



Anais Brasileiros de Dermatologia

www.anaisdedermatologia.org.br



CARTAS - INVESTIGAÇÃO

Tipagem de sequência *multilocus* de *Treponema pallidum* em pacientes do gênero masculino com úlceras genitais em clínica pública de infecções sexualmente transmissíveis: novo alelo e resistência quase completa aos macrolídeos ☆☆☆

Prezado Editor,

Sífilis é infecção sexualmente transmissível de evolução polimórfica causada por *Treponema Pallidum* subespécie *pallidum* (TP). Os sistemas mucocutâneo, neurológico e cardiovascular são os mais afetados, e a transmissão de mãe para filho pode ocorrer em qualquer fase da gestação.¹ A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou 6,3 milhões de casos anuais no mundo. No Brasil, a sífilis aumentou de 33,9 casos em 2015 para 74,2 casos por 100.000 habitantes em 2019.²

O TP não é cultivável com métodos de cultura padrão. Na prática clínica, o diagnóstico é presuntivo usando testes sorológicos. Diferentes técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) têm sido usadas para o diagnóstico,³ e o sequenciamento de DNA é cada vez mais utilizado para estudar diversidade genética, dinâmica de transmissão, virulência e padrões de resistência.⁴ A genotipagem por tipagem de sequência *multilocus* (MLST, do inglês *multilocus sequence typing*) nos *loci* cromossômicos TP0136, TP0548 e TP0705 possibilita melhor discriminação de cepas de TP e tornou possível a criação de um banco de dados de análise epidemiológica (<https://pubmlst.org/organisms/treponema-pallidum>).

DOI referente ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.abd.2024.10.008>

☆ Como citar este artigo: Esteves LS, Grassi VMT, Grassi LT, Nicola MRC, Silva MSN, Rossetti MLR, et al. Multilocus sequence typing of *Treponema pallidum* in male patients with genital ulcers in a public sexually transmitted infections clinic: a new allele and almost complete macrolide resistance. An Bras Dermatol. 2025;100. <https://doi.org/10.1016/j.abd.2024.10.008>.

☆☆ Trabalho realizado no Ambulatório de Dermatologia Sanitária, Porto Alegre, RS, Brasil.

Diferentes *loci*, alelos distintos e sua combinação definem o perfil alélico e o tipo de sequência (TS). A análise do rRNA do gene 23S pode complementar a identificação de mutações (A2058G ou A2059G) que estão relacionadas à resistência a macrolídeos.⁵

O objetivo do presente estudo foi detectar e genotipar TP por meio de MLST em úlceras genitais presuntivas de sífilis (GUPS, do inglês *genital ulcers presumptive of syphilis*).

Foram analisadas amostras de exsudato de GUPS obtidas de pacientes do gênero masculino com 18 anos ou mais atendidos em clínica pública de Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs) em Porto Alegre, Brasil, de julho de 2019 a março de 2019. A coleta da amostra foi realizada com cotonete seco. A extração de DNA foi realizada utilizando PureLink® Genomic Kit (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific). A detecção foi feita por meio de amplificação por PCR de 260 pb do gene *tpp47* com DNA usando os *primers* KO3 (5'-GAAGTTTGTCCCAGTTGCTGCTTT-3') e KO4 (5'-CAGAGCCATCAGCCCTTTTCA-3'). A amplificação foi realizada com Taq platinum DNA polymerase (Invitrogen, Fisher Scientific, EUA) e Thermocycler PTC96 (Bioer Technology, China). A análise dos produtos da PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose (0,05% de brometo de etídio). A análise de MLST foi realizada por meio de sequenciamento de *loci* cromossômicos (TP0136, TP0548 e TP0705), como descrito anteriormente por Grillová.⁴ A avaliação das mutações A2058G e A2059G no gene 23S rRNA foi realizada pela técnica de *nested* PCR. A análise de sequenciamento foi realizada com o *software* Bioedit (Tom Hall, EUA), e a análise de genotipagem foi realizada pelo esquema incluindo os *loci* TP0136, TP0548 e TP0705,⁴ usando a plataforma de banco de dados público para tipagem molecular e diversidade do genoma microbiano (PubMLST, disponível em <https://pubmlst.org/organisms/treponema-pallidum>). A análise de sequenciamento relacionada à resistência foi realizada por meio da anotação da sequência correspondente às posições 2058 e 2059 no rRNA do gene da *Escherichia coli* (número de acesso V0033, GenBank). Controles positivos e negativos foram usados em cada rodada. A aprovação ética foi obtida da Faculdade de Saúde Pública, do estado do Rio Grande do Sul (nº 3.232.889).

