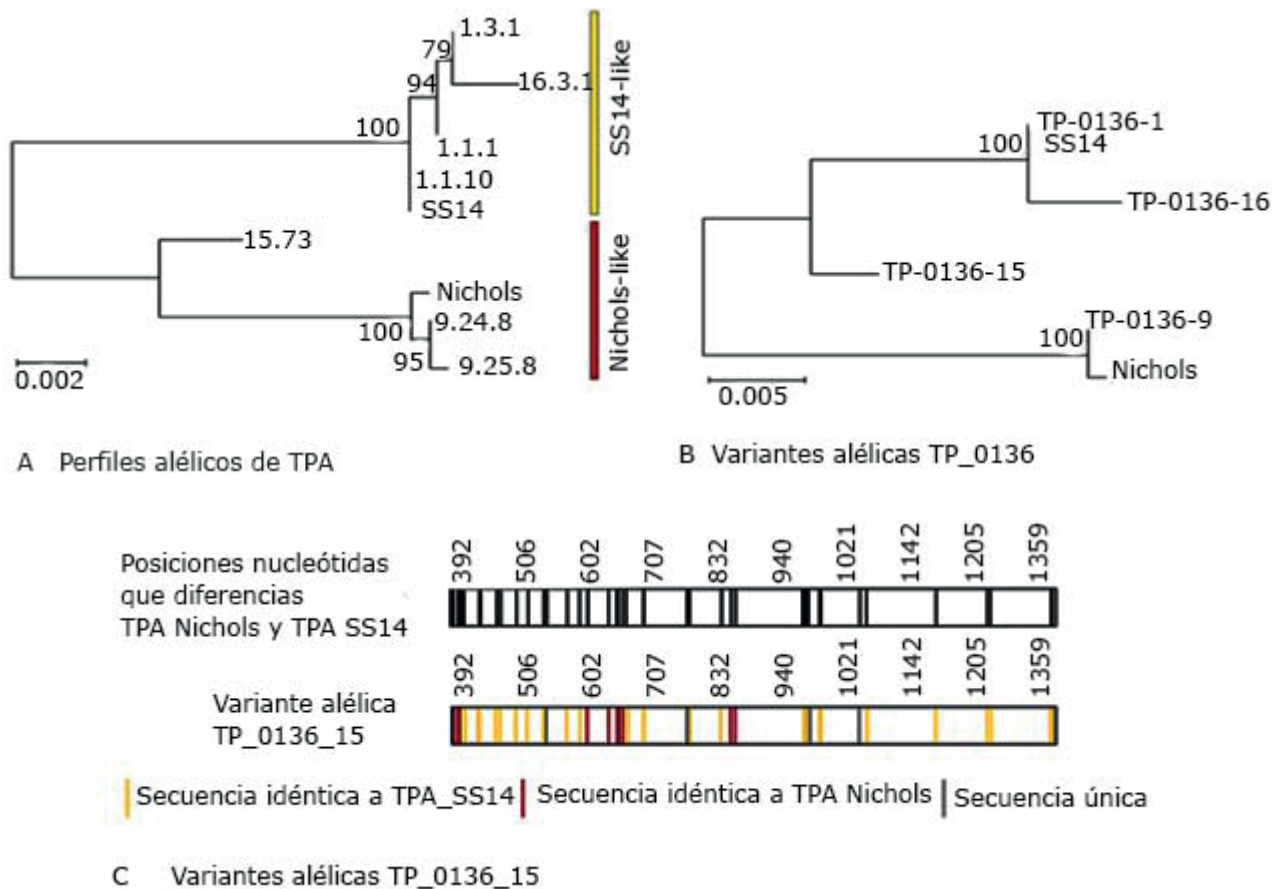


Fig. 1. A) Árbol filogenético de máxima verosimilitud construido en Mega 6 utilizando las secuencias concatenadas de los loci utilizados en el MLSA (TP0136, TP0548, TP0705; 2645 pb) en los perfiles alélicos o genotipos encontrados en la investigación (n = 69). Como referencia se utilizaron las secuencias CP004010.1 y CP004011.2 (según código de acceso en GenBank) de TPA Nichols y TPA SS14, respectivamente. B) Árbol filogenético de máxima verosimilitud de las variantes alélicas TP0136 (964 pb) obtenidas de los aislados de TPA cubanos. C) Esquema representativo de la proporción general de polimorfismos de simple nucleótido de la variante alélica TP_0136_15 con relación a las cepas de referencia descritas en el apéndice B de la presente figura.

