

# Detección molecular de sífilis gestacional y congénita

Andrea Tatiana Durán-Rodríguez<sup>1</sup>, Jeannette Navarrete-Ospina<sup>2</sup>, Liliana Constanza Muñoz-Molina<sup>2</sup>, Bibiana Chavarro-Portillo<sup>3</sup>, Leedy Arenas-Moreno<sup>4</sup>, Gladys Pinilla-Bermúdez<sup>2,\*</sup>

## Resumen

**Objetivo:** estandarizar una qPCR para la determinación de *T. pallidum* en muestras de suero de pacientes con sífilis gestacional y congénita.

**Materiales y métodos:** se optimizó una qPCR con sonda para la amplificación del gen *TpN47* en muestras de suero, se evaluó la sensibilidad, especificidad y eficiencia analítica de la técnica. Se comparó con pruebas serológicas (VDRL y TPPA) y se calculó índice de concordancia Kappa.

**Resultados:** la qPCR mostró un límite de detección de 0.113 femtogramos, especificidad analítica del 100% y fidelidad de 104%. Se evidenció correlación óptima en la prueba, sugerida por un  $r^2$  de 0.99 y un valor  $p < 0,0001$  de la qPCR. Se observó acuerdo entre las pruebas serológicas y moleculares.

**Conclusiones:** se desarrolló una herramienta molecular prometedora con buena sensibilidad, óptima especificidad analítica y gran potencial diagnóstico para la detección y hallazgo de *T. pallidum* subsp. *pallidum*, a través de la amplificación del gen *TpN47* en muestras clínicas de pacientes con diagnóstico presuntivo de sífilis gestacional y congénita.

**Palabras clave:** sífilis gestacional, sífilis congénita, *Treponema pallidum*, qPCR, pruebas serológicas.

## Molecular detection of gestational and congenital syphilis

### Abstract

**Objective:** to evaluate a qPCR to detect *T. pallidum* in serum samples from patients with gestational and congenital syphilis.

**Methodology:** qPCR with probe was optimized for the amplification of the *TpN47* gene in serum samples, the sensitivity, specificity and analytical efficiency of the technique were evaluated. It was compared with the serological tests (VDRL and TPPA) and the Kappa concordance index was calculated.

**Results:** the qPCR showed a detection limit of 0.113 femtograms, an analytical specificity of 100% and an accuracy of 104%. Optimal correlation was evidenced in the test, suggested by an  $r^2$  of 0.99 and a  $p$  value  $< 0.0001$  of the qPCR. An agreement was observed between serological and molecular tests.

**Conclusion:** a promising molecular tool was developed with good sensitivity, excellent analytical specificity and great diagnostic potential for the detection and finding of *T. pallidum* subsp. *pallidum*, through the amplification of the *TpN47* gene in serum from patients with gestational and congenital syphilis.

**Key words:** gestational syphilis, congenital syphilis, *Treponema pallidum*, qPCR, serological tests.

## Introducción

La sífilis es una infección de importancia epidemiológica, ya que afecta a la mujer en periodo de gestación y al feto<sup>1,2</sup>. El 1% de gestantes ha sido diagnosticada con sífilis gestacional (SG) siendo la segunda causa de muerte fetal a nivel mundial<sup>3,4</sup>. En Colombia la prevalencia de SG ha pasado de 7,4 casos en 2010 a 7,9 por 1000 nacidos vivos (NV) en 2017. A junio de 2018 el Instituto Nacional de Salud reportó 2.511 casos confirmados por laboratorio, con prevalencia de 3,8<sup>5</sup>. El Sivigila reportó en este mismo año para el departamento del

Choco una prevalencia de SG de 10.6 y una incidencia de SC de 5.88, siendo el indicar más alto de todos los departamentos<sup>6</sup>. El protocolo de vigilancia en salud pública frente a sífilis propone como estrategia fundamental para la reducción de los casos de SG y eliminación de la sífilis congénita (SC), la optimización de la cobertura y la calidad de la atención de los servicios de salud y el fortalecimiento de la detección y tratamiento de los casos de sífilis<sup>7</sup>.

La SC se presenta cuando la gestante transmite la infección al feto por vía hematógeno-trasplacentaria o durante el parto<sup>8</sup>. La

1 Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca-Colciencias, Bogotá, Colombia.

2 Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, Colombia.

3 Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

4 Laboratorio Departamental de Salud Pública del Choco. Quibdó, Choco, Colombia.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: gpinillab@unicolmayor.edu.co / gpinillab@gmail.com.

