



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Diagnóstico molecular de la sífilis

Luis Otero Guerra^{a,b,c} y Fernando Vázquez Valdés^{cb,c,d,e,f,*}

^aServicio de Microbiología, Hospital Universitario de Cabueñes, Gijón, España

^bGrupo de Microbiología Translacional, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA)

^cGrupo de Estudio de Infecciones de Transmisión Sexual. GEITS, SEIMC

^dServicio de Microbiología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, España

^eÁrea de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo, España

^fInstituto Universitario Fernández Vega (IUFV) y Fundación de Investigación Oftalmológica (FIO), Oviedo, España



RESUMEN

Palabras clave:

Treponema pallidum

Reacción en cadena de la polimerasa

Sífilis/diagnóstico

Tipado molecular

La sífilis es una infección de transmisión sexual causada por *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, cuya incidencia está aumentando en España y en el resto del mundo. El diagnóstico se basa fundamentalmente en la serología, puesto que el diagnóstico directo mediante microscopía de campo oscuro presenta dificultades que limitan su generalización. Las técnicas de biología molecular pueden ser una herramienta útil para el diagnóstico en sífilis primaria y secundaria, si bien no todos los tipos de muestra se comportan igual. También son útiles para el diagnóstico de la sífilis congénita, mientras que para la neurosífilis, y debido a la baja sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa en el líquido cefalorraquídeo, no se recomiendan. Estas técnicas se han empleado para estudiar el controvertido origen de la sífilis, y mediante el sistema mejorado de los Centers for Disease Control and Prevention para realizar la tipificación que ayude a comprender mejor la epidemiología. Por último, las técnicas moleculares permiten determinar la presencia de mutaciones relacionadas con resistencia a los macrólidos, presentes en un porcentaje muy elevado de las infecciones.

© 2020 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Molecular diagnostic of syphilis

ABSTRACT

Keywords:

Treponema pallidum

Polymerase chain reaction

Syphilis/diagnosis

Molecular typing

Syphilis is a sexually transmitted infection caused by *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* with an increasing incidence in Spain and in the rest of the world. Diagnosis is based mainly on serology, since direct diagnosis by dark field microscopy presents difficulties that limit its widespread use. Molecular biology techniques can be a useful tool for diagnosis in primary and secondary syphilis, although not all types of samples show the same behaviour. These techniques are also useful for the diagnosis of congenital syphilis. They are not recommended, however, for neurosyphilis, due to the low sensitivity of polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid. These techniques have been used to study the controversial origin of syphilis, and, through the enhanced Centers for Disease Control method, to perform typing, which helps to elucidate the epidemiology of this infection. Finally, molecular techniques can detect mutations related to macrolide resistance, which are present in a very high percentage of infections.

© 2020 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: opsklins@gmail.com (F. Vázquez Valdés).

Introducción

La sífilis es una infección sistémica producida por *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* (TP) perteneciente a la familia *Spirochaetaeaceae*. Se denominan trepanomatosis no venéreas a las producidas por *T. pallidum* subsp. *pertenue*, *Treponema carateum* y *T. pallidum* subsp. *endemicum*, que causan el pián, pinta y el bejel o sífilis endémica, respectivamente. Todas ellas son morfológica y serológicamente indistinguibles entre sí, diferenciándose por la epidemiología, la clínica y mediante el empleo de técnicas de biología molecular.

TP se transmite por vía sexual (tanto vaginal como oral y anal) y por vía vertical. Las trepanomatosis no venéreas se transmiten generalmente durante la infancia en ambientes de pobreza mediante contacto cutáneo¹, si bien se han descrito en Japón casos de bejel con transmisión entre hombres que tienen relaciones con hombres (HSH)².