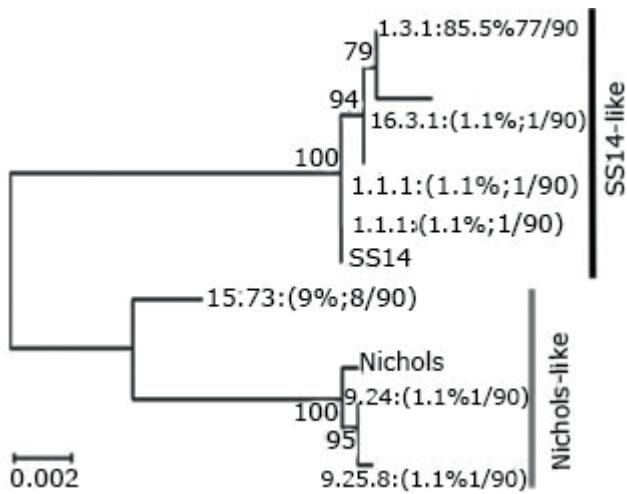


Fig. 2. Árbol filogenético que muestra los perfiles alélicos de TPA detectados en pacientes cubanos (2012-2019). Entre paréntesis se señala el porcentaje de aparición de cada genotipo unido a la fracción que le da origen.

Estudio 4: Identificación de la mutación A2058G en el ADNr 23S de TPA en aislados cubanos.

Las mutaciones puntuales están descritas como la principal fuente de variación en disímiles patógenos bacterianos incluyendo a TPA, y su ganancia en determinados casos se refleja en la modificación de caracteres en el microorganismo que le posibilita su adaptación a determinada condición (virulencia, modo de transmisión, resistencia a antimicrobianos, etc).⁽¹⁹⁾ En este caso particular la presencia de una guanina en vez de una adenina en la posición identificada como A2058 en el ADNr 23S de TPA confiere un fenotipo resistente a los ma-

crólidos,⁽²⁰⁾ terapia alternativa utilizada en pacientes alérgicos a la penicilina (antibiótico efectivo utilizado como tratamiento de primera línea) o aquellos que no elijan la vía inyectable de administración del antibiótico.

En el presente estudio, las dos repeticiones del gen ADNr 23S se amplificaron en muestras clínicas de 72 pacientes (97,3 %; 72/74) infectados con TPA lo que denota la elevada tasa de amplificación de este gen obtenida en las condiciones del ensayo. Los resultados de la secuenciación nucleotídica revelaron que 90,3 % (65/72) de los pacientes estudiados estaban infectados con TPA que contenían la mutación A2058G en ambos fragmentos génicos, lo que las clasifica como aislados resistentes a los macrólidos. Esta mutación se ha encontrado ampliamente diseminada a nivel mundial.^(9,13,21,22,23,24)

En la literatura científica existen reportes disímiles que muestran tasas variables en la frecuencia de aislados de TPA resistentes a macrólidos que oscilan desde 0,7 % en Taiwan y Madagascar hasta 100 % en China;⁽²⁵⁾ sin embargo, los valores de resistencia encontrados en Cuba son alarmantes (más de 90 %), constituyendo las cifras más elevadas en las Américas y comparadas solamente con determinadas regiones en China, Irlanda y Bélgica, donde la resistencia a macrólidos en TPA está reconocida como un problema latente (Figura 3).