Teléfono: 57-1-2418800

Fax: 57-1-2841717, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Calle 28

No. 5B-02. Bogotá, Colombia.

Recibido: 11/05/2018; Aceptado: 24/02/2019

Cómo citar este artículo: A.T. Durán-Rodríguez, et al. Detección molecular de sífilis gestacional y congénita. Infectio 2020; 24(1):15-19

detección oportuna previene complicaciones como parto prematuro, bajo peso al nacer, muerte fetal, neonatal e infantil y enfermedades congénitas<sup>9,10</sup>. Su diagnóstico se dificulta debido a gestantes sin acceso a controles prenatales, signos inespecíficos en neonatos y resultados inconsistentes en el laboratorio<sup>11</sup>.

La serología como método diagnóstico en SC es utilizada de forma paralela con el suero de la madre y del neonato en el momento del parto<sup>7</sup>. Estas pruebas no son óptimas, ya que pueden afectarse por situaciones propias del paciente o de la técnica y no ofrecen un tamizaje diferencial. El problema central es distinguir el infante asintomático infectado del lactante no infectado, nacido de una madre con pruebas serológicas reactivas de sífilis. Esta dificultad se debe en gran parte a la incapacidad para distinguir la respuesta inmune humoral de la madre de la respuesta de anticuerpos específicos del neonato, ya que los anticuerpos tipo inmunoglobulina G pasan vía transplacentaria al feto<sup>12,13</sup>. Además, las técnicas serológicas no tienen especificidad suficiente para la detección de la enfermedad en los neonatos y su sensibilidad es baja (78%), por lo que se pueden presentar falsos positivos o falsos negativos<sup>14</sup>.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica rápida y precisa que puede descartar los falsos positivos de las pruebas no treponémicas. Se ha implementado para el diagnóstico oportuno de sífilis, tipificación de las cepas y evaluación de la resistencia antimicrobiana<sup>14,15,16</sup>. Varios genes diana de *T. pallidum*, agente causal, se han utilizado para la detección por PCR; estos incluyen los genes *tpf-1*, *tmpA*, *tmpB*, *bmp*, *polA*, *16S ADN* y *TpN47*<sup>11,17</sup>. El objetivo del presente estudio fue estandarizar una qPCR con sonda TaqMan dirigida al gen *TpN47*, para la determinación de *T. pallidum* en muestras de suero procedentes de pacientes con SG y SC, con el objetivo de ofrecer una técnica diagnóstica eficiente, sensible y específica que aporte a la detección oportuna de esta enfermedad.

## Materiales y métodos

Se realizó un estudio analítico para estandarizar y evaluar una qPCR con sonda en la detección de *T. pallidum* en muestras de suero de gestantes y neonatos. El estudio fue considerado sin riesgo (resolución número 8430 de 1993-MinSalud) y las muestras procesadas fueron obtenidas del banco de sueros del laboratorio departamental de salud pública del Choco.

Se procesaron un total de 100 muestras clínicas, 58 muestras procedentes de pacientes con resultados serológicos positivos y 42 sin evidencia clínica de sífilis es decir, sin sintomatología compatible con la enfermedad, sin eventos conductuales de riesgo y sin hallazgos de laboratorio sugestivos de infección (pruebas serológicas negativas).

A cada muestra después de su obtención se le realizó las pruebas serológicas; posteriormente se almacenaron a -20°C durante 6 meses y se descongelaron a temperatura ambiente para realizar la extracción de ADN.

Como control positivo se empleó ADN extraído de exudado de testículo de conejo infectado con la cepa de control Nichols de *T. pallidum* donada por Universidad de Washington (cada exudado estaba resuspendido en Buffer de lisis 2X (Tris 10 mM pH 8,0, SDS 0,5% y EDTA 0.1M pH 8,0) y el plásmido recombinante pJET1.2-TpN47 (con un inserto de 210 pb del gen *TpN47* de *T. pallidum*) obtenido mediante el *Kit CloneJET™ PCR Cloning* (Thermo Scientific™).

### Extracción de ADN

El ADN del plásmido pJET1.2-TpN47 se obtuvo con el kit UltraClean 6 minutos mini plasmid prep (MOBIO). El ADN de las muestras clínicas y el exudado de testículo de conejo fueron extraídos mediante el kit UltraClean® Blood spin DNA isolation (MOBIO), con un pretratamiento de proteinasa K (0.5 mg/ml) a 65°C por 1 hora.