La sífilis es una infección que evoluciona en fases con diferentes manifestaciones clínicas, aunque la mitad de los pacientes afectados nunca desarrollarán signos ni síntomas, y en los que aparecen, pueden ser muy variados, especialmente en la sífilis secundaria, lo que le ha valido a esta enfermedad el apelativo de "la gran imitadora". Sin tratamiento, la evolución es lenta, pero el desarrollo de lesiones inflamatorias crónicas granulomatosas (gomos), la afectación cardiovascular y la afectación del sistema nervioso central pueden condicionar graves manifestaciones clínicas muchos años después de la infección.

El diagnóstico también presenta dificultades, especialmente en pacientes asintomáticos, gestantes, recién nacidos y en las fases iniciales de la infección.

El principal método diagnóstico es la serología, debido a la facilidad para la obtención de la muestra y a la automatización actual, que permite realizar el cribado y que proporciona el diagnóstico en pacientes asintomáticos. Es una técnica que no proporciona un diagnóstico definitivo, solo presuntivo³, precisando el empleo combinado de tests treponémicos y no treponémicos para poder informar un resultado positivo. Como desventajas tiene un período ventana desde la aparición de los primeros signos (chancro), lo que condiciona su sensibilidad, presenta reacciones falsas positivas y, en ocasiones, es difícil establecer la fase y evolución de la enfermedad.

Las técnicas directas, que determinan la presencia de TP en las lesiones, proporcionan el diagnóstico definitivo; entre ellas están: a) la infectividad en conejo, que solo está al alcance de centros muy especializados, y aunque recientemente se ha conseguido el cultivo de TP *in vitro* durante más de 6 meses⁴, no son métodos aplicables a la rutina diaria; b) el examen microscópico, que precisa de equipamiento no disponible en todos los laboratorios (microscopio de campo oscuro), microscopista experto y con disponibilidad inmediata para la observación de las preparaciones, que no se puede demorar más allá de 30 min desde la recogida de la muestra de las lesiones exudativas. La microscopía no es válida en muestras en las que puede haber treponemas saprófitos, como en la boca.

Las técnicas de biología molecular también proporcionan diagnóstico directo y solventan la mayoría de las limitaciones de la microscopía de campo oscuro, lo que unido a la comercialización de equipos para estas técnicas, suponen una alternativa diagnóstica aún poco explorada en muchos centros. Recientemente se ha publicado en esta revista una revisión de los aspectos generales referidos a la clínica, diagnóstico y tratamiento de la sífilis⁵, por lo que el objetivo de este artículo será profundizar en el papel de las técnicas de biología molecular en el estudio de TP, que ha permitido el progreso en el conocimiento de varios aspectos de la infección, como los relativos a su origen y diseminación de la enfermedad, la tipificación epidemiológica, el diagnóstico en la sífilis primaria y las implicaciones de la detección de la bacteriemia y la detección de resistencias a macrólidos.

Orígenes de la sífilis

Usando técnicas de captura de ADN y secuenciación masiva⁶, en 70 muestras de 12 países de los años 2012 y 2013 y de 1912 en adelante, encontraron un ancestro común en la era moderna. Aunque no resuelven la pregunta acerca de si el origen fue americano o europeo en el siglo XVI, este análisis indica que el contexto de diseminación de un linaje de proporciones pandémicas fue posterior a la colonización americana. Además, la aparición de resistencia a macrólidos también es moderna.

En realidad, la relación filogenética entre treponemas y su evolución histórica es controvertida. Se propuso que la pinta era la forma original que dio lugar al bejel y después a la sífilis endémica y finalmente a la sífilis⁷. Otro autor planteó que todas ellas eran la misma enfermedad con distintas manifestaciones clínicas⁸; en este sentido, se vio que había una falta de distinción molecular de estas subespecies⁹ y que las no sifilíticas (pián y endémica) eran de origen más temprano. El principal problema de estos estudios es que no se han realizado con métodos de secuenciación masiva¹⁰. Durante la primera fase evolutiva, las 3 subespecies se separaron y formaron ancestros tempranos, se calcula que hace 879 (sífilis) y 799 años (endémicas), respectivamente. En este estudio¹⁰, todas las subespecies muestran un ancestro común y tuvieron el mismo origen y la cepa de TP se originó en Norteamérica. La epidemia global de TP reciente se originó más temprano que las endémicas (hace 510 frente a 421 años), lo que apunta a una variación genética de conversión en los genes *tprG* y *tprJ*, sugiriendo que las cepas más tempranas de TP fueron de Norteamérica a Europa, y aquí dieron lugar a 2 linajes distintos¹⁰.