La explicación más coherente para la emergencia de la resistencia a macrólidos en el contexto cubano es justamente la presión selectiva ejercida a los aislados de TPA por la elevada prescripción de la azitromicina en la práctica clínica en el tratamiento no solo de la sífilis, sino de infecciones respiratorias, de la piel y otras ITS; fenómeno que está unido a la

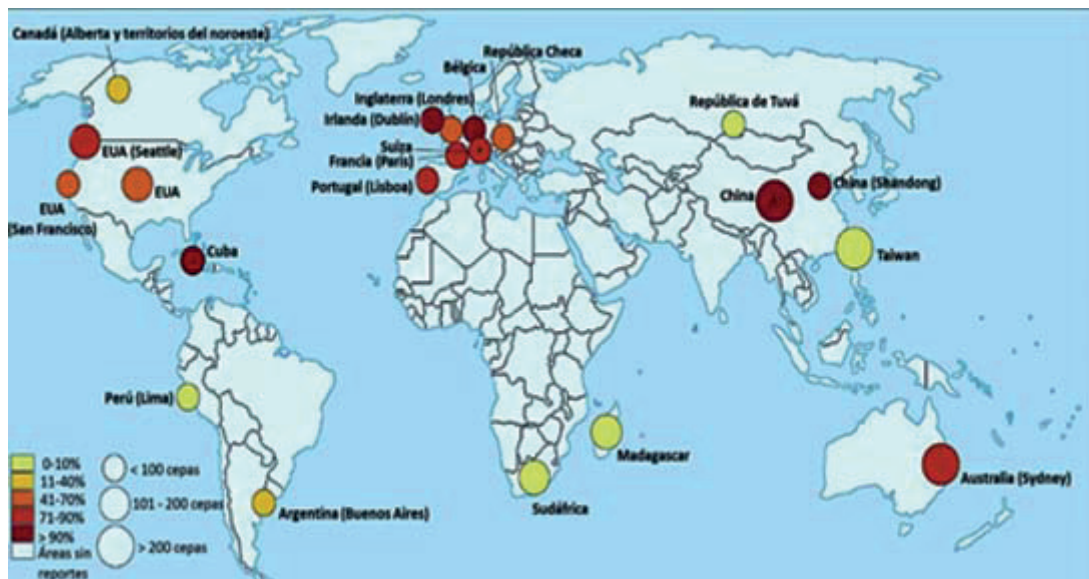


Fig. 3. Distribución geográfica de aislados de *T. pallidum* subsp. *pallidum* obtenidos de muestras clínicas humanas y que presentan la mutación A2058G. La frecuencia de los aislados resistentes a macrólidos se muestra con un código de colores.

elevada diseminación mundial del perfil alélico 1.3.1; que se ha encontrado altamente asociado ($p < 0,001$) al fenómeno de resistencia a macrólidos. (4,18,21)

Las cifras alarmantes de resistencia a macrólidos en TPA obtenidas en este estudio constituyen una alerta para las autoridades de salud pública de Cuba. Dichos resultados sugieren la eliminación de los macrólidos como antimicrobianos alternativos útiles para el control de la sífilis en las guías actuales para el tratamiento de esta ITS.

Estudio 5: Secuenciación de genoma completo de 11 aislados de TPA

La secuenciación de genoma completo después de aplicado el método de enriquecimiento de ADN de *Treponema*, mostró resultados satisfactorios ya que se logró descifrar más del 98 % de cada genoma examinado. Los genomas obtenidos de ambos grupos genéticos mostraron una conservación total de los bloques génicos a través del genoma. Sin embargo, se identificaron diferencias significativas entre ambos lados como se justifica en la figura 4.

La variabilidad observada entre los aislados del grupo Nichols-like fue superior en un orden de magnitud a la observada para los integrantes del grupo SS14-like. Los aislados Nichols-like mostraron acumulación de SNP en varios genes. La inspección manual de los genes con elevada variabilidad (más de 4 SNP con respecto a la cepa de referencia), mostró que el 49,5 % de la diversidad encontrada en estos aislados se justifica por eventos de recombinación intra e inter-aislados.

Los aislados de TPA del grupo Nichols-like representan en la actualidad una minoría (6 %) de los aislados circulantes en pacientes con sífilis según demuestran los estudios recientes de caracterización molecular. (18,26,27,28) Sin embargo, la circulación predominante de los aislados SS14-like podría justificarse por la reciente expansión de los mismos, por lo que no es sorprendente encontrar que los aislados SS14-like posean un mayor carácter clonal que los Nichols-like.