### Sensibilidad, especificidad y eficiencia analítica de la qPCR

Para la detección del gen *TpN47* por qPCR se usaron los iniciadores TpN47-sifF GCTTGTTTAAGCCGTTG y TpN47-sifR AA-GAGTCAGGTGCAGTA<sup>18</sup>. Se utilizó el kit TaqMan 2X Universal PCR Master (Applied Biosystems) y oligo sonda con modificación 5' FAM- 3' BHQ diseñada (tabla 1); las condiciones para una reacción de 15 µl fueron Master mix 1X, primers sentido y antisentido 0.14 µM, sonda 0.10 µM, el volumen de ADN utilizado fue de 5ul. El programa de ciclaje comprende un ciclo de 50°C por 2 minutos (min), un ciclo de 95°C por 7 min seguido por 50 ciclos de 95°C por 30 s (segundos), 60°C por 30 s y 72°C por 5 s, la amplificación se llevó a cabo en el termociclador iQ5 (BioRad).

Para el límite de detección, se realizaron diluciones seriadas en base 10 del ADN de plásmido pJET1.2-TpN47 (concentración inicial de 113.5 nanogramos), y se elaboró curva estándar a partir de los valores de Ct obtenidos de 11 puntos de dilución por cuadruplicado, estos fueron graficados en el programa GraphPad Prism. A partir de la pendiente de la curva estándar se determinó la eficiencia de la reacción de amplificación. La especificidad analítica se evaluó empleando como molde de amplificación ADN de bacterias obtenidas de aislamientos clínicos como *S. epidermidis*, *E. coli* y *Klebsiella spp* y ADN de la cepa ATCC USA 300 de *S. aureus*.

Se evaluó la presencia de inhibidores en la qPCR escogiendo al azar muestras que no mostraron amplificación e infectándolas con 2 µl y 5 µl ADN de *Treponema pallidum subsp pallidum*. Adicionalmente se realizó control endógeno de la extracción amplificando en las muestras clínicas extraídas el gen β-actina humano.

### Pruebas serológicas

A todas las muestras se les realizó prueba treponémica TPPA (Serodia) y no treponémica VDRL test (Wiener lab).

### Detección del gen *TpN47* en las muestras clínicas

Se amplificó el gen *TpN47* con la qPCR estandarizada. Los resultados se consideraron negativos con Ct mayor o igual a 34 (amplificación tardía dilución 10<sup>-10</sup>).

**Concordancia**

Se evaluó la concordancia a partir del cálculo del índice Kappa entre las pruebas serológicas y qPCR.

**Resultados**

**Pruebas serológicas**

Las muestras evaluadas fueron obtenidas de 51 gestantes entre los 14 y 45 años de edad, del total de muestras 7 pertenecían a neonatos, todos de sexo masculino.

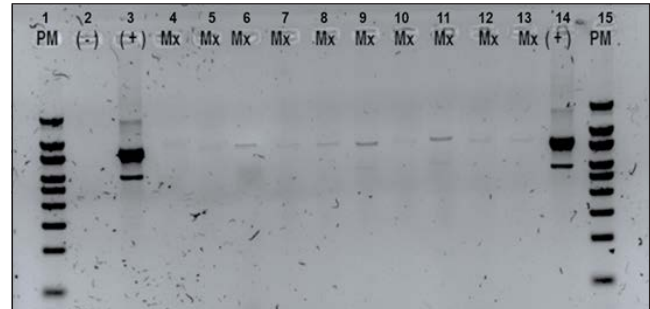
**qPCR sensibilidad y especificidad analítica**

El límite de detección fue 0,113 femtogramos (fg), la desviación estándar entre las réplicas por dilución de ADN del plásmido pJET1.2-TpN47 oscilo entre 0,01 y 0,09; no se detectó señal de amplificación en ADN de otras bacterias (especificidad analítica de 100%).

**Características de la qPCR**

En la fig.1a se observan las curvas de amplificación de las diluciones seriadas del ADN del plásmido pJET1.2-TpN47 y en la fig.1b la regresión lineal de los valores Ct con una pendiente de -3.11, reflejando una fidelidad de 104%. Se evidenció correlación óptima en la prueba, sugerida por un r2 de 0.99 y un valor p <0,0001 de la qPCR. En la tabla 3 se evidencian las características operativas de la qPCR estandarizada.