Otra aplicación de los métodos moleculares ha sido en la reconstrucción del origen y evolución de la enfermedad en los estudios arqueológicos¹¹.

Epidemiología

La sífilis es una infección cada vez más frecuente. Según estimaciones de la OMS, en el año 2016 hubo 6 millones de nuevos casos, con una tasa de 170 casos por 100.000 mujeres y 160 casos por 100.000 varones (entre 15 y 49 años)¹².

En Europa, el European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), constata un incremento de la incidencia desde el año 2011. Así, en 2017 se declararon 33.189 casos confirmados, lo que representa una tasa de 7,1 casos por 100.000 habitantes (6,1 en 2016). Es 9 veces más frecuente en varones que en mujeres, con un pico en los varones de entre 25 y 34 años (tasa de 28 casos por 100.000). Esta tendencia ascendente en la incidencia se debe fundamentalmente al aumento de infecciones entre los varones, especialmente los HSH, que suponen el 67% de todos los casos declarados¹³.

En España, las tasas se fueron incrementando de forma paulatina desde el mínimo observado en el año 2001 (1,77 casos por 100.000 habitantes), hasta alcanzar una estabilización entre los años 2010 y 2016 (tasas de 7-8 casos por 100.000 habitantes), pero los últimos datos de 2017 con 4.941 casos notificados (tasa de 10,61 por 100.000 habitantes) suponen un importante retroceso en el control de esta enfermedad¹⁴.

Ya se ha señalado que la mayor parte de los casos de sífilis se encuentran en HSH, probablemente relacionado con factores de riesgo que se dan en parte de esta población, como un elevado número de contactos sexuales, que pueden ser anónimos mediante contacto en redes sociales o en clubes y saunas, y especialmente debido a relaciones sexuales desprotegidas¹⁵⁻¹⁷. El fenómeno del chemsex, en el que se consumen drogas para estimular y alargar los contactos sexuales, habitualmente en grupo, es otro factor de riesgo importante¹⁸, así como ser VIH positivo, y se encuentra un incremento del riesgo con el tratamiento antirretroviral, probablemente derivado de la disminución de percepción de riesgo y el menor uso de preservativos¹⁹.

Para abordar el incremento en la incidencia de la sífilis con medidas basadas en la prevención, debemos ser capaces de identificar grupos nucleares, las dinámicas de transmisión, la relación con factores conductuales y otros factores epidemiológicos, y todo ello no se consigue sin un adecuado sistema de tipificación de TP.

Tipificación

Puesto que a efectos prácticos TP no se puede cultivar, se debe recurrir a métodos moleculares para la identificación de cepas.

El genoma de TP contiene regiones polimórficas apropiadas para técnicas de tipificación. La más usada hasta ahora fue desarrollada en 1998 y mejorada en 2010 y se suele denominar como "método mejorado de los CDC (E-CDC)"^{20,21}. Se basa en el análisis de 3 regiones diferentes: el número de repeticiones del gen *arp* ("acidic repeat protein gene"), el patrón obtenido mediante enzimas de restricción (MseI) de los genes *tpr* ("Treponema pallidum repeat gene"; *tprE*, *tprG* y *tprJ*) y la secuenciación de parte del gen *tp0548*. Otras modificaciones propuestas incluyen los genes *tp0279* y *tp0136*, pero el método E-CDC es el más empleado, ya que ha demostrado estabilidad en las cepas después de pases sucesivos en conejo.