Los eventos de recombinación intra-aislados detectados fueron reagrupamiento de genes que codifican lipoproteínas (TP0856 y TP0858), espaciadores de ARNr y factores de virulencia putativos como *tprG* y *tprJ*.

El alelo *tprD2*, a diferencia de *tprD* (que difiere en 328 pb), codifica una proteína de membrana externa (Centurion-Lara et al., 2000), lo que sugiere un papel funcional de cada alelo durante el curso de la infección. En el presente estudio, los alelos *tprD2* se encontraron en todos los aislados de TPA secuenciados (pertenecientes tanto a SS14-like como a Nichols-like), a pesar del hecho de que anteriormente se creía que *tprD2* se encontraba exclusivamente entre aislados SS14-like y los alelos *tprD* entre aislados Nichols-like. (29,30,31)

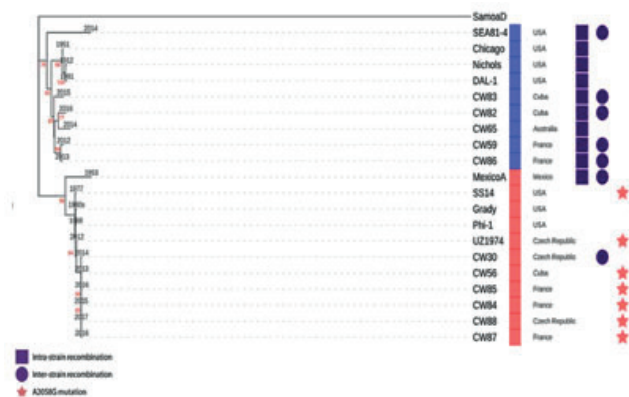


Fig. 4. Filogenia de las secuencias de genoma completo identificadas hasta la fecha. Las secuencias CW30 a CW88 se corresponden con los aislados secuenciados en la presente investigación. Las barras en violeta engloban los aislados de grupo genético *Nichols-like* mientras que las rojas contienen a los integrantes del grupo SS14-like. La recombinación intra-aislado está representada por cuadrados en violeta, los círculos del mismo color representan las recombinaciones inter-aislado y las estrellas muestran la presencia de la mutación A2058G que confiere resistencia a los macrólidos. Los años de obtención del aislado se muestran sobre las ramas del árbol y los valores de *bootstrap* (si son mayores a 60) se localizan en los nodos.

Finalmente, como resultado de la translocación recíproca, se identificó un patrón de espaciador de ARNr (*rrn*) inverso en uno de los aislados Nichols-like, sin embargo, el impacto de esta recombinación sigue sin entenderse completamente.

Los eventos de recombinación inter-aislado, definidos como recombinantes entre ambos grupos genéticos de TPA o entre subespecies diferentes de *T. pallidum*, se presentan en la Figura 5.

Si bien los eventos recombinantes intra-aislados son relativamente fáciles explicar, la presencia de recombinaciones inter-aislados requieren una transferencia de ADN a la bacteria receptora desde el exterior, probablemente durante la coinfección de pacientes con treponemas perteneciendo a 2 clados diferentes de TPA (Nichols-like o SS14-like) o 2 subespecies diferentes de *Treponema*.

Dada la evolución adaptativa que opera dentro de ambos clados de TPA, los *loci* recombinantes parecen ser importantes en la patogenia de las treponemas y las interacciones bacteria-hospederos. A pesar de que TPA contiene una pobre representación de antígenos expuestos en la superficie celular, la mayoría de los *loci* *tpr* y los recombinantes TP0136, TP0326, TP0462, TP0483, TP0488, TP0548 y TP0865 codifican proteínas de la membrana externa que son objetivos de interacciones con el sistema inmunológico o estructuras que permiten la unión a los tejidos del hospedero. (21,32,33) En general, estas proteínas deberían ser candidatas importantes para el desarrollo de vacunas.