Foram recrutados 43 participantes. As idades variaram de 19 a 66 anos, e todos os participantes eram moradores da área metropolitana de Porto Alegre. Foi detectada sequência específica de TP em 32 (74%) das 43 amostras de DNA analisadas. Em 30 (94%) das 32, pelo menos um *locus* do esquema MLST foi sequenciado com sucesso. A mesma

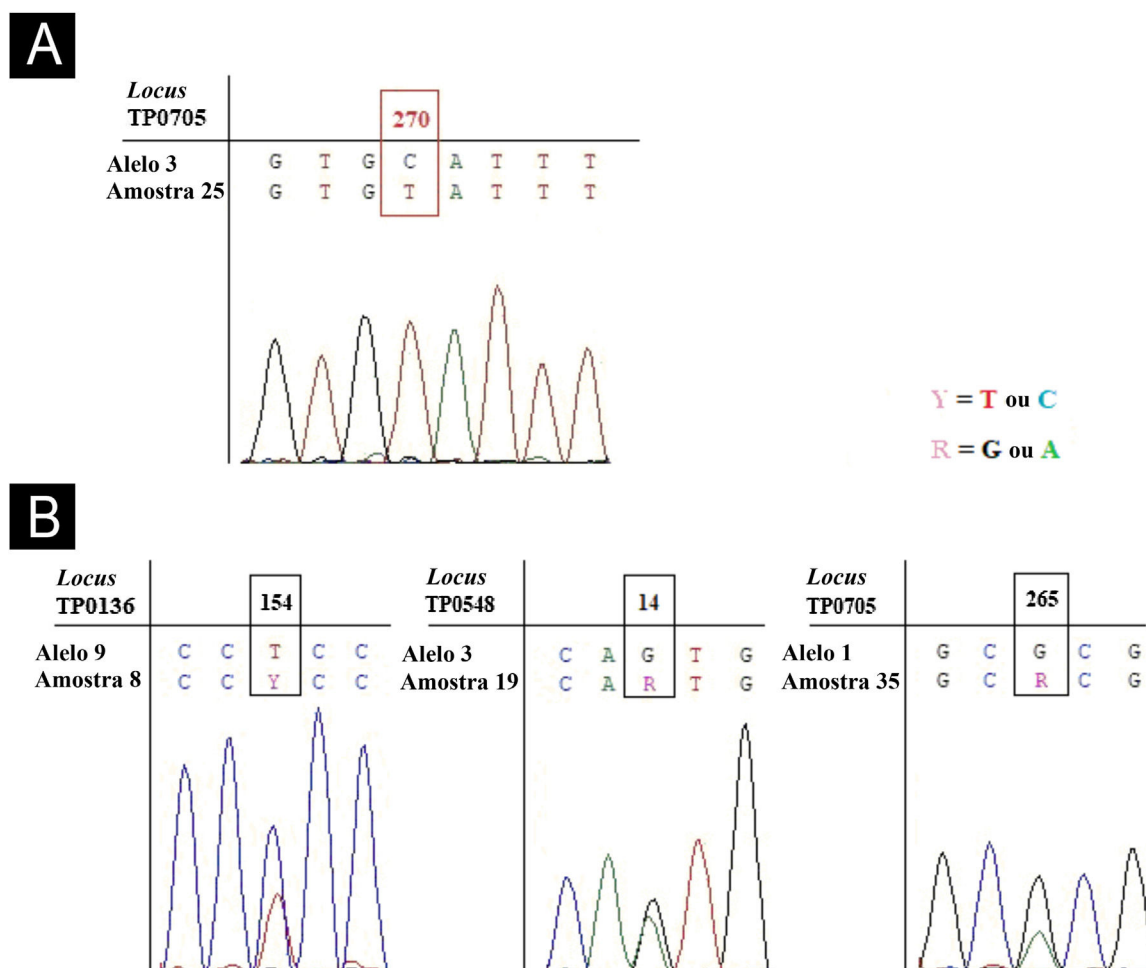


Figura 1 Novo alelo para TP0705 e três picos heterozigotos para os *loci* TP0136, TP0548 e TP0705. (A) Cromatograma da amostra 25 mostrou a nova variante alélica chamada aqui de 11, caracterizada por um SNV na posição 270 (C→T) utilizando o alelo 3 (sequência mais similar) como referência. (B) Cromatogramas de três amostras mostraram pico heterozigoto para o *locus* TP0136 na posição 154 (C e T), TP0548 na posição 14 (G e A) e TP0705 na posição 265 (G e A). Os alelos utilizados como referência são a sequência mais similar observada no banco de dados PubMLST.

proporção do rRNA do gene 23S foi sequenciada com sucesso. Foi obtido sequenciamento de qualidade de TP0705 em 22 amostras, bem como para TP0136 e TP0548. A combinação de *locus* sequenciados com sucesso entre as amostras variou. Foram identificadas três variantes alélicas para TP0136, duas para TP0548 e três para TP0705. Foi identificado um novo alelo para TP0705 na única amostra caracterizada como genotipicamente suscetível a macrolídeos (designada alelo 11), que diferiu do alelo 3 na posição 270 do *loci* (C270T). Três outras amostras apresentaram picos heterozigotos (dois picos) nas posições 154 para TP0136, 14 para TP0548 e 265 para TP0705 (fig. 1). Os resultados da tipagem de TP, os alelos identificados, o perfil de resistência genotípica e o complexo clonal são apresentados na [tabela 1](#).

