

EREDETI KÖZLEMÉNY

TREPONEMA PALLIDUM NESTED PCR GYAKORLATI JELENTŐSÉGE A SZIFILISZ-DIAGNOSZTIKÁBAN

LEVELEZÉSI CÍM

Petrovay Fruzsina
Országos Epidemiológiai Központ
II. Bakteriológiai Osztály
1097 Budapest, Gyáli út 2-6.
E-mail: petrovay.fruzsina@oek.antsz.hu

TREPONEMA PALLIDUM NESTED PCR AND ITS PRACTICAL IMPORTANCE IN SYPHILIS DIAGNOSTICS

PETROVAY FRUZZSINA, BALLA ESZTER DR., BOROSS KATALIN

Országos Epidemiológiai Központ, II. Bakteriológiai Osztály, Budapest (osztályvezető: Herpay Mária dr.)

ÖSSZEFOGLALÁS

A szifilisz laboratóriumi diagnosztikája bonyolult szerológiai, valamint közvetlen kimutatási eljárásokon alapszik. Utóbbiak klasszikus példája a sötétlátóteres mikroszkópos vizsgálat, fő alkalmazási területe pedig a fertőző stádiumok bőr- és nyálkahártya-elváltozásaira korlátozódik. E szubjektív és kellő klinikai gyakorlatot igénylő módszerrel szemben a *Treponema pallidum* DNS-ének detektálása jóval érzékenyebb, specifikusabb és tágabb körben alkalmazható diagnosztikus alternatívát nyújt, ugyanakkor a szifiliszgyanús minták megfelelő szállítást/tárolást követően is vizsgálatra alkalmasak maradnak. Közleményünkben három pozitív betegminta kapcsán szeretnénk felhívni a figyelmet a *Treponema pallidum* nested PCR gyakorlati hasznára és a vizsgálat elérhetőségére.

KULCSSZAVAK: *Treponema pallidum*, nested PCR, szifilisz

SUMMARY

The laboratory diagnosis of syphilis is based on complicated evaluation of serological reactions and on direct detection techniques. The classic example of the latter tests is the dark-ground microscopy that is applied predominantly on samples taken from mucocutaneous lesions of infectious stages. In contrast to this subjective technique that needs professional experience, the detection of *Treponema pallidum* DNA provides a more sensitive and more specific alternative. It can be widely used for diagnostic purposes while suspicious specimens remain suitable for processing after transported and stored for certain time. By reporting three positive cases the authors aim to draw attention to the practical value of the *Treponema pallidum* nested PCR and to the current availability of this test.

KEY WORDS: *Treponema pallidum*, nested PCR, syphilis

BEVEZETÉS

Az Európai Unióban 2003. januárjától érvénybe lépett esetdefiníciók értelmében az elsődleges és másodlagos szifilisz megerősített eseteiben a szifiliszre gyanús klinikai tünetek mellett meghatározott labor diagnosztikai feltételeknek is teljesülniük kell (1). Utóbbiak csoportjában kerülnek felsorolásra a *T. pallidum* közvetlen kimutatását célzó eljárások, így a PCR is.

A szifilisz diagnosztikában különösen problematikus korai, szeronegatív stádiumban, a kongenitális esetekben, valamint a neuroszifilisz szövődményeknél a PCR alkalmazása jelenthet objektív segítséget (2-3). A sötétlátóteres mikroszkópos vizsgálat ellentétben ily módon nem csupán a felszínes léziókból, hanem a mély szöveti mintákból is igazolható a kórokozó jelenléte; ugyanakkor e jóval specifikusabb vizsgálatnál az orális/rectalis minták potenciális treponema-flórája sem ad álpozitív reakciót (4).

A szerológiai nem vagy kevéssé informatív eseteken túl a sötétlátóteres vizsgálattal negatív (pl. lokálisan „megkezelt”), ám szifiliszgyanús, anogenitális/orális elváltozásoknál is egyértelmű eredményt kaphatunk. A szerológiai reakciót befolyásoló immunhiányos állapotok kapcsán, melyekben esetenként atípusos ulceráció figyelhető meg (pl. HIV fertőzésben herpetiform fekély) (5), azaz sem a klinikai kép, sem az ellenanyagvizsgálatok nem támasztják alá a diagnosztikus gyanút, a nukleinsav-detektálás változatlanul értékes módszer marad. A PCR alkalmazásának további előnye, hogy a reinfekció kockázatának megítélését és a terápia hatékonyságának nyomon követését is lehetővé teszi.