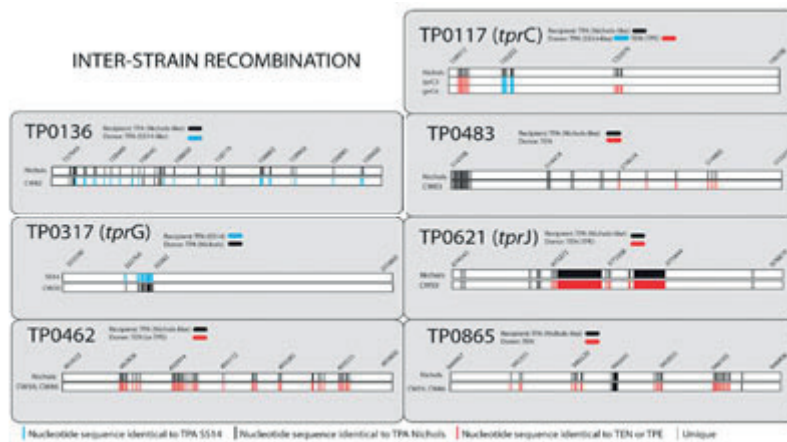


Fig. 5. Eventos de recombinación inter-aislados obtenidos en la presente investigación. Encima de las barras de cada *locus* recombinante se visualizan las coordenadas de acuerdo a la cepa de referencia Nichols (CP04010.1) y a la cepa de referencia SS14 (CP004011.2). Se esquematizan solo las posiciones con diferencias de nucleótidos. El donante y el receptor de secuencias génicas se describen en la parte superior de cada cuadro. La figura se presenta en idioma inglés, sin embargo, la misma se describe detalladamente en el presente pie de figura.

Conclusiones

Cada uno de los 5 estudios presentados sugieren una elevada variabilidad genética presente en aislados contemporáneos de *T. pallidum* obtenidos de pacientes cubanos. En particular, las secuencias genéticas mostraron genes con acumulación de mutaciones puntuales (diversidad de subtipos/genotipos y resistencia a antimicrobianos) y múltiples eventos de recombinación intra e inter-aislado mayormente en los representantes del grupo genético Nichols-like. Se demuestra por primera vez el aporte significativo de la recombinación a la diversidad genética en *T. pallidum* y en particular en aislados cubanos; de hecho, en cada uno de los eventos de recombinación descritos hay presencia de aislados autóctonos lo que sugiere un seguimiento estricto de recombinantes en el país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Giacani L, Lukehart SA. The endemic treponematoses. Clin Microbiol Rev. 2014;27(1): 89-115.
- MINSAP. Plan estratégico nacional para la prevención y el control de las ITS y el VIH/Sida / 2014-18. Cuba.2013.
- Marra C, Sahi S, Tantaló L, Godornes C, Reid T, Behets F, *et al.* Enhanced molecular typing of *Treponema pallidum*: geographical distribution of strain types and association with neurosyphilis. J Infect Dis. 2010;202(9):1380-8.
- Grillova L, Bawa T, Mikalova L, Gayet-Ageron A, Nieselt K, Strouhal M, *et al.* Molecular characterization of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Switzerland and France with a new multilocus sequence typing scheme. PLoS One. 2018;13(7):e0200773.
- Lukehart SA, Godornes C, Molini BJ, Sonnett P, Hopkins S, Mulcahy F, *et al.* Macrolide resistance in *Treponema pallidum* in the United States and Ireland. N Engl J Med. 2004;351(2):154-8.

