Epidemiologie 3-06 20.7.2006 9:03 Str. 105
proLékaře.cz | 1.5.2025

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 55, 2006, č. 3, s. 105–111

Molekulární detekce a typizace *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* v klinickém materiálu

Flasarová M.[1,2], Šmajs D.[1], Matějková P.[1], Woznicová V.[2], Heroldová Dvořáková M.[2], Votava M.[2]

[1]Biologický ústav, LF MU, Brno
[2]Mikrobiologický ústav, LF a FN u sv. Anny, MU, Brno

Souhrn

Zavedli jsme metodu detekce chromozomální DNA *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* dvoukrokovou (nested) PCR reakcí, která amplifikuje část genu TP0319, kódujícího hypotetický membránový lipoprotein (gen *tmp*C). Vyšetřili jsme 138 sér od 111 dospělých pacientů v primárním, sekundárním, časně latentním a pozdně latentním stadiu a také pacientů s podezřením na syfilis. Chromozomální DNA *T. p. pallidum* se v séru dospělých pacientů nepodařilo detegovat. Při vyšetření 11 kožních a slizničních stěrů (7 genitálních, 4 faryngeálních) jsme nalezli 6 pozitivních od 3 pacientů ve stadiu primární a sekundární syfilis. Pozitivní byl rovněž jeden stěr pacienta s časnou kongenitální syfilis. Sekvenování DNA genů TP0136 a TP0548 z pozitivních vzorků prokázalo výskyt dvou kmenů sekvenčně identických s kmenem *T. p. pallidum* SS14 a dvou unikátních syfilitických kmenů, doposud u *T. p. pallidum* nepopsaných. U jednoho vyšetřovaného novorozence s pozitivním výsledkem vyšetření kožního vzorku jsme prokázali treponemální DNA také v séru a v cerebrospinálním moku. Pokroky v molekulární typizaci *T. p. pallidum* v klinickém materiálu přispějí k rozvoji epidemiologie syfilis a přinesou možnosti rozlišení mezi reinfekcí a reaktivací syfilitického procesu.

Klíčová slova: *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* – detekce v klinickém materiálu – molekulární typizace – kožní a slizniční stěry.

Summary

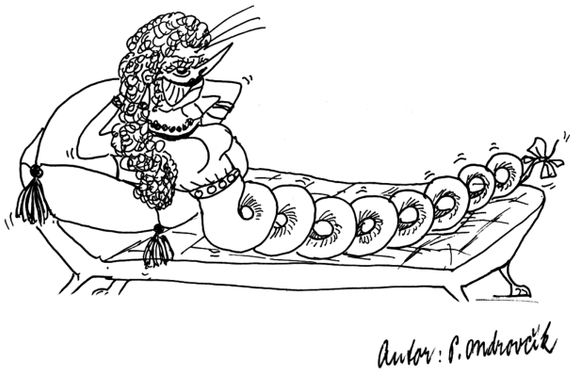
Flasarová M., Šmajs D., Matějková P., Woznicová V., Heroldová-Dvořáková M., Votava M.: Molecular Detection and Subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Clinical Specimens

An in-house two-step nested PCR amplification targeting the *tmp*C gene (TP0319, encoding putative membrane lipoprotein) was used for detection of chromosomal DNA of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in clinical specimens. We tested 138 blood serum samples from 111 adult patients with suspected, primary, secondary, early or late latent syphilis. *T. p. pallidum* DNA was not detected in any of the analyzed specimens. Out of 11 mucocutaneous swabs (7 genital and 4 pharyngeal), 6 collected from 3 patients with primary or secondary syphilis tested positive. One skin swab from a patient with early congenital syphilis was also positive as were his serum and cerebrospinal fluid samples. DNA sequencing of the genes TP0136 and TP0548 from the positive samples revealed two strains with DNA sequences identical to that of *T. p. pallidum* strain SS14 and two unique previously undescribed *T. p. pallidum* strains. The advances in molecular typing of *T. p. pallidum* in clinical specimens will be of relevance to the epidemiology of syphilis and will allow for clinical discrimination between reinfection and syphilitic reactivation.

Key words: *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* – detection in clinical specimens – molecular typing – mucocutaneous swabs.