MÓDSZER ÉS EREDMÉNYEK

MINTAVÉTEL

Három férfibeteg szifiliszgyanús genitoanális elváltozásból levett mintáinak feldolgozására került sor molekuláris vizsgálati módszerrel. A sötétlátóteres mikro-

GYNOFLOR
hüvelytabletta

MEDICO HUNG

szköppal végzett előzetes vizsgálat egyiküknél pozitív eredményt adott, a másik két esetben a vizsgálat nem volt értékelhető. Két esetben a peniszről (primer szifilisz gyanúja), harmadik esetben a perianalis tájékon található ulceratív lézióból (szekunder szifilisz), steril vatta- vagy Dacron-pálcával történt a mintavétel.

DNS KIVONÁS

A laboratóriumba beérkezett mintát tartalmazó steril pálcákat 24 óráig 4 °C-on steril PBS (pH 7,2) oldatban áztattuk. Amennyiben a mintavételi cső már fiziológiai sóoldatot, vagy transzportfolyadékot tartalmazott, a mintavevő pálcát a cső falán kinyomkodva távolítottuk el, majd a folyadékot Eppendorf-csőbe pipettáztuk. Az Eppendorf-csőbe mért mintákat 10 percig 10 000 g-vel centrifugáltuk. A felülúszót lepipettáztuk, a pelletből DNS tisztító kittel (Roche High Pure DNA Template Preparation Kit) a gyártó használati utasításának megfelelően a DNS-t kivontuk. A DNS extrakció eredményességét és az inhibitorok jelenlétét a humán β -globin génre tervezett PCR-rel ellenőriztük a PC04 forward (GenBank accession no. A26623) és a GH20 reverz primerekkel (A26624).

T. PALLIDUM NESTED PCR

A *T. pallidum* kimutatása céljából a kórokozó *bmp* (basic membrane protein) génjére tervezett nested PCR (nPCR) vizsgálatot végeztünk el, amely két PCR futtatásból áll (6). A vizsgálat során az első PCR futtatás eredményeként az első oligonukleotid primer pár által közrefogott 617 bázispárnyi génszakasz amplifikálódik. A második „nested” PCR futtatási lépés célszekvenciája az első PCR futtatás terméke. A második lépésben az ehhez a szekvenciához specifikusan kötődő második primer pár által közrefogott 506 bp génszakasz amplifikálódik. A PCR vizsgálatokat Eppendorf thermocycler készülékkel végeztük el, mintánként 20 μ l végtérzfogatban, amelynek összetétele a következő volt: 10x Reddy Mix Buffer (ABgene), 200 μ M dNTP, 0,5-0,5 μ M primerek és 0,5 U Thermoprime *Taq* polymerase (ABgene). A PCR futtatás termékét 1%-os agaróz gélelektroforézissel tettük láthatóvá. (1. ábra)

EREDMÉNYEK

A nPCR vizsgálat eredményei alapján a *T. pallidum* DNS-t mindhárom esetben sikerült kimutatni a genitoanalízis régióból származó mintákból. A vizsgálat specifikitását a második PCR futtatás biztosítja, amely csak abban az esetben működik, ha az első PCR futtatás során az első primer pár specifikusan kötődik a génszakaszon a célszekvenciához. A második PCR futtatási lépés a módszer érzékenységét ugyancsak növeli, mivel az első PCR futtatáskor keletkezett spe-

cifikus génszakasz tovább sokszorozódik, ezáltal a detektálható minta mennyisége megnő.

ÖSSZEFOGLALÁS

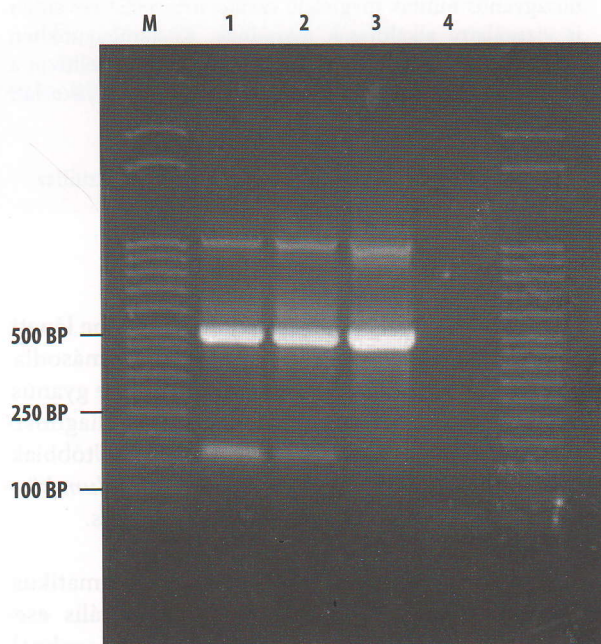
A nested PCR magas specifikitású és érzékenységu módszere gyors és megbízható diagnosztikus alternatívát nyújt az alábbi minták körében:

- primer/szekunder szifilisz betegek bármely testrészen kialakult fekélyek, léziók (elsődleges fekély, szifiliszos condylomák, egyéb régióban kialakuló erodált papulák stb.);
- neuroszifiliszben a liquor; esetenként központi idegrendszeri gummák;
- kongenitális szifiliszben az újszülött vér-, liquor- és szöveti mintáinak (mucocután elváltozások); ill. a placenta; magzatvíz; köldökzsinór vizsgálata során (7).