- Dubourg G, Edouard S, Prudent E, Fournier PE, Raoult D. Incidental syphilis diagnosed by real-time PCR screening of urine samples. J. Clin. Microbiol. 2015;53,3707-3708. doi: 10.1128/jcm.01026-15.
- Chi KH, Danavall D, Taleo F, Pillay A, Ye T, Nachamkin E, *et al.* Molecular differentiation of *Treponema pallidum* subspecies in skin ulceration clinically suspected as yaws in Vanuatu using real-time multiplex PCR and serological methods. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2015;92,134-8. doi: 10.4269/ajtmh.14-0459.
- Grimes M, Sahi SK, Godornes BC, Tantaló LC, Roberts N, Bostick D, *et al.* Two mutations associated with macrolide resistance in *Treponema pallidum*: increasing prevalence and correlation with molecular strain type in Seattle, Washington. Sex Transm Dis. 2012;39(12):954-8.
- Khairullin R, Vorobyev D, Obukhov A, Kuular UH, Kubanova A, Kubanov 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(7):595-602.
- Cruz AR, Pillay A, Zuluaga AV, Ramirez LG, Duque JE, Aristizabal GE, *et al.* Secondary syphilis in Cali, Colombia: new concepts in disease pathogenesis. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(5):e690.
- Read P, Tagg KA, Jeffreys N, Guy RJ, Gilbert GL, Donovan B. *Treponema pallidum* Strain Types and Association with Macrolide Resistance in Sydney, Australia: New TP0548 Gene Types Identified. J Clin Microbiol. 2016;54(8):2172-4.
- Salado-Rasmussen K, Cowan S, Gerstoft J, Larsen HK, Hoffmann S, Knudsen TB, *et al.* Molecular Typing of *Treponema pallidum* in Denmark: A Nationwide Study of Syphilis. Acta Derm Venereol. 2016;96(2):202-6.
- Gallo-Vaulet L, Grillova L, Mikalova L, Casco R, Rodriguez Fermepein M, Pando MA, *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(2):e0172905.

14. Muller EE, Paz-Bailey G, Lewis DA. Macrolide resistance testing and molecular subtyping of *Treponema pallidum* strains from southern Africa. *Sex Transm Infect.* 2012;88(6):470-4.
15. Shuel M, Hayden K, Kadkhoda K, Tsang RSW. Molecular Typing and Macrolide Resistance of Syphilis Cases in Manitoba, Canada, From 2012 to 2016. *Sex Transm Dis.* 2018;45(4):233-6.
16. Giacani L, Ciccarese G, Puga-Salazar C, Dal Conte I, Colli L, Cusini M, et al. Enhanced Molecular Typing of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* Strains From 4 Italian Hospitals Shows Geographical Differences in Strain Type Heterogeneity, Widespread Resistance to Macrolides, and Lack of Mutations Associated With Doxycycline Resistance. *Sex Transm Dis.* 2018;45(4):237-42.
17. Strouhal M, Oppelt J, Mikalova L, Arora N, Nieselt K, Gonzalez-Candelas F, et al. Reanalysis of Chinese *Treponema pallidum* samples: all Chinese samples cluster with SS14-like group of syphilis-causing treponemes. *BMC Res Notes.* 2018;11(1):16.
18. Pospisilova P, Grange PA, Grillova L, Mikalova L, Martinet P, Janier M, 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(7): e0201068.
19. Giacani L, Chattopadhyay S, Centurion-Lara A, Jeffrey BM, Le HT, Molini BJ, et al. Footprint of positive selection in *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* genome sequences suggests adaptive microevolution of the syphilis pathogen. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(6):e1698.
20. Stamm LV. Global challenge of antibiotic-resistant *Treponema pallidum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(2):583-9.
21. Arora N, Schuenemann VJ, Jager G, Peltzer A, Seitz A, Herbig A, et al. Origin of modern syphilis and emergence of a pandemic *Treponema pallidum* cluster. *Nat Microbiol.* 2016;2:16245.
22. Pinto M, Borges V, Antelo M, Pinheiro M, Nunes A, Azevedo J, et al. Genome-scale analysis of the non-cultivable *Treponema pallidum* reveals extensive within-patient genetic variation. *Nat Microbiol.* 2016;2:16190.
23. Flores JA, Vargas SK, Leon SR, Perez DG, Ramos LB, Chow J, et al. *Treponema pallidum* subsp. *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(7):465-6.
24. Mikalova L, Grillova L, Osbak K, Strouhal M, Kenyon C, Crucitti T, et al. Molecular Typing of Syphilis-Causing Strains Among Human Immunodeficiency Virus-Positive Patients in Antwerp, Belgium. *Sex Transm Dis.* 2017;44(6):376-9.
25. Chen XS, Yin YP, Wei WH, Wang HC, Peng RR, Zheng HP, et al. High prevalence of azithromycin resistance to *Treponema pallidum* in geographically different areas in China. *Clin Microbiol Infect.* 2013; 19(10): 975-9.
26. Woznicova V, Smajs D, Wechsler D, Matejkova P, Flasarova 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;45(2):659-61.
27. Flasarova M, Pospisilova P, Mikalova L, Valisova Z, Dastychova E, Strnad R, 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(6):669-74.
28. Grillova L, Petrosova H, Mikalova L, Strnad R, Dastychova E, Kuklova I, 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(10):3693-700.
29. Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, White O, Sutton GG, Dodson R, et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science.* 1998;281(5375):375-88.
30. Zobaniková M, Mikolka P, Cejková D, Pospíšilová P, Chen L, Strouhal M, et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum* strain DAL-1. *Stand Genomic Sci.* 2012;7,12-21. doi: 10.4056/sigs.2615838.
31. Centurion-Lara A, Giacani L, Godornes C, Molini B J, Brinck Reid T, Lukehart SA. Fine analysis of genetic diversity of the tpr gene family among treponemal species, subspecies and strains. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:e2222. doi: 10.1371/journal.pntd.0002222.
32. Brinkman MB, McGill MA, Pettersson J, Rogers A, Matejkova P, Šmajš D, et al. A novel *Treponema pallidum* antigen, TP0136, is an outer membrane protein that binds human fibronectin. *Infect Immun.* 2008;76,1848-57. doi: 10.1128/IAI.01424-07.
33. Kumar S, Caimano MJ, Anand A, Dey A, Hawley KL, LeDoyt ME, et al. Sequence variation of rare outer membrane protein b-barrel domains in clinical strains provides insights into the evolution of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, the Syphilis Spirochete. *mBio.* 2018;9:e01006-18. doi: 10.1128/mBio. 01006-18.