Treponema pallidum subspecies *pallidum* (*T. p. pallidum*) je původcem sexuálně přenosného onemocnění syfilis. Během posledního desetiletí došlo v České republice k výraznému nárůstu počtu hlášených případů časné syfilis. Např. v roce 2000 vzrostla incidence získané syfilis téměř pětkrát ve srovnání s incidencí v roce 1990 [24]. Počet případů kongenitální syfilis – jedné z nejvážnějších jejích forem – vzrostl v letech 1994–1998 23krát ve srovnání s předchozím čtyřletým obdobím [9]. V letech 2000–2002 bylo v České republice diagnostikováno 967–1376 případů

proLékaře.cz | 1.5.2025



syfilis a 7–13 případů kongenitální syfilis ročně [12]. V roce 2000 incidence syfilis dokonce překročila incidenci kapavky [24]. Počet případů syfilis v jiných částech světa je přitom často ještě vyšší než v České republice, např. v USA bylo během epidemie v roce 1990 zaznamenáno více než 130 000 případů aktivní syfilis [2]. Syfilis tedy nadále zůstává významným globálním zdravotním problémem [17].

Rod *Treponema* zahrnuje několik druhů a poddruhů patogenních spirochet. Infekce způsobované patogenními treponematy představují skupinu onemocnění s podobnými symptomy a epidemiologií, ve které jejich invazivita klesá od venerické syfilis k pintě [1]. Nejinvazivnější je *T. p. pallidum*, původce sexuálně přenosné infekce syfilis (lues). Středně invazivní jsou původci nevenerických onemocnění frambézie (yaws) a endemické syfilis – *T. pallidum* subsp. *pertenue* (*T. p. pertenue*) a *T. pallidum* subsp. *endemicum* (*T. p. endemicum*). *Treponema carateum* je neinvazivní spirocheta způsobující pouze lokální kožní léze a *Treponema paraluiscuniculi* je pak pro člověka zcela nepatogenní. *T. p. pallidum* zahrnuje řadu izolátů (např. Nichols, SS14, Chicago etc.), u kterých se předpokládá, že se liší zejména jednonukleotidovými záměnami v chromozomální DNA (SNP). Kompletní chromozomální sekvence kmene SS14 se například liší od kompletní chromozomální sekvence kmene Nichols ve více než 300 nukleotidových záměnách (P. Matějková, nepublikované výsledky). Jednonukleotidové záměny přitom nejsou v chromozomální DNA kmene SS14 rovnoměrně rozmístěny. Existují poměrně krátké chromozomové oblasti s relativně vysokým počtem SNP. Tyto úseky DNA splňují kritéria pro výběr kandidátních lokusů pro molekulární typizaci jednotlivých treponemálních kmenů: jedná se o oblasti s vysokou hustotou SNP, které sousedí s konzervativními sekvencemi, využitelnými k návrhu primerů pro PCR amplifikaci. Dostupné sérologické testy totiž nejsou plně specifické pro *T. p. pallidum* a vykazují pozitivitu také u ostatních treponemálních infekcí [1].

V této práci jsme se zaměřili na vývoj a testování specifického diagnostického testu na syfilis založeného na molekulární detekci DNA *T. p. pallidum* v různém klinickém materiálu. Využili jsme přitom detekce variabilních částí genomu *T. p. pallidum* tak, aby bylo možno provádět základní typizaci DNA *T. p. pallidum* izolované z klinických vzorků.

Materiál a metodika

Sběr klinického materiálu. Sběr klinického materiálu a sérologické vyšetření probíhalo v Mikrobiologickém ústavu Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně. Celkem jsme vyšetřili 172 klinických vzorků odebraných od 115 pacientů. Navíc jsme vyšetřili vzorky novorozence s kongenitální syfilis. Vzorky 138 sér pocházely od 111 pacientů (60 žen, 51 mužů) ve věku od 16 do 83 let (medián pro skupinu mužů: 36, pro ženy: 34 roků), vzorky 12 stěrů od 7 pacientů a vzorky 20 krevních sraženin od 20 pacientů (viz tab. 1). U pacienta s kongenitální syfilis byly vyšetřeny vzorky likvoru, séra a stěrů z kožních puchýřů. U každého pacienta byly vyšetřeny RRR, TPHA a stanoveny IgM a IgG metodou Elisa, případně western blotem.

Izolace treponemální DNA a stanovení citlivosti PCR reakce. Izolovaná standardní treponemální DNA o koncentraci 112 ng/μl z *T. p. pallidum* kmene Nichols nám byla poskytnuta S. J. Norrisem (University of Texas Medical School, Hous-

Tab. 1. Přehled vyšetřených vzorků krevních sér (138 sér od 111 pacientů) a krevních sraženin (20 sraženin od 20 pacientů).

Table 1. Summary of 138 blood sera (from 111 patients) and blood clots (from 20 patients) tested.

