



ГЕНОМИКА БЛЕДНОЙ ТРЕПОНЕМЫ И ПЦР-ДИАГНОСТИКА СИФИЛИСА

Жукова И.Ю.¹, Магазова Р.А.¹, Чемерис Д.А.², Мавзютов А.Р.³

¹Республиканский кожно-венерологический диспансер, Уфа, ²Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, ³Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, ufalab@mail.ru

Резюме

Рассмотрены особенности организации геномов у ряда представителей рода *Treponema*, включая повторяющиеся участки, пригодные для генотипирования отдельных штаммов. Приведены аргументы в пользу недавнего (517 - 518 лет назад) происхождения венерического сифилиса. На основе нуклеотидных последовательностей генов рРНК построены филогенетические деревья некоторых видов трепонем и подвидов бледной трепонемы. Приведены примеры обнаружения бледных трепонем с помощью амплификации фрагментов отдельных генов с помощью ПЦР по конечной точке и в реальном времени.

Ключевые слова: бледная трепонема, геномика, геном, сифилис, ПЦР, ПЦР в реальном времени, генотипирование, *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, *T. pallidum* subsp. *pertenue*, гены 16S рРНК, 23S рРНК

Введение

Инфекционных заболеваний человека, вызываемых простейшими, бактериями, вирусами, известно немало. Некоторые из них протекают почти незаметно и проходят практически бесследно. Другие таят в себе серьезную угрозу здоровью их носителей, включая потомство, и способны привести к летальному исходу. При этом своевременная и точная диагностика играет решающую роль в излечении и недопущении распространения инфекции. К одному из таких опасных хронических заболеваний относится сифилис. Этиологическим агентом сифилиса служит бледная трепонема *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, представляющая собой бактерию спиралевидной формы (в ее наиболее активном патогенном состоянии) диаметром 0,2-0,4 мкм и длиной от 6 до 14 мкм. Учитывая и серьезность заболевания, и то, что этот микроорганизм не поддается культивированию на искусственных средах, тем самым сильно затрудняя работу с ним, вся последовательность ДНК этой бактерии была расшифрована в группе первых полностью секвенированных бактериальных геномов [Fraser et al., 1998]. Особенностью бледной трепонемы оказался довольно малый размер генома, составляющий всего 1 миллион 138 тысяч 6 пар нуклеотидов, что в 4 раза меньше генома кишечной палочки *E.coli* K-12 штамма MG1655, состоящего из 4 миллионов 639

тысяч 221 пн [Blattner et al., 1997]. Удивительно то, что имея такой небольшой геном, бледная трепонема «сумела» заложить в нем большое разнообразие генетических программ, выражающихся в многостадийности течения болезни, причем каждая стадия имеет свои особенности и этапы, а между вторичным и третичным сифилисом могут пройти годы незаметного течения инфекции. Полисистемность сифилиса с серьезным поражением многих органов делает это заболевание довольно тяжелым. Поскольку для эффективного и своевременного начала лечебного процесса необходимо быстрое установление достоверного диагноза, то данному вопросу всегда уделялось серьезное внимание. Так, в настоящее время существует большое количество диагностических тестов, направленных на выявление возбудителя сифилиса - бледной трепонемы, которые можно разделить на прямые и непрямые (серологические) методы. Серологические методы детекции возбудителя сифилиса принято подразделять на трепонемные и нетрепонемные. К нетрепонемным тестам относятся РСКк (реакция связывания комплемента с кардиолипиновым антигеном), МР или РМП (реакция микропреципитации). К трепонемным тестам относятся РСКт (реакция связывания комплемента с трепонемным антигеном), РИБТ или РИТ (реакция иммобилизации бледных трепонем), РИФ

(реакция иммунофлуоресценции), РПГА (реакция пассивной гемагглютинации), ИФА (иммуноферментный анализ), иммуноблоттинг, иммуногистохимический анализ и др.

К прямым методам относятся те, что непосредственно выявляют патогенный микроорганизм или его генетический аппарат. Так, классическим методом обнаружения трепонем является темнопольная микроскопия. Одним из недостатков метода является возможность принятия за бледных трепонем других спирохет, представляющих нормальную генитальную (*T.refringens*) или оральную (*T.denticola*) микрофлору. Поскольку бледная трепонема не поддается полноценному культивированию на искусственных питательных средах "золотым стандартом" до сих пор считается метод инфицирования кроликов, для которого требуется наличие, по крайней мере, 20 бактерий в инокуляте. Однако, этот метод весьма длителен и довольно дорог для того, чтобы его можно было использовать в обычной клинической практике.

Такое разнообразие методов выявления сифилиса свидетельствует с одной стороны о важности правильной диагностики этого заболевания, а с другой – об отсутствии высокочувствительного, быстрого, удобного и недорогого метода обнаружения эффекта присутствия в человеческом организме бледных трепонем. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), детектирующий наличие генетического материала возбудителей различных инфекций и прямо свидетельствующий об их наличии, благодаря своей чувствительности и относительной простоте стал для многих инфекционных заболеваний основным методом диагностики, однако в силу ряда причин для выявления бледных трепонем в клинической практике до сих пор не рекомендован к применению, и его использование носит пока исключительно научно-исследовательский характер.