Foram obtidos tipos de sequência (TS), que são atribuídos a haplótipos completamente caracterizados (três *loci* MLST) para 11 amostras, e o mais frequente (8/11;72,7%) foi o perfil 1.3.1 (TS 1). O perfil 28.7.3 ainda não recebeu TS na plataforma PubMLST. Foram classificadas amostras que tiveram pelo menos um *locus* sequenciado com sucesso em um complexo clonal por aproximação. Essa classificação foi

baseada no número de isolados sequenciados contendo o(s) alelo(s) armazenado(s) no banco de dados PubMLST ([tabela 2](#)). Foram identificados dois complexos clonais de cepas: seis (20%) de 30 isolados foram classificados como Nichols-like e 22 (73%) como SS14-like. Não foi viável atribuir um complexo clonal às duas amostras que tiveram apenas o *locus* TP0705 sequenciado com sucesso. Uma amostra foi caracterizada como alelo 3, enquanto a outra exibiu um alelo recém-identificado designado como alelo TP0705-22 (fig. 1).⁵ Quanto às mutações relacionadas à resistência, das 30 amostras que foram adequadamente caracterizadas, apenas uma não tinha a mutação A2058G no rRNA do gene 23S e, portanto, foi classificada como suscetível.

O DNA do TP foi detectado em aproximadamente 2/3 das amostras. Elas pertenciam aos complexos clonais SS14-like ou Nichols-like. Um novo alelo foi identificado nas duas amostras não classificadas em um complexo clonal (x.x.3 e x.x.11).⁵ O haplótipo contendo esse alelo tinha apenas o *locus* TP0705 caracterizado. Esse *locus* pode compartilhar alelos idênticos entre cepas dos clados SS14 e Nichols, o que dificulta a atribuição de um complexo clonal.