Todas las muestras clínicas infectadas con ADN de *T. pallidum* mostraron amplificación del gen *TpN47* lo que evidencio ausencia de inhibidores en las muestras extraídas. Adicionalmente, los sueros mostraron amplificación del gen beta actina lo que corroboró el éxito de la extracción de ADN (figura 2).



**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa 1.8% de los productos de amplificación del gen beta actina en muestras clínicas. **Carril 1.** Marcador de peso molecular 100 pb; **Carril 2.** Control negativo; **Carril 3.** Control positivo gen beta actina 800 pb; **Carriles 4-13.** Muestras clínicas; **Carril 14.** Control positivo gen beta actina 800 pb; **Carril 15.** Patrón de peso molecular 100 pb.

**Concordancia**

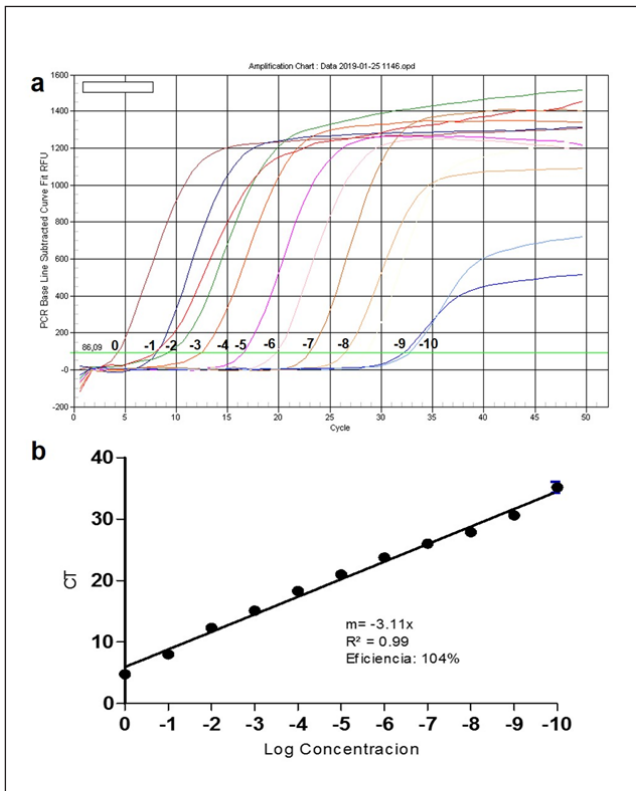
En la tabla 2 se compara la qPCR con las pruebas serológicas y en la tabla 3 se muestra el índice de concordancia kappa de 0,685 (IC 0,49, 0,87).

**Discusión**

La sífilis gestacional y congénita representan un desafío para la salud pública, por su alta morbilidad y mortalidad perinatal a nivel mundial; debido a la trasmisión materno-infantil y a las secuelas en los neonatos<sup>19</sup>. La detección molecular de la espiroqueta en los fluidos y tejidos del cuerpo tiene un enorme atractivo como estrategia de diagnóstico de sífilis, ya que proporciona una evidencia de infección activa; además, de un diagnóstico precoz para aquellos pacientes que se encuentran en periodo de ventana y para aquellos que no pueden asistir a análisis serológico secuencial<sup>15,20,21</sup>.

En el presente trabajo se logró la estandarización de una metodología molecular con sensibilidad analítica de menos de una copia del genoma bacteriano de *T. pallidum*, en comparación con otros reportes con límites de detección entre 1 pg (equivalentes 800 copias) y 2,3 copias del genoma<sup>9,15</sup>. La especificidad analítica fue del 100% y se logró una óptima eficiencia y linealidad en la reacción de qPCR (R<sup>2</sup> 0,99), además se observó una buena reproducibilidad entre las réplicas evaluadas de ADN del plásmido pJET1.2-TpN47. La comparación entre las pruebas serológicas y moleculares mostró una concordancia adecuada (kappa 0,685) y estos resultados son reproducibles con los reportados por Pinilla et al<sup>14</sup>.

Del total de muestras presuntivas de SC y SG, en 44 (75%) fue posible amplificar el gen *TpN47*, lo que evidencia que la qPCR TaqMan es una alternativa de diagnóstico que permite aumentar la sensibilidad de detección al amplificar una



**Figura 1. a.** Curva de amplificación de ADN del plásmido pJET1.2-TpN47 puro (0) y diluciones 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-10</sup>. **b.** Regresión lineal de valores CT de 10 diluciones seriadas de ADN del plásmido pJET1.2-TpN47. En azul se observa la desviación estándar entre réplicas. **CT:** cycle threshold. **m:** pendiente. **R<sup>2</sup>:** coeficiente de regresión.

región específica del gen *TpN47* por medio de la sonda de hidrólisis. Se ha propuesto que esta metodología permitiría evaluar la continuidad de la espiroquetemia en lactantes<sup>22,23</sup>.