Vyšetřený materiál		Klinická klasifikace syfilis				
		suspektní	primární	sekundární	latentní	nd
Sérum	počet vzorků	6	11	10	97	14
	počet pacientů	6	10	8	74	13
Krevní sraženiny	počet vzorků	1	3	1	15	0
	počet pacientů	1	3	1	15	0

Vysvětlivky: nd – nebylo zjišťováno.
Explanatory notes: nd – not determined.

proLékaře.cz | 1.5.2025

ton, Texas). Koncentraci DNA jsme zjišťovali na spektrofotometru NanoDrop ND – 1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies). DNA z klinických vzorků jsme izolovali pomocí kitu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) podle instrukcí výrobce.

Provedení PCR. Primery oTP0319F (5'–CTGCTCATCGGCTGCTCTA–3') a oTP0319R (5'–ACCACAGACTTCGACCCATC–3') byly použity pro 1. krok detekce genu *tmp*C (TP0319) a vedly ke vzniku produktu PCR o délce 773 párů bází. Pro 2. krok reakce byly použity primery iTP0319F (5'–GAAGGTGGTGACTTCGTCGT–3') a iTP0319F (5'–CAAAACCCGCTTCAAAGA GA–3'), které ohraničovaly produkt PCR o délce 451 bp.

Pro každou reakci PCR (25 μl) bylo použito po 0,125 μl 10mM dATP, 10 mM dGTP, 10 mM dCTP, 10 mM dTTP, 2,5 μl 10krát koncentrovaného pufru pro PCR, 0,25 μl každého z primerů o koncentraci 100 pmol/μl ve variabilním objemu redestilované vody (12–21 μl) a vyšetřovaného vzorku (1–10 μl). K této směsi jsme přidali 0,05 μl polymerázy *Taq* (5000 U/ml, New England BioLabs). Reakce byly provedeny v termocykleru GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) za následujících podmínek: 94 °C (60 s); 94 °C (30 s), 58 °C (30 s), 72 °C (60 s), 30 cyklů; 72 °C (10 min). 2. krok PCR probíhal identicky, jako templát sloužil 1 μl vzorku z prvního kroku a namísto 30 cyklů bylo použito cyklů 40. Vyhodnocení PCR reakce jsme provedli na 2% agarosovém gelu. Pro eliminaci falešně pozitivních výsledků byla příprava PCR reakce a amplifikace prováděna v oddělených místnostech v pracovních boxech, které byly pravidelně vyzařovány UV světlem. Při každé amplifikaci byla přidáním ředěné chromozomální DNA *T. p. pallidum* kmene Nichols provedena kontrola amplifikace pro eliminaci falešně negativních výsledků.

Restrikční štěpení PCR produktů. Amplifikační produkty jsme vyšetřili pomocí restrikčního štěpení enzymy *Dde* I, *Nhe* I a *Sac* I podle doporučení výrobce (New England BioLabs). Výsledek restrikčního štěpení jsme odečetli na 2% gelu.

Přesnější charakterizace chromozomální DNA v klinickém materiálu. Hypervariabilní úseky v genech TP0136 a TP0548 byly amplifikovány pomocí PCR s využitím oligonukleotidových primerů navržených v softwaru Primer3. Pro gen TP0136 bylo použito primerů TP0136F (5'–AGTGTCTT-CCTCGTCCGTTC-3') a TP0136R (5'-CACGTGGT-GGTGTCAAACTT-3'), jež vedly ke vzniku produktu o délce 1207 bp. Pro gen TP0548 bylo užito primerů TP0548F (5'–GCGGTCCCTATGATATCGTGT-3') a TP0548R (5'–GAGCCACTTCAGCCCTACTG–3') amplifikujících úsek o délce 1066 bp. Složení směsi PCR bylo shodné jako u detekce TP0319 a podmínky, za kterých reakce probíhala, byly následující: 94 °C (60 s); 94 °C (30 s), 55 °C (30 s), 72 °C (120 s), 30 cyklů; 72 °C (10 min). Vzniklé produkty PCR byly purifikovány s využitím kitu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) a následně sekvenovány dideoxyterminátorovou metodou původními amplifikačními primery a přídatnými primery TP0136-673R (5'–TGACGCTTGCCAGAATGGGC-3') a TP0548-415F (5'–GTACGCAGAACACCGGCTAC-3'). Hodnocení sekvencí bylo provedeno v softwaru DNASTAR (Lasergene) a nalezené sekvence byly srovnány s kompletní sekvencí kmene Nichols (AE000520).