Mindezeket túl a nukleinsav-detektálást eredményesen alkalmazták:

- látens szifilisz betegek vér- és szöveti mintáinál;
- terciar szifilisz elváltozások, gummák kapcsán (8-9).

A megfelelő mintavételt követően a módszer gyakorlatilag minden szifilisz stádiumban alkalmazható.



1. ábra. *T. pallidum* nested PCR futtatás eredménye. A futtatás során a nagy mennyiségű *T. pallidum* DNS jelenléte miatt aspecifikus csíkok is megjelennek. M: molekulatömeg marker [Sigma] 50 bp; 1-3: anogenitális léziókból vett pozitív minták; 4: negatív kontroll [deszt. víz]. (Results of *T. pallidum* nested PCR run. Aspecific bands are due to the presence of high amount of *T. pallidum* DNA. M: DNA ladder [Sigma] 50 bp; 1-3: samples from anogenital positive lesions; 4: negative control [dist. water])



GYNOFLOR

hüvelytabletta



A mintavétel és tárolás során döntő hangsúlyozni, hogy a levett mintát **szilárd transzportközeg-mentes, üres** csőben kell a laboratóriumba juttatni. Amennyiben a szállítás a mintavételt követő néhány órán belül nem oldható meg, úgy a minta 4 °C-on **hűtve, PBS vagy fiziológiás sóoldatba áztatva**, maximum 48-72 órán át tárolható.

Pozitív esetben a nPCR egyéb klinikai tünetek vagy laboratóriumi tesztek hiányában, önállóan is elegendő információt nyújt a diagnózis megállapításához, melynek alapján mielőbb megkezdhető a célzott terápia, valamint a kontaktuskutatás. A módszer számos előnyös tulajdonsága indokolja, hogy a hazai gyakorlatban is minél szélesebb körben teret kapjon a szifiliszdiagnosztikában.

IRODALOM

1. **Commission of the European Communities:** Commission Decision 2002/253/EC of 19 March 2002 laying down case definitions for reporting communicable diseases to the Community network under Decision No 2119/98/EC of the European Parliament and of the Council (notified under document number C(2002) 1043). Official Journal of the European Communities 2002, L86:44-62.
2. **Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH:** Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis. Clin Microbiol Rev 1995; 8:1-21
3. **Talha E, Kemény B, Horváth I et al:** Syphilis PCR: T. pallidum molekuláris kimutatása szeronegatív esetekben. Bőrgyógy. és Ven. Szemle 2003;79:65-68
4. **Palmer HM, Higgins SP, Herring AJ, et al:** Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. Sex Transm Infect 2003;79:479-483
5. **Rompalo AM, Lawlor J, Seaman P, et al:** Modification of syphilitic genital ulcer manifestations by coexistent HIV infection. Sex Transm Dis 2001;28:448-454
6. **Bruisten SM, Cairo I, Fennema H et al:** Diagnosing Genital Ulcer Disease in a Clinic for Sexually Transmitted Diseases in Amsterdam, The Netherlands. J Clin Microbiol 2001; 39:601-605
7. **Ratnam S:** The laboratory diagnosis of syphilis. Can J Infect Dis Med Microbiol 2005; 16(1):45-51
8. **Castro R, Prieto E, Águas MJ et al:** Detection of *Treponem pallidum* sp *pallidum* DNA in latent syphilis. International Journal of STD & AIDS 2007; 18:842-845
9. **Zoechling N, Schluenzen EM, Soyer HP et al:** Molecular detection of *Treponema pallidum* in secondary and tertiary syphilis. British Journal of Dermatology 1997; 136(5):683-686

Érkezett: 2008. október 16. • Közlésre elfogadva: 2008. október 30.

UROGENITÁLIS INFEKCIÓK KEZELÉSE

Tetracyclin Wolff

250 és 500 mg kapszula
KISZERELÉS: 30X

INDIKÁCIÓ

- Mycoplasma
- Chlamydia
- Ureaplasma okozta húgyúti és nőgyógyászati infekciók

ELLENJAVALLT

Tetraciklinek (pl. Tetrán) iránti túlérzékenység esetén, továbbá terhesség második felében és szoptatás ideje alatt.



DR·WOLFF