Recibido: 29/05/2021

Aprobado: 15/08/2021

Agradecimientos

A los pacientes que participaron en la investigación.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Contribución de autoría

- Conceptualización: Angel Alberto Noda Ramos.
- Curación de datos: Angel Alberto Noda Ramos, Islay Rodríguez González.
- Análisis formal: Angel Alberto Noda Ramos, Orestes Blanco González, Yudeimys Espinosa López, Arianna Amarilis Rojas Perelló, Islay Rodríguez González. Adquisición de fondos: Angel Alberto Noda Ramos, Islay Rodríguez González.
- Investigación: Angel Alberto Noda Ramos, Orestes Blanco González, Yudeimys Espinosa López, Arianna Amarilis Rojas Perelló, Islay Rodríguez González.
- Metodología: Angel Alberto Noda Ramos, Yudeimys Espinosa López, Arianna Amarilis Rojas Perelló, Islay Rodríguez González.
- Administración del proyecto: Angel Alberto Noda Ramos, Islay Rodríguez González.

- Recursos: Angel Alberto Noda Ramos, Islay Rodríguez González.
- Software: Angel Alberto Noda Ramos.
- Supervisión: Orestes Blanco González, Islay Rodríguez González.
- Validación: Islay Rodríguez González.
- Visualización: Angel Alberto Noda Ramos, Orestes Blanco González, Yudeimys Espinosa López, Arianna Amarilis Rojas Perelló, Islay Rodríguez González.
- Redacción-borrador original: Angel Alberto Noda Ramos.
- Redacción-revisión y edición: Angel Alberto Noda Ramos., Orestes Blanco González, Yudeimys Espinosa López, Arianna Amarilis Rojas Perelló, Islay Rodríguez González.

Financiación

El financiamiento necesario para la investigación provino de los fondos otorgados a una beca de excelencia de la Confederación Suiza a Noda AA. (2016) y por un pproyecto del Ministerio de Salud de la República Checa (17-31333A).

Cómo citar este artículo

Noda Ramos AA, Blanco González O, Espinosa López Y, Rojas Perelló AA *et al.* Diversidad genética de *Treponema pallidum* en Cuba. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba* [internet] 2021[citado en día, mes y año];11(3):e1054. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1054>