Výsledky a diskuse

1. Dvoukroková PCR detekce chromozomální DNA *T. p. pallidum*.

Vypracovali jsme metodu dvoukrokové (nested) PCR detekce chromozomální DNA *T. p. pallidum*. Pro detekci jsme zvolili gen TP0319, který kóduje hypotetický membránový lipoprotein (gen *tmp*C), pro nějž bylo známo, že jeho varianty se navzájem liší mezi různými kmeny *T. p. pallidum* a také mezi *T. p. pertenue* a *T. paraluiscuniculi* (D. Šmajs, nepublikované výsledky). Maximální možnou citlivost dvoukrokové PCR reakce jsme ověřili sériovým ředěním chromozomální DNA *T. p. pallidum* Nichols o známé koncentraci s následnou detekcí PCR amplifikací. Chromozomální DNA *T. p. pallidum* kmene Nichols o koncentraci 112 ng/μl vedla k pozitivní PCR reakci i při ředění 10^{-7}, což při objemu ředěného vzorku (1μl), který byl přidáván do PCR reakce, odpovídá 1–10 kopiím templátu ve vyšetřovaném vzorku. Citlivost dvoukrokové PCR reakce je tedy velmi blízká teoreticky maximální možné citlivosti PCR reakce. I jiní autoři udávají podobnou citlivost nested PCR reakce [21].

2. Vyšetření krevního séra pacientů na přítomnost chromozomální DNA *T. p. pallidum*.

Celkem jsme vyšetřili 138 krevních sér odebraných od 111 dospělých osob (věkový průměr: 34,5 roků). Soubor pacientů zahrnoval osoby s podezřením na syfilis (8 osob) a pacienty v primárním, sekundárním, časně latentním a pozdně latentním stadiu (103 pacientů). I přes opakované pokusy nebyla chromozomální DNA *T. p. pallidum* v séru dospělých pacientů detegována. Aby bylo možno vyloučit degradaci DNA nebo eventuální ztráty během purifikace chromozomální DNA, byla k opakovaně negativním sérům přidávána ředěná standardní chromozomální DNA *T. p. pallidum*. Takto provedené experimenty byly vždy pozitivní a ukázaly relativně malé ztráty

proLékaře.cz | 1.5.2025

Tab. 2. Přehled vyšetřených vzorků získaných z genitálních, faryngeálních a kožních stěrů vyšetřených pomocí PCR detekce genu TP0319 (*tmp*C)

Table 2. Results of PCR detection of the gene TP0319 (*tmp*C) in the DNA isolated from mucocutaneous genital, pharyngeal and skin swabs

Věk a pohlaví pacienta	Počet stěrů/ místo odběru	Výsledek PCR/ restrikčního štěpení	Stadium	RRR	Index pozitivity Elisa IgM/IgG	WB IgM	Sekvence TP0136/TP0548*
24M	1G	+/SS14	primární	1:16	2,3/7,5	nd	SS14/SS14
31M	2G	+/SS14	primární	1:64	2,8/10	+	unikátní**/SS14
20F	3F,G	+/SS14	sekundární	1:128	6,6/9	+	SS14/unikátní**
0M	1P	+/SS14	kongenitální	1:16	9,2/9,9	+	SS14/SS14
30M	1G	-	sekundární	1:32	8,26/3,95	nd	
28F	2F,G	-	sekundární	1:64	9,99/2,99	nd	
29M	2F,G	-	nd	1:32	7,74/10	+	

Vysvětlivky: M – pohlaví mužské, F – pohlaví ženské; G – genitální stěr, F – faryngeální stěr, P – stěr z kožních puchýřů; nd – nebylo zjišťováno; RRR – rychlá reaginová reakce; Elisa IgM/IgG – pozitivní výsledky ELISA reakce pro antitreponemální protilátky IgM a IgG (v indexech pozitivity); WB IgM – výsledky detekce antitreponemálních protilátek IgM technikou *western blotting*; *Sekvence částí genů TP0136 a TP0548 s výsledky sekvenční příbuznosti ke kmeni *T. p. pallidum* Nichols nebo SS14; **unikátní – výskyt dosud nepopsané sekvence (viz tabulka 3).