Del total de muestras, 14 mostraron discrepancias (serología positiva-qPCR negativa) (tabla 2); 4 pertenecen a neonatos con pruebas serológicas reactivas (1-2 dils) esto puede estar asociado a infección antigua de la madre, por transferencia pasiva de anticuerpos a través de la placenta, ya que permanecen en circulación hasta los 15 meses de edad<sup>12,7</sup>. Respecto a las 10 muestras restantes podría tratarse de una infección muy reciente y por ende una carga treponémica indetectable; se deben contemplar factores como la presencia o no de las espiroquetas en el sitio de muestreo en el momento de toma y por otra parte el volumen utilizado en la reacción podría carecer de una copia completa del gen del antígeno de 47 KDa<sup>22,24</sup>. Se debe tener presente si el paciente recibió tratamiento previo, además de posibles reacciones cruzadas en las pruebas serológicas, puesto que su rendimiento puede disminuirse ante la presencia de infección concomitante, malignidad avanzada, embarazo y enfermedades vasculares del colágeno, en donde son frecuentes las reacciones falsas positivas asociadas a inflamación<sup>14,25</sup>.

Se evidenciaron 2 muestras con resultados serológicos negativos y qPCR positivos (tabla 2), los falsos negativos de las pruebas serológicas se pueden relacionar al efecto prozona en mujeres embarazadas, es decir las muestras evaluadas pueden ser fuertemente reactivas y producir una reacción inaparente interpretada como negativa. Además los pacientes pueden estar en periodo de ventana inmunológico o en estadio primario de la infección y por tanto los anticuerpos aun no son detectables<sup>26,27,28</sup>.

La alternativa molecular descrita tiene una buena sensibilidad y especificidad analítica, y por tanto es una herramienta molecular prometedora y con gran potencial diagnóstico para la detección y hallazgo de *T. pallidum subsp. pallidum*, a través de la amplificación del gen *TpN47* como diana en muestras clínicas; en este trabajo nos limitamos a realizar la optimización de la técnica; sin embargo, es de gran importancia validar la técnica para el diagnóstico y confirmación clínica, por medio de su evaluación en pacientes con diagnóstico confirmado de SG y/o SC en el binomio madre e hijo. En el presente estudio no fue posible evaluar el efecto prozona en las muestras evaluadas y se recomienda realizar este análisis en futuras investigaciones que comparen pruebas serológicas y moleculares.

## Agradecimientos

Al Departamento de Inmunopatología de la Sífilis de la Universidad de Washington, por suministrar el control positivo. Este proyecto recibió cofinanciación del programa Jóvenes Investigadores e innovadores por la paz Convocatoria 775 de 2017.

**Tabla 1.** Características de la Sonda *TpN47*-REMA

Sonda TaqMan	
Secuencia	5" CCG TGA ACC TTT ACG TTC GT 3"
Concentración de G y C	50%
nmol	28,0
Tm (C)	58.4
Modificación	5" FAM- 3" BHQ1

**Tm:** temperatura melting. **nmol:** nanomol

**Tabla 2.** Comparación de los resultados de la serología y la qPCR.

qPCR		Pruebas Serológicas		
		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	42	2	44
	Negativo	14	42	56
<b>Total</b>		56	44	100

**Tabla 3.** Características operativas de la qPCR estandarizada.

Característica	Resultados	
Sensibilidad analítica	0.113 fg	
Especificidad analítica	100%	
Coefficiente Kappa (entre pruebas)	0,685	(0,494, 0,875) IC (95%)

**IC:** intervalo de confianza.

## Financiación

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y Programa jóvenes investigadores e innovadores por la Paz, COLCIENCIAS Convocatoria 775 de 2017.

## Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que ha seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes

**Conflictos de interés.** Los autores declaran que no existen conflictos de interés de ninguna índole

## Referencias

- Duran A, Leguizamón L, Pinilla G. Desafíos en el diagnóstico de sífilis congénita. *Biociencias*. 2017; 1:31-8.
- Grillova L, Jolley K, Šmajs D, Picardeau M. 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:e618.
- Instituto Nacional De Salud. Informe de sífilis gestacional y sífilis congénita Colombia periodo VI año 2018. 2018.
- 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* 13(8): e0202619.