Mediante estas técnicas se han sugerido que las cepas 14a/a y 14d/f tienen el mayor grado de neuroinvasividad²², y que las cepas 14d/g y 8d/g podrían causar sífilis ocular²³. Sin embargo, recientemente otros autores en Ámsterdam no hallaron relaciones entre los diferentes tipos encontrados y características demográficas o clínicas, siendo el tipo 14d/g el más frecuente (23%) en la población estudiada²⁴.

También recientemente en Barcelona, Fernández-Naval et al²⁵, mediante el sistema E-CDC consiguieron estudiar 62 cepas de origen genital, y obtuvieron 21 patrones diferentes, de los que el más frecuente fue el 14d/g (27,4%).

Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de la sífilis se ha realizado clásicamente mediante la detección directa por microscopía de campo oscuro y fundamentalmente por serología²⁶.

Las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se describieron por primera vez en 1990, y desde entonces han ido evolucionando en su formato y dianas²⁷. A la PCR cualitativa inicial, le siguieron *nested* PCR, PCR a tiempo real (PCR TR) y, más recientemente, formatos multiplex. Las principales dianas descritas son los genes *bmp*, *tp47* y *polA*, la última de ellas es la más usada. El ADN de TP se ha encontrado en muestras de exudados de úlceras, líquido cefalorraquídeo (LCR), sangre, orina y diferentes tejidos, pero su principal utilidad es en úlceras y lesiones exudativas en pacientes con sífilis primaria y secundaria.

En un metaanálisis se vio que la sensibilidad de la PCR es del 78,4% en úlceras y chancros anales, mientras que la muestra de sangre presenta su mayor sensibilidad en casos de sífilis congénita, con un 83%, y de sífilis secundaria, con el 52,2%, por lo que según estos autores, la PCR sería útil para el diagnóstico en úlceras, especialmente cuando la serología es negativa y en situaciones de elevada prevalencia epidemiológica, aunque también afirman que serviría más para confirmar el diagnóstico que para excluirlo²⁸.

Por el contrario, otros autores encuentran que en su experiencia, la PCR obtenida de chancros sugestivos de lesión sifilítica solo aporta un 3% de diagnósticos a los proporcionados por la serología, concluyendo que tiene un valor muy limitado, ya que la serología tiene un valor predictivo negativo del 99% en su estudio²⁹.

La PCR TR determina la carga bacteriana, y esta varía en función del estadio y por la actividad de la infección, lo que puede tener importancia en predecir la actividad de la enfermedad, la respuesta al tratamiento e identificar a los pacientes con cura serológica³⁰. Aunque en el caso de otras muestras como sangre total, en la sífilis secundaria puede ser positiva en algunos pacientes, no se aconseja

para estos estadios fuera de la lesión de úlcera. En el caso de biopsias cutáneas, la sensibilidad varía entre el 39 y el 75%^{31,32}. En un estudio que determinó la carga bacteriana de TP se vio que esta es heterogénea y alta en sífilis primaria, independientemente del sitio anatómico, reflejando la diferencia de duración de los chancros y su resolución; en el caso de la sífilis secundaria en sangre, se vio la alta dispersión de las concentraciones de bacterias y la baja o nula detección cuando permanece oculta en los nichos propios de la sífilis³³.

Para muestras de tejidos en parafina y usando como diana el gen *polA* se ha visto buena sensibilidad de estas técnicas³⁴. En otro estudio se usó con éxito también la técnica de FISH (hibridación fluorescente in situ)³⁵. Puede ser útil para casos inciertos de tejidos como aspiración con aguja fina de nódulos linfáticos de pacientes con sífilis secundaria o latente³⁶. Otra posibilidad es el diagnóstico de sífilis congénita mediante tejido de placenta³⁷. En el caso de la neurosífilis, los datos de una revisión de artículos encuentran una baja sensibilidad frente a la serología³⁸.