Explanatory notes: M – male sex, F – female sex; G – genital swab, F – pharyngeal swab, P – skin swab; nd – not determined; RRR – rapid plasma reagin reaction; Elisa IgM/IgG – positive result of ELISA reaction with antitreponemal antibodies IgM a IgG; WB IgM – western blot detection of antitreponemal antibodies IgM; *Sequencing results of TP0136 and TP0548 genes and sequence similarity to the strain *T. p. pallidum* Nichols or SS14; **unique sequence (see Table 3).

chromozomální DNA (cca do 50 %) během její izolace ze séra a následné purifikace. Uvedené výsledky ukazují na skutečnost, že během syfilitického procesu a pravděpodobně i během latentní infekce nejsou v krevním séru přítomny treponemy v detegovatelném množství. Podobné výsledky jsou známy ze studia hemokultur u *Borrelia burgdorferi*, kde i při značném objemu krevní plazmy (větším než 9 ml), použitém pro kultivaci u pacientů s příznaky lymské boreliózy bylo méně než 44 % hemokultur pozitivních. Přitom se uvádí, že citlivost PCR detekce mikrobiální DNA ze séra je řádově menší než v hemokulturách [22]. Vyšetření 20 krevních sraženin na přítomnost chromozomální DNA *T. pallidum* bylo negativní. Výsledky ostatních autorů, zabývajících se izolací a detekcí treponemální DNA z krevního séra jsou značně rozporuplné. Někteří autoři uvádějí častý záchyt treponemální DNA v krevním séru u primární a sekundární syfilis (75 %, [6]) a jiní autoři uvádějí opakovaně negativní výsledky i při vyšetřování plné krve na přítomnost DNA *T. p. pallidum* [10]. Liší se také výsledky efektivity průkazu treponemální DNA ve vzorcích izolovaných z plné krve, krevní plazmy a krevního séra. Někteří autoři uvádějí častý záchyt treponemální DNA v krevní plazmě (68–91 %, [16]) nebo v plné krvi (41 %, [7]; 36,6 %, [18]). Jiní autoři poukazují na vysokou frekvenci záchytu treponemální DNA ve vzorcích krevního séra (75 %, [6]) oproti vzorkům krevní plazmy. Zaznamenané rozdíly odrážejí rozdíly v metodách izolace treponemální DNA, metodách její PCR detekce nebo rozdíly v souborech klinického materiálu (ev. kombinace těchto faktorů). Je zřejmé, že popsané rozdíly vyžadují přísnou evaluaci výsledků, zejména s ohledem na možnost laboratorní kontaminace detekční reakce PCR produkty vzniklými při předchozích amplifikacích. Kontaminace vysoce citlivé „nested“ PCR reakce by mohla vést k vysokému počtu falešně pozitivních výsledků.

3. Vyšetření genitálních a faryngeálních stěrů pacientů na přítomnost chromozomální DNA *T. p. pallidum*.

Vyšetřili jsme celkem 11 stěrů od dospělých pacientů (7 genitálních, 4 faryngeální) a mezi nimi jsme nalezli 6 pozitivních od 3 pacientů ve stadiu primární a sekundární syfilis. Byl pozitivní rovněž jeden stěr od novorozence s kongenitální syfilis. Výsledky vyšetření stěrů jsou uvedeny v tabulce 2. Další ředění 6 vzorků ze stěrů (z toho 2 faryngeálních) prokázalo, že chromozomální DNA je v nich možno detegovat i po jejich 10- až 10 000násobném ředění. U všech pozitivních vzorků jsme PCR produkty (z genu TP0319) o velikosti 451 bp štěpili 3 restriktázami, *Sac* I, *Nhe* I, *Dde* I, k odlišení jednotlivých kmenů *T. pallidum*. Štěpení těmito enzymy umožňuje rozeznat některé základní typy kmenů z rodu *Treponema*: *T. p. pallidum*, *T. p. pertenue* a *T. paraluiscuniculi*. Abychom vyloučili možnost detekce DNA z jiných bakterií (např. z nepatogenních treponem), vyšetřili jsme pozitivní (a negativní) vzorky na přítomnost genu *pol*A, který byl prokázán jako unikátní pro *T. p. pallidum* [3, 23]. U všech vyšetřených stěrů byl průkaz genu *pol*A pozitivní, což svědčí pro to, že gen TP0319 z *T. p. pallidum* byl detegován specificky. Výsledky různých autorů izolace a detekce treponemální DNA z kožních a slizničních stěrů jsou značně rozdílné. Senziti-

proLékaře.cz | 1.5.2025

Tab. 3. Přehled sekvenčních změn nalezených v DNA PCR pozitivních genitálních a faryngeálních stěrů vyšetřených pomocí sekvenace úseků genů TP0136 (157355–157605*) a TP0548 (592100–592400)

Table 3. Sequencing results of TP0136 (157355–157605*) and TP0548 (592100–592400*) genes using DNA isolated from positive swabs.