5. World Health Organization. Global Health Observatory (GHO) data. Antenatal care attendees who were positive for syphilis. 2016. Available at: <http://apps.who.int/gho/data/node.imr.PercposANC?lang=en>
6. Instituto Nacional de Salud. Informe de sífilis congénita. Periodo epidemiológico XIII 2018. 2018.
7. Instituto Nacional de Salud. Protocolo de Vigilancia en salud pública: sífilis gestacional y congénita. 2015.
8. Vanegas N, Cáceres Y, Jaimes C, Ángel E, Rubio A. Tratamiento de la sífilis gestacional y prevención de la sífilis congénita en un hospital público en Bogotá. *Revista de la Facultad de Medicina*. 2011; 59: 167-89.
9. Palmer H, Higgins S, Herring A, Kingston M. Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. *Sexually transmitted infections*. 2003; 79: 479-83.
10. Casal A, Silva O, Costa B, Araújo C, Corvelo O. 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: 451-56.
11. Liu H, Rodes B, Chen C, 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39: 1941-6.
12. Singh A, Levett N, Fonseca K, Jayaraman C, Lee E. Canadian Public Health Laboratory Network laboratory guidelines for congenital syphilis and syphilis screening in pregnant women in Canada. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*. 2015; 26 Suppl A: 23A-8A.
13. Grange A, Gressier L, Dion L, et al. Evaluation of a PCR test for detection of *Treponema pallidum* in swabs and blood. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012; 50: 546-52.
14. Pinilla G, Campos L, Durán A, Navarrete J, Muñoz L. Detección de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* para el diagnóstico de sífilis congénita mediante reacción en cadena de la polimerasa anidada. *Biomédica*. 2018; 38:121-35.
15. Gama A, Carrillo E, Hernández R, et al. *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* identification by real-time PCR targeting the *poA* gene in paraffin-embedded samples positive by immunohistochemistry. *Int J STD AIDS*. 2017; 28:1299-304.
16. Tevfik, Dorak. Real-time PCR. Taylor y Francis Group. 2006.
17. Pětrošová H, Pospíšilová P, Strouhal M, et al. Resequencing of *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* strains Nichols and SS14: correction of sequencing errors resulted in increased separation of syphilis treponeme subclusters. 2013; 8: 1-8.
18. Pinilla G, Chavarro B, Moreno N, Navarrete J, Muñoz L. Determinación de los genes, *16S ADNr*, *poA* y *TpN47*, en la detección de *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* para el diagnóstico de sífilis congénita. 2015; 13: 17-25.
19. Chowdhary N, Rani B, Mukunda K, Kiran N. Early detection of congenital syphilis. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2014; 32:333-7.
20. Santis MD, Luca CD, Mappa I, Spagnuolo T, Licameli A, Straface G, et al. Syphilis infection during pregnancy: Fetal risks and clinical management. *Infect Dis Obstet Gynaecol*. 2012; :1-5.
21. Cohen S, Klausner J, Engelman J, Philip S. Syphilis in the modern era: an update for physicians. *Infect Dis Clin North Am*. 2013; 27(4):705-22.
22. Grimprel E, Sanchez J, Wendel D, 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 1991; 29: 1711-8.
23. Pope V, Fox K, Liu H, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* from North and South Carolina. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(8): 3743-6.
24. Woznicova V, Šmajs D, Wechsler D, Matejškova 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011; 44: 659-61.
25. Herring A, Ballard R, Mabey D, Peeling R. Evaluation of rapid diagnostic tests: syphilis. *Nature Reviews Microbiology*. 2006; S33-S40.
26. Heymans R, van der Helm J, de Vries H, Fennema H, Coutinho A, Bruisten, S. Clinical Value of *Treponema pallidum* Real-Time PCR for Diagnosis of Syphilis. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(2):497-502.
27. Muhammad G, Ameeta E. Recent Trends in the Serologic Diagnosis of Syphilis. *Clinical and vaccine immunology: CVI*. 2015; 22(2), 137-47.
28. Organización panamericana de la salud-Organización Mundial de la salud. Diagnóstico situacional de sífilis materna y sífilis congénita en las 28 maternidades de la red de establecimientos del ministerio de salud durante el año 2009. OPS-OMS. 2010.