En el momento actual, las principales guías de diagnóstico^{3,39,40} establecen que el papel de las PCR se limita a la detección de TP en las lesiones en las que se pueda sospechar de su existencia, especialmente si pudiesen existir treponemas saprófitos, como en la boca. Es válida para tejidos y humor acuoso, pero poco recomendable por su baja sensibilidad en sangre y en LCR. En pacientes VIH positivos con serologías de sífilis repetidamente negativas y sospecha clínica, la PCR de las lesiones también es de utilidad. En sífilis congénita, la positividad de PCR de TP en muestras de placenta, tejidos y exudativas del niño, típicamente de fosas nasales, proporcionan un diagnóstico definitivo.

El papel de las técnicas moleculares irá aumentando a medida que haya plataformas comerciales y automatizadas que complementen a la serología en el caso de la sífilis primaria y la detección de resistencias. La comercialización de técnicas en formato multiplex que proporciona el diagnóstico etiológico de los principales agentes responsables de las úlceras genitales (TP, virus herpes simplex, *Chlamydia trachomatis* productora de linfogranuloma venéreo, *Haemophilus ducreyi*) está permitiendo a los clínicos y al laboratorio disponer de técnicas moleculares para patógenos que hasta ahora eran de difícil diagnóstico, y probablemente permitirá la generalización del diagnóstico directo de la sífilis prescindiendo de la microscopía de campo oscuro, si bien la serología seguirá siendo una herramienta diagnóstica a la que seguiremos recurriendo.

En la tabla 1 se expone de forma resumida las principales características de las diferentes PCR para TP.

Resistencia antimicrobiana

Después del uso durante más de 70 años de penicilina, no se han encontrado resistencias, que hipotéticamente no se produciría por mutaciones simples, sino mediante la adquisición de información genética nueva mediante transferencia horizontal de genes o mediante un proceso de mutaciones múltiples. Se postula la lipoproteína Tp47 como eventual candidata a desarrollar una variante que confiera resistencia a la penicilina mediante su unión a la penicilina y su actividad betalactamasa⁴¹.

Los macrólidos no son una de las primeras opciones de tratamiento de la sífilis, pero ya han aparecido resistencias a eritromicina, azitromicina y espiramicina⁴². En 1977 se describieron resistencias a eritromicina con la cepa 14 Street; el mecanismo de estas resistencias es cromosómico con mutaciones A2058G y A2059G en el gen 23S ARNr. La primera de las mutaciones se describió en Estados Unidos, Canadá y China, mientras que la segunda lo fue en la República Checa, Colombia y Reino Unido⁴³. Esta resistencia a macrólidos parece ir en aumento, aunque la frecuencia descrita puede ser muy variable entre series (el 0,7% en Taiwán y el 80% en Sidney), por lo que el tratamiento con macrólidos no se debería utilizar sin seguimiento, tal como recomiendan todas las guías³⁰.

Tabla 1
Características de las diferentes PCR para el diagnóstico de *Treponema pallidum*