Označení vzorku	TP0136	TP0548
kmen SS14	602** A => G	463–464 ACGG inzerce
	626 G => C	464–465 ATGAT inzerce
	648 G => C	469 G => A
	676 G => A	473 A => G
	677 T => A	478 G => A
	682 A => G	481 G => A
	689 A => G	484 A => G
	707 T => G	485 A => G
	779 A => C	
	786–791 CGGTGG delece	
24M	sekvenční změny shodné se změnami nalezenými u kmene SS14	sekvenční změny shodné se změnami nalezenými u kmene SS14
31M	sekvenční změny shodné se změnami nalezenými u kmene SS14 a nově nalezeny tyto jednonukleotidové záměny:	sekvenční změny shodné se změnami nalezenými u kmene SS14
	566 G => C	
	569 T => C	
	570 T => G	
	572 A => C	
	574 A => T	
	580 C => A	
	590 C => G	
20F	sekvenční změny shodné se změnami nalezenými u kmene SS14	sekvenční změny téměř shodné se změnami nalezenými u kmene SS14; jednonukleotidová záměna v pozici 473 chybí a nově nalezena v pozici 479 G => A
0M	sekvenční změny shodné se změnami nalezenými u kmene SS14	sekvenční změny shodné se změnami nalezenými u kmene SS14

* pozice nukleotidů v genomu kmene Nichols (AE000520)
** pozice nukleotidu v sekvenci příslušného otevřeného čtecího rámce u kmene Nichols [4]

*nucleotide positions in the chromosomal DNA of *T. p. pallidum* Nichols (AE000520)
**nucleotide positions in the sequence of putative gene of Nichols strain [4]

vita vyšetření stěrů u primární a sekundární syfilis značně kolísá – od 17,5 % do 93 % [11, 15, 18]. Naše výsledky s 50% záchytem pozitivních vzorků ze stěrů dospělých pacientů jsou nejblíže vyšetření bioptických vzorků z míst kožních a slizničních afekcí u sekundární syfilis, které vedlo k identifikaci 41,7 % pozitivních vzorků [20].

4. Přesnější charakterizace chromozomální DNA kmenů *T. p. pallidum* izolovaných z klinického materiálu.

V průběhu komparativní genomové analýzy kmenů Nichols a SS14 (P. Matějková, nepublikované výsledky) byly nalezeny sekvenčně rozdílné úseky v genomu *T. p. pallidum* SS14 a těchto oblastí jsme využili jako kandidátních lokusů pro typizaci. Amplifikovali jsme úseky genů TP0136 a TP0548 a vzniklé produkty PCR podrobili sekvenaci DNA. Výsledky sekvenací materiálu ze stěrů od dvou pacientů ukázaly výskyt kmene sekvenčně totožného s kmenem SS14 a u dalších dvou pacientů (z celkem 4 nezávislých stěrů – viz tab. 2) jsme nalezli další sekvenční změny, které prokázaly výskyt unikátních syfilitických kmenů, doposud nepopsaných u *T. p. pallidum* (viz tab. 3). Náhodné chyby vzniklé během amplifikace polymerázou *Taq* jsme u těchto pacientů – vzhledem k identickým výsledkům sekvenace materiálu ze dvou nezávislých stěrů od každého pacienta – mohli vyloučit. Také jiní autoři se zabývají problematikou typizace klinických izolatů *T. p. pallidum*, a to na základě restrikčního štěpení produktů PCR 3 *tpr* genů a variabilní délky genu *arp* [13]. S použitím této techniky bylo nalezeno 35 subtypů mezi 161 typovanými vzorky od pacientů s primární syfilis v jižní Africe [14]. Jiná recentní práce využívající stejnou metodiku identifikovala 7 molekulárních subtypů *T. p. pallidum* ve skupině 23 vzorků DNA izolovaných od pacientů z oblasti Severní a Jižní Karolíny [15]. Tyto výsledky ukazují na fakt, že kmeny *T. p. pallidum*

proLékaře.cz | 1.5.2025

izolované od pacientů vykazují sekvenční heterogenitu, které bude možno využít pro typování klinických treponemálních izolátů.