Tabela 1 Genotipagem de *T. pallidum* por tipagem de sequência *multilocus* (MLST) nas amostras estudadas

ID da amostra	TP0136	TP0548	TP0705	rRNA 23S ^a	MLST ^b	TS ^c	Complexo clonal
1	1	3	1	R	1.3.1	1	SS14-like
7	nd	nd	1	R	x.x.1	-	SS14-like ^d
8	9 ^f	7		R	9.7.x	-	Nichols-like ^d
9	1	3	-	R	1.3.x	-	SS14-like ^d
10	1	nd	1	R	1.x.1	-	SS14-like ^d
11	1	3	1	R	1.3.1	1	SS14-like
12	1	3	nd	R	1.3.x		SS14-like ^d
13	nd	3	nd	R	x.3.x		SS14-like ^d
14	nd	nd	nd	R	-	-	nd
15	nd	nd	nd	R	-	-	nd
16	28	7	3	R	28.7.3	-	Nichols-like
17	nd	nd	1	R	x.x.1	-	SS14-like ^d
18	1	3	1	R	1.3.1	1	SS14-like
19	1	3 ^f	nd	R	1.3.x	-	SS14-like ^d
20	1	3	nd	R	1.3.x		SS14-like ^d
21	nd	7	3	R	x.7.3	-	Nichols-like ^d
22	9	7	3	R	9.7.3	26	Nichols-like
23	nd	nd	3	nd	x.x.3	-	nd
25	nd	nd	11 ^e	S	x.x.11	-	nd
27	1	3	nd	R	1.3.x	-	SS14-like ^d
28	1	3	1	R	1.3.1	1	SS14-like
29	28	7	3	R	28.7.3	-	Nichols-like
30	1	3	1	R	1.3.1	1	SS14-like
31	nd	nd	1	R	x.x.1	-	SS14-like ^d
32	1	3	1	R	1.3.1	1	SS14-like
34	1	nd	1	Nd	1.x.1	-	SS14-like ^d
35	1	nd	1 ^f	R	1.x.1	-	SS14-like ^d
36	28	7	3	R	28.7.3	-	Nichols-like
38	1	3	nd	R	1.3.x	-	SS14-like ^d
39	1	3	1	R	1.3.1	1	SS14-like
40	1	3	1	R	1.3.1	1	SS14-like
42	nd	3	1	R	x.3.1	-	SS14-like ^d

^a rRNA do gene 23S que codifica resistência a antibióticos macrolídeos: S = sensível, R = resistente com mutação A2058G.

^b Perfis alélicos baseados nas sequências dos *loci* TP0136, TP0548 e TP0705.

^c TS, Tipo de sequência, de acordo com o banco de dados PubMLST para *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*.

^d Complexo clonal classificado por aproximação.

^e Novo alelo.

^f Alelos com pico heterozigoto em posição da sequência.

nd, não determinado.

Tabela 2 Complexo clonal de perfis genotípicos incompletos com base no número de amostras presentes no banco de dados PubMLST

Perfil pesquisado no banco de dados	Nº de amostras SS14-like	Nº de amostras Nichols-like	Nº de amostras sem atribuição de CC	CC considerado neste estudo
1.3.x	463	0	1	SS14-like
1.x.1	639	0	10	SS14-like
9.7.x	0	38	0	Nichols-like
x.3.1	477	0	4	SS14-like
x.3.x	482	0	6	SS14-like
x.7.3	0	41	3	Nichols-like
x.x.1	683	0	20	SS14-like
x.x.3	22	86	7	nd

CC, complexo clonal.

Com exceção de uma, as amostras positivas para DNA, apresentaram a mutação A2058G no rRNA do gene 23S, que fornece resistência à classe de antibióticos macrolídeos.⁶ Os achados do presente estudo corroboram os de Grillová et al.⁷ e Giacani,⁸ que demonstraram alta e crescente proporção dessa mutação. Foram identificados os mesmos complexos clonais em 20% das amostras deste estudo (complexo clonal SS14 ou Nichols-like). Foram encontrados três perfis MLST totalmente caracterizados de TP (1.3.1; 9.7.3; 28.7.3).

As amostras negativas para DNA de TP podem ter como explicação: 1) alguns pacientes não tinham sífilis; 2) a quantidade de microrganismos nas lesões diminuiu ao longo do tempo; e 3) o uso anterior de antibióticos tópicos e sistêmicos. O pequeno tamanho amostral impediu as associações do estudo de diferentes genótipos com dados demográficos, práticas sexuais ou origem geográfica dos participantes, uma vez que a epidemia de SARS-CoV2 dificultou o recrutamento dos mesmos. O desenvolvimento de estudos com tamanhos amostrais maiores poderá fornecer informações adicionais que são cruciais para o controle da sífilis.