Factor	Importancia	Comentarios
Estadio sífilis		
Primaria	Usar pronto en este estadio	
	PCR: S: 84,6-89,1% y E: 93,1-100%	Adecuado en chancros. Casos atípicos en amígdalas, vertebrales y oculares
	PCR <i>nested</i> : S: 70% y E: 95%	Utilidad en el diagnóstico inicial. Posible utilidad pronóstica: correlación con títulos de RPR
	PCR TR: formato rápido y sencillo	S más baja en muestras no invasivas que no sean piel o úlceras
		No apropiado para cribado. Posible interés para gravedad de la infección
		Calcula la cantidad de TP, pero difícil estandarización: según el tipo de muestra y el método de extracción
	PCR múltiple: más S que la serología	Podría ser el método de cribado. Reduce costes y tiempo al testar varios patógenos a la vez
Secundaria	PCR: S: 50-81,1% y E: 100%	
	LAMP: mejor S y E en sangre periférica	
Neurolúes	PCR: S: 40-70% y E: 60-100%	La diana con <i>Tpp47</i> S: 68% y E: 91,9%
Tipo de muestra	Mejor en úlceras y tejidos. No eficaz en otras	
	Suero mejor que sangre completa	
Diana	Más usado <i>po1A</i> y <i>Tpp47</i>	Sin diferencias en S y E entre <i>po1A</i> y <i>Tpp47</i>
	Otras: <i>bmp</i> , <i>trp</i> , <i>arp</i>	Se están buscando nuevas dianas
Extracción ADN	Física o química (la más usada). No comparaciones	A mejorar con menos eluido y reducción de contaminación y degradación
Coinfecciones	No hay interferencia	Se puede realizar PCR múltiple y confirmación con otras
Otros	Personal, equipos, estadísticas	Hay falta de formación y se debe tener un mantenimiento de equipos

E: especificidad; LAMP: PCR isotérmica; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; S: sensibilidad; TR: tiempo real.

Las mutaciones pueden detectarse mediante amplificación de una secuencia específica del gen *23S rRNA* y su posterior secuenciación, si bien se ha descrito una PCR TR que detecta las 2 mutaciones, permite la identificación rápida de estas resistencias y, por tanto, tendría interés en los casos en los que se tenga que recurrir a tratamientos con macrólidos⁴⁴.

Las resistencias a tetraciclinas se buscan en las posiciones 965 y 1058 del gen *16S rRNA*, y son muy poco frecuentes.

En Ámsterdam²⁴ encontraron que un 88% de las cepas estudiadas presentaban mutaciones A2058G que confieren resistencia a macrólidos, si bien no encontraron ninguna mutación en la posición 2059.

En Barcelona²⁵ se han encontrado mutaciones que confieren resistencia a macrólidos en el 95% de las cepas estudiadas, mientras que para tetraciclinas estaban ausentes.

Como conclusión final podemos señalar que las técnicas de diagnóstico molecular de la sífilis están experimentando importantes avances que nos van a permitir, no solo hacer diagnósticos directos de las lesiones que produce esta infección, sino también conocer con más detalle su epidemiología y poder hacer vigilancia de la aparición de resistencias antimicrobianas.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Giacani L, Lukehart SA. The endemic treponematoses. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27:89-115.
- Kawahata T, Kojima Y, Furubayashi K, Shinohara K, Shimizu T, Komano J, et al. Bejel, a Nonvenereal Treponematoses, among Men Who Have Sex with Men, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2019;25:1581-3.
- Workowski KA, Bolan GA; Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR Recomm Rep.* 2015;64:1-137.
- Edmondson DG, Hu B, Norris SJ. Long-term *in vitro* culture of the syphilis spirochete *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *mBio.* 2018;9:e01153-18.
- Arando M, Otero-Guerra L. Sífilis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2019;37:398-404.
- Arora N, Schuenemann VJ, Jäger G, Peltzer A, Seitz A, Herbig A. Origin of modern syphilis and emergence of a pandemic *Treponema pallidum* cluster. *Nature Microbiology.* 2016;2:16245.
- Cockburn TA. The origin of the treponematoses. *Bull World Health Organ.* 1961;24:221-8.
- Hudson EH. Treponematoses in perspective. *Bull World Health Organ.* 1965;32:735-48.
- Armelagos GJ, Brown PJ, Turner B. Evolutionary, historical and political economic perspectives on health and disease. *Soc Sci Med.* 2005;61:755-65.
- Sun J, Meng Z, Wu K, Liu B, Zhang S, Liu Y, et al. Tracing the origin of *Treponema pallidum* in China using next generation sequencing. *Oncotarget.* 2016;7:42904-18.
- Kolman CJ, Centurion-Lara A, Lukehart SA, Owsley DW, Tuross N. Identification of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* in a 200-year-old skeletal specimen. *J Infect Dis.* 1999;180:2060-3.
- World Health Organization. Report on global sexually transmitted infection surveillance, 2018. Geneva: WHO; 2018 [consultado 6-8-2019]. Disponible en: <https://www.who.int/reproductivehealth/publications/stis-surveillance-2018/en/>
- European Centre for Disease Prevention and Control. Syphilis. En: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019.
- Unidad de vigilancia del VIH y conductas de riesgo. Vigilancia epidemiológica de las infecciones de transmisión sexual, 2017. Madrid: Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III/Plan Nacional sobre el Sida, Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación; 2019.
- Champenois K, Cousien A, Ndiaye B, Soukouna Y, Baclet V, Alcaraz I, et al. Risk factors for syphilis infection in MSM results of a case-control study in Lille, France. *Sex Transm Infect.* 2013;89:128-32.
- Imrie J, Lambert N, Mercer CH, Copas AJ, Phillips A, Dean G, et al. Refocusing health promotion for syphilis prevention: results of a case-control study of men who have sex with men on England's south coast. *Sex Transm Infect.* 2006;82:80-3.