5. Vyšetření klinických vzorků odebraných od novorozence s kongenitální syfilis.

U jednoho vyšetřovaného novorozence s pozitivním výsledkem vyšetření kožního stěru jsme provedli detekci *T. p. pallidum* v séru a v likvoru. Oba vzorky byly PCR pozitivní; počty kopií treponemální DNA (odvozené z maximálního ředění vzorků dávajících pozitivní PCR reakci) byly v séru a v likvoru shodné a činily ~100 000 treponemálních molekul DNA v 1 μl vzorku. Ukazuje to na skutečnost, že u časné kongenitální syfilis je počet treponem v séru a likvoru srovnatelný a nápadně vyšší než u dospělých pacientů. Podobné výsledky byly nalezeny také jinými autory. Grimprel et al. [5] uvádí, že vyšetření fetálních a novorozeneckých krevních sér a cerebrospinálního likvoru ukázalo 80% a 71% senzitivitu ve srovnání s RIT (rabbit-infectivity test). Michelow et al. [8] zjistil, že infekci CNS u časné kongenitální syfilis nejlépe predikovala pozitivita PCR ze séra nebo plné krve.

Závěr

Pozitivní výsledky PCR detekce treponemální DNA v kožních a slizničních stěrech odebraných od pacientů se syfilis ukazují na možnost zavedení typizačních technik pro původce syfilis, *T. p. pallidum*. Molekulární typizace a identifikace jednotlivých kmenů a izolátů *T. p. pallidum* přispěje zásadně k rozvoji epidemiologie syfilis a přinese i možnost rozlišení mezi reinfekcí a reaktivací syfilitického procesu. Nově publikované poznatky [19] ukazují, že klinická manifestace infekcí, způsobených různými kmeny *T. p. pallidum*, se navzájem liší a naznačují zvýšené riziko neuroinvazivity a neurosyfilis u pacientů infikovaných některými kmeny. Tento fakt dále zdůrazňuje potřebu molekulární typizace kmenů *T. p. pallidum*.

Poděkování

Tento výzkum byl podporován grantem IGA MZ číslo NI7351-3.

Literatura

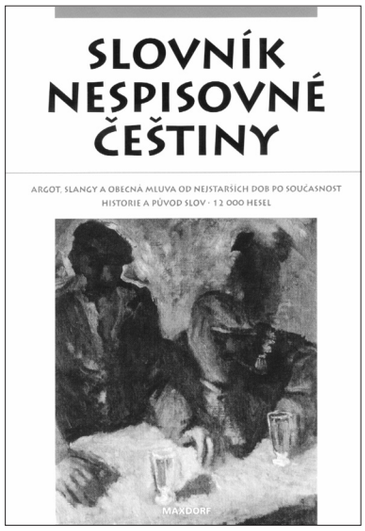
1. **Antal, G.M., Lukehart, S., Meheus, A.** The endemic treponematoses. Microbes Infect, 2002, 4, 83–94.
2. **Centers for Disease Control and Prevention.** Morbid. Mortal. Weekly Rep, 1996, 44, 75.
3. **Centurion-Lara, A., Castro, C., Shaffer, J.M., Van Voorhis, W.C. et al.** Detection of *Treponema pallidum* by a sensitive reverse transcriptase PCR. J Clin Microbiol, 1997, 35, 1348–1352.
4. **Fraser, C.M., Norris, S.J., Weinstock, G.M., White, O. et al.** Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. Science, 1998, 281, 375–388.
5. **Grimprel, E., Sanchez, P.J., Wendel, G.D., Burstain, J.M. 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. J Clin Microbiol, 1991, 29, 1711–1718.
6. **Kouznetsov, A.V., Weisenseel, P., Trommler, P., Multhaup, S., Prinz, J.C.** Detection of the 47-kilodalton membrane immunogen gene of *Treponema pallidum* in various tissue sources of patients with syphilis. Diagn Microbiol Infect Dis, 2005, 51, 143–145.
7. **Marfin, A.A., Liu, H., Sutton, M.Y., Steiner, B. et al.** Amplification of the DNA polymerase I gene of *Treponema pallidum* from whole blood of persons with syphilis. Diagn Microbiol Infect Dis, 2001, 40, 163–166.
8. **Michelow, I.C., Wendel, G.D. Jr., Norgard, M.V., Zeray, F. et al.** Central nervous system infection in congenital syphilis. N Engl J Med, 2002, 346, 1792–1798.
9. **Novotná, L., Beneš, C.** Trends in sexually transmitted diseases in the Czech Republic. Int Conf AIDS, 1998, 12, 143.
10. **Orton, S.L., Liu, H., Dodd, R.Y., Williams, A.E., ARCNET Epidemiology Group.** Prevalence of circulating *Treponema pallidum* DNA and RNA in blood donors with confirmed-positive syphilis tests. Transfusion, 2002, 42, 94–99.
11. **Palmer, H.M., Higgins, S.P., Herring, A.J., Kingston, M.A.** Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. Sex Transm Infect, 2003, 79, 479–483.
12. **Pavlík, E., Křemen, J., Stříbrná, J., Zákoucká, H., Knappová, M.** Real-time PCR testy pro detekci *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* v klinických vzorcích s využitím LightCycleru Roche. Labor Aktuell, 2004, 1, 10–15.
13. **Pillay, A., Liu, H., Chen, C.Y., Holloway, B. et al.** Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. Sex Transm Dis, 1998, 25, 408–414.
14. **Pillay, A., Liu, H., Ebrahim, S., Chen, C.Y. et al.** Molecular typing of *Treponema pallidum* in South Africa: cross-sectional studies. J Clin Microbiol, 2002, 40, 256–258.
15. **Pope, V., Fox, K., Liu, H., Marfin, A.A. et al.** Molecular subtyping of *Treponema pallidum* from North and South Carolina. J Clin Microbiol, 2005, 43, 3743–3746.
16. **Rodionova, E.N., Gushchin, A.E., Shipulin, G.A., Khludova, N.A. et al.** Detection of *Treponema pallidum* DNA and RNA in clinical material from patients with syphilis at different stages. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 2003, 3, 43–50.
17. **Singh, A.E., Romanowski, B.** Syphilis: review with emphasis on clinical, epidemiologic, and some biologic features. Clin Microbiol Rev, 1999, 12, 187–209.
18. **Sutton, M.Y., Liu, H., Steiner, B., Pillay, A. et al.** Molecular subtyping of *Treponema pallidum* in an Arizona County with increasing syphilis morbidity: use of specimens from ulcers and blood. J Infect Dis, 2001, 183, 1601–1606.
19. **Tantalo, L.C., Lukehart, S.A., Marra, C.M.** *Treponema pallidum* strain-specific differences in neuroinvasion and clinical phenotype in a rabbit model. J Infect Dis, 2005, 191, 75–80.
20. **Wenhai, L., Jianzhong, Z., Cao, Y.** Detection of *Treponema pallidum* in skin lesions of secondary syphilis and