Suporte financeiro

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Ministério da Educação (CAPES) concedeu bolsa de estudos de doutorado para V.M.T. Grassi por meio do CÓDIGO 001 de financiamento. O Ministério da Saúde do Brasil financiou o estudo por meio de uma Carta Acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), nº SCON00400/2019.

Contribuição dos autores

Leonardo Souza Esteves: Responsável pela concepção e planejamento do estudo, realizou análise de sequenciamento bioinformática e genotipagem, forneceu comentários e edições e aprovou o rascunho final antes da submissão.

Vera Mileide Trivellato Grassi: Responsável pela concepção e planejamento do estudo, forneceu comentários e edições e aprovou o rascunho final antes da submissão.

Liliane Trivellato Grassi: Realizou a organização das referências, forneceu comentários e edições e aprovou o rascunho final antes da submissão.

Maria Rita Castilhos Nicola: Participou da coleta e gerenciamento dos dados, forneceu comentários e edições e aprovou o rascunho final antes da submissão.

Marcia Susana Nunes Silva: Responsável pela concepção e planejamento do estudo, forneceu comentários e edições e aprovou o rascunho final antes da submissão.

Maria Lucia Rosa Rossetti: Responsável pela concepção e planejamento do estudo, forneceu comentários e edições e aprovou o rascunho final antes da submissão.

Mauro Cunha Ramos: Responsável pela concepção e planejamento do estudo, forneceu comentários e edições e aprovou o rascunho final antes da submissão.

Conflito de interesses

Nenhum.

Referências

1. Cohen SE, Klausner JD, Engelman J, Philip S. Syphilis in the modern era: an update for physicians. *Infect Dis Clin N Am*. 2013;27:705–22.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Boletim Epidemiológico de Sífilis 2021. Brasília: Ministério da Saúde; 2021. [Acesso em 12 abr. 2022] Disponível em: <https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/boletins-epidemiologicos/2021/sifilis/boletim_sifilis_2021_internet.pdf/view>.
3. Theel ES, Katz SS, Pillay A. Molecular and direct detection tests for *treponema pallidum* subspecies *pallidum*: a review of the literature, 1964–2017. *Clin Infect Dis*. 2020;71:S4–12.
4. Vrbová E, Grillová L, Mikalová L, Pospíšilová P, Strnadel R, Dastyčová E, et al. MLST typing of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in the Czech Republic during 2004–2017: clinical isolates belonged to 25 allelic profiles and harbored 8 novel allelic variants. *PLoS One*. 2019;14:e0217611.
5. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res*. 2018;3:124.
6. Molini BJ, Tantaló LC, Sahi SK, Rodríguez VI, Brandt SL, Fernandez MC, et al. Macrolide resistance in *Treponema pallidum* correlates with 23S rDNA mutations in recently isolated clinical strains. *Sex Transm Dis*. 2016;43:579–83.
7. Grillová L, Pětrošová H, Mikalová L, Strnadel R, Dastyčová E, Kuklová 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;52:3693–700.
8. 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;45:237–42.

Leonardo Souza Esteves ^a,
Vera Mileide Trivellato Grassi ^b,
Liliane Trivellato Grassi ^c,
Maria Rita Castilhos Nicola ^d,
Marcia Susana Nunes Silva ^e,
Maria Lucia Rosa Rossetti ^f e Mauro Cunha Ramos ^{d,*}

^a Laboratório de Biologia Molecular Aplicado à Microbactérias, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^b Programa em Biologia Celular e Molecular Aplicada às Ciências da Saúde, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brasil

^c Engenharia Biomédica, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brasil

^d Ambulatório de Dermatologia Sanitária, Secretaria Estadual de Saúde, Porto Alegre, RS, Brasil

^e DNTech - Desenvolvimento de Novas Tecnologias LTDA (APERGS/FINEP), Porto Alegre, RS, Brasil

^f Programa de Pós-Graduação, Faculdade de Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brasil

* Autor para correspondência.

E-mail: maurocunharamos@gmail.com (M.C. Ramos).

Recebido em 14 de agosto de 2024; aceito em 15 de outubro de 2024