17. Paz-Bailey G, Meyers A, Blank S, Brown J, Rubin S, Braxton J, et al. A case-control study of syphilis among men who have sex with men in New York City association with HIV infection. *Sex Transm Dis.* 2004;31:581-7.
18. Fernández-Dávila P. "Sesión de sexo, morbo y vicio": una aproximación holística para entender la aparición del fenómeno ChemSex entre hombres gays, bisexuales y otros hombres que tienen sexo con hombres en España. *Revista Multidisciplinar del Sida.* 2016;4:41-65.
19. Katz MH, Schwarcz SK, Kellogg TA, Klausner JD, Dilley JW, Gibson S, et al. Impact of highly active antiretroviral treatment on HIV seroincidence among men who have sex with men: San Francisco. *Am J Public Heal.* 2002;9292:388-94.
20. Pillay A, Liu H, Chen CY, Holloway B, Sturm AW, Steiner B, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. *Sex Transm Dis.* 1998;25:408-14.
21. 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;202:1380-8.
22. Tantaló LC, Lukehart SA, Marra CM. *Treponema pallidum* strain-specific differences in neuroinvasion and clinical phenotype in a rabbit model. *J Infect Dis.* 2005;191:75-80.
23. Oliver S, Sahi SK, Tantaló LC, Neblett Fanfair R, Markowitz LE, Lukehart SA, et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* in ocular syphilis. *Sex Transm Dis.* 2016;43:524-7.
24. Zondag HCA, Cornelissen AR, Van Dam AP, Bruisten SM. Molecular diversity of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* isolates in Amsterdam, the Netherlands. *Sex Transm Infect* 2019. doi:10.1136/sextrans-2019-054044.
25. Fernández-Naval C, Arando M, Espasa M, Antón A, Fernández-Huerta M, Silgado A, et al. Enhanced molecular typing and macrolide and tetracycline-resistance mutations of *Treponema pallidum* in Barcelona. *Future Microbiol.* 2019;14:1099-108.
26. Galán Montemayor JC, Lepe Jiménez JA, Otero Guerra L, Serra Pladevall J, Vázquez Valdés F. Diagnóstico microbiológico de las infecciones de transmisión sexual y otras infecciones genitales. En: Vázquez Valdés F, coordinador, Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R, editores. *Procedimiento en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC);* 2018.
27. Hay P, Clarke J, Strugnell R, Taylor-Robinson D, Goldmeier D. Use of the polymerase chain reaction to detect DNA sequences specific to pathogenic treponemes in cerebrospinal fluid. *FEMS Microbiol Lett.* 1990;56:233-8.
28. Gayet-Ageron A, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger TV, Combescure C. Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis: a systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect.* 2013;89:251-6.
29. Brischetto A, Gassiep I, Whiley D, Norton R. Retrospective review of *Treponema pallidum* PCR and serology results: Are both tests necessary? *J Clin Microbiol.* 2018;56:e01782-17.
30. Tipple C, Taylor GP. Syphilis testing, typing, and treatment follow-up: a new era for an old disease. *Curr Opin Infect Dis.* 2015;28:53-60.