proLékaře.cz | 1.9.2025

characterization of the inflammatory infiltrate. Dermatology, 2004, 208, 94–97.
21. **Wicher, K., Noordhoek, G.T., Abbruscato, F., Wicher, V.** Detection of *Treponema pallidum* in early syphilis by DNA amplification. J Clin Microbiol, 1992, 30, 497–500.
22. **Wormser, G.P., McKenna, D., Carlin, J., Nadelman, R.B. et al.** Brief communication: hematogenous dissemination in early Lyme disease. Ann Intern Med, 2005, 142, 751–755.
23. **Woznicová, V., Heroldová, M.** Direct detection of *Treponema pallidum* in diagnosis of syphilis. Epidemiol Mikrobiol Imunol, 2004, 53, 121–125.
24. **Zákoucká, H., Polanecký, V., Kaštánková, V.** Syphilis and gonorrhoea in the Czech Republic Euro Surveill, 2004, 9, 18–20.

Do redakce došlo 8. 2. 2006

Dr. D. Šmajs
Biologický ústav, LF, MU
Kamenice 5, budova A6
625 00 Brno
E-mail: dsmajs@med.muni.cz



SLOVNÍK NESPISOVNÉ ČEŠTINY

Rozsáhlý výkladový slovník obsahuje více než 12 000 slangových a dalších nespisovných výrazů, včetně klasické mluvy podsvětí (českého argotu). Vedle celé řady tradičních profesních slangů obsahuje též slang současné mládeže, včetně studentského, či drogového. Na klasický kriminální argot navazuje současný vězeňský slang, tradiční brněnský argot, ale i méně známý jazyk světských. Hesla jsou doplněna poznámkami o historii a původu slov. Slovník odhaluje překvapivé souvislosti, ukazuje „úctyhodné“ stáří řady zdánlivě moderních výrazů (čórka, benga, kérka, vejšky, šilingr), velmi zajímavá jsou rovněž slova původem z romštiny či z jidiš. Zajímavý je i divadelní nebo hudební slang, na jehož přípravě se podílely přední osobnosti českého uměleckého života.

Vydal Maxdorf v roce 2006, ISBN 80-7345-086-0, formát A5, váz., 416 str., cena 395 Kč.

Objednávku můžete poslat na adresu: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax: 224 266 226, e-mail: nts@cls.cz