31. Behrhof W, Springer E, Brauning W, Kirpatrick CJ, Weber A. PCR testing for *Treponema pallidum* in paraffin-embedded skin biopsy specimens: test design and impact on the diagnosis of syphilis. *J Clin Pathol.* 2008;61:390-5.
32. Buffet M, Grange PA, Gerhardt P, Carlotti A, Calvez V, Bianchi A, et al. Diagnosing *Treponema pallidum* in secondary syphilis by PCR and immunohistochemistry. *J Invest Dermatol.* 2007;127:2345-50.
33. Pinto M, Antelo M, Ferreira R, Azevedo J, Santo I, Borrego MJ, et al. A retrospective cross-sectional quantitative molecular approach in biological samples from patients with syphilis. *Microb Pathog.* 2017;104:296-302.
34. Gama A, Carrillo-Casas EM, Hernández-Castro R, Vázquez-Aceituno VA, Toussaint-Caire S, Xicohtencatl-Cortes J, 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.
35. Petrich A, Rojas P, Schulze J, Loddenkemper C, Giacani L, Schneider T, et al. Fluorescence in situ hybridization for the identification of *Treponema pallidum* in tissue sections. *Int J Med Microbiol.* 2015;305:709-18.
36. Kouznetsov AV, Prinz JC. Molecular diagnosis of syphilis: the Schaudinn-Hoffmann lymph-node biopsy. *Lancet.* 2002;360:388-9.
37. Genest DR, Choi-Hong SR, Tate JE, Qureshi F, Jacques SM, Crum C. Diagnosis of congenital syphilis from placental examination: comparison of histopathology, Steiner stain, and polymerase chain reaction for *Treponema pallidum* DNA. *Hum Pathol.* 1996;27:366-72.
38. Marks M, Lawrance D, Kositz C, Mabey D. Diagnostic performance of PCR assays for the diagnosis of neurosyphilis: a systematic review. *Sex Transm Infect.* 2018;94:585-8.
39. Kingston M, French P, Higgins S, McQuillan O, Sukthar A, Stott C, et al. UK national guidelines on the management of syphilis 2015. *Int J STD AIDS.* 2016;27:421-46.
40. Janier M, Hegyi V, Dupin N, Unemo M, Tiplica GS, Potočník M, et al. European guideline on the management of syphilis. *J Eur Acad Dermatol Venerol.* 2014;28:1581-93.
41. Kubanova AA, Kubanov AA, Frigo NV, Volkov IA, Rotanov S, Suvorova AA. First experience of molecular typing and determining the antibiotic resistance of syphilis pathogen *Treponema pallidum* in the Russian Federation. *Vestn Dermatol Venerol.* 2013;3:34-6.
42. Shaskolskiy B, Dementieva E, Leinsoo A, Runina A, Vorobyev D, Plakhova X, et al. Drug resistance mechanisms in bacteria causing sexually transmitted diseases and associated with vaginosis. *Front. Microbiol.* 2016;7:747.
43. Stamm L. Antibiotic resistance in *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, the syphilis agent. En: Embers ME, editor. *The Pathogenic Spirochetes: strategies for evasion of host immunity and persistence.* New York, NY: Springer; 2012. p. 213-28.
44. Chen CY, Chi KH, Pillay A, Nachamkin E, Su JR, Ballard RC. Detection of the A2058G and A2059G 23S rRNA gene point mutations associated with azithromycin resistance in *Treponema pallidum* by use of a TaqMan real-time multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2013;51:908-13.