Трепанематозы и их этиологические агенты

Помимо бледной трепонемы *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, вызывающей венерический сифилис, имеются еще несколько видов и подвидов данной бактерии, служащих этиологическими агентами других менее опасных заболеваний у человека, передающихся физически контактным, но неполовым путем. Так, микроорганизм *T. pallidum* subsp. *pertenue* вызывает тропическую гранулему или фрамбезию, распространенную в местах с жарким и влажным климатом. *T. pallidum* subsp. *endemicum* является возбудителем хронического генерализованного спирохетоза, известного еще как беджель или эндемичный сифилис. Также в жарком климате встречается болезнь пинта или карате, вызываемая

микроорганизмом *T. carateum*. Отдельный научный интерес представляет обезьяний штамм бледной трепонемы, выделенный у бабуинов в начале 60-х в Западной Африке. Также необходимо отметить существование бактерии *T. paraluisuniculi*, ответственной за сифилис у кроликов.

До сих пор нет единого мнения относительно происхождения венерического сифилиса. Некоторые исследователи считают, что эта болезнь сопровождает человечество еще со времен *Homo erectus*, другие склонны считать, что этой болезни приблизительно от 5000 до 16500 лет. При этом многие факты указывают на то, что венерический сифилис относительно недавнего происхождения, а человечество обязано за его появление экспедициям Христофора Колумба, моряки которого привезли данную болезнь из Нового Света. Так, одним из доказательств этого считается, что первая упоминаемая эпидемия сифилиса в Европе датирована 1495 г. вскоре после плаваний каравелл в Южную Америку, а на костных останках в различных погребениях доколумбовой Европы никогда не выявлялись сифилитические следы. К молекулярно-биологическому доказательству гипотезы возникновения венерического сифилиса мы вернемся ниже.

Геномная организация бледных трепонем

Как уже отмечалось выше геном бледной трепонемы, представляющий собой кольцевую ДНК, был прочитан одним из первых среди полностью секвенированных геномов микроорганизмов [Fraser et al., 1998]. Для секвенирования был выбран штамм Nichols, выделенный в США еще в 1912 г. Геном данного штамма бледной трепонемы имеет протяженность всего 1138006 пар нуклеотидов и характеризуется довольно высоким GC-составом (52,8%). В нем обнаружены открытые рамки считывания, кодирующие предположительно 1041 белок. Следует отметить наличие в относительно небольшом геноме бледной спирохеты *T. pallidum* 61 типа (всех возможных) генов tРНК, что косвенно свидетельствует об очень высокой приспособленности данной бактерии к проживанию внутри эукариотического организма.

Впоследствии были полностью секвенированы еще два штамма *T. pallidum* subsp. *pallidum*. Штамм SS14, выделенный в 1977 г. в Атланте, имеет размер 1139457 пн [Matejkova et al., 2008], что почти на 1500 пн превышает размер генома у штамма Nichols. Однако между ними обнаружены относительно небольшие отличия в виде 327 однонуклеотидных замен, а также разной протяженности 12 делеций (от 1 до 168 пн) и 13 инсерций (от 1 до 419 пн), причем данные инделы (инсерции/делеции) приходятся главным образом на участки с повторяющимися последовательностями, являющимися характерными чертами геномов бледных

спирохет. Третьим представителем *T. pallidum* subsp. *pallidum* с полностью секвенированным геномом стал штамм Chicago, выделенный в 1951 г. Размер генома *T. pallidum* subsp. *pallidum* штамма Chicago равен 1139281 пн [Giacani et al., 2010]. Данный штамм от штамма Nichols отличается всего 41 однонуклеотидной заменой, но 21/75 разнопротяженными инделями. В нем обнаружено чуть больше открытых рамок считывания, кодирующих потенциальные белки – 1081. Еще одним представителем рода *Treponema*, для которого ранее стала известна вся последовательность генома оказался микроорганизм *T. denticola*. Размер генома данной бактерии составляет 22843201 пн, потенциально кодирующих 2786 предположительных белков [Seshardi et al., 2004]. Помимо своего более крупного размера геном *T. denticola* отличается от геномов *T. pallidum* subsp. *pallidum* еще и своим довольно низким GC-составом – 37,9% против 52,8% у бледных трепонем. Синтения (консервация порядка генов) у данных геномов практически не наблюдается, что свидетельствует об их довольно раннем расхождении в эволюции. Совсем недавно завершено секвенирование еще одного трепонемного генома, принадлежащего бактерии *T. paraluisuniculi*, не патогенного для человека, но вызывающего сифилис у кроликов [Smajs et al., 2011]. Его размер оказался чуть меньше, чем у штаммов бледных трепонем Nichols, SS14, Chicago и авторы связали этот факт с непатогенностью для человека, поскольку имеющиеся делеции не распределены равномерно по всему геному, а приходятся главным образом на участок повторяющихся паралогичных генов так называемого *trp* семейства, кодирующего поверхностные белки, ответственные за иммунный статус. Из 1133390 пн генома *T. paraluisuniculi*, кодирующих 1016 потенциальных белков, 1092714 пн совпадает по расположению с аналогичными участками генома штамма Nichols, при этом они отличаются между собой

8074 однонуклеотидными заменами и разнопротяженными 224 инделями, но при этом идентичность сравниваемых участков геномов этих микроорганизмов весьма высока и составляет 99,16%.

Помимо полностью секвенированных геномов бледных трепонем и близких к ним видов, в совместной работе чешских и американских авторов [Mikalova et al., 2010] проведен полногеномный фингерпринтинг и секвенирование отдельных участков геномов микроорганизмов *T. pallidum* subsp. *pallidum* штаммов DAL-1, Mexico, а также штаммов Samoa D, CDC-2, Gauthier близкородственной бактерии *T. pallidum* subsp. *pertenue* и так называемого «обезьяньего» изолята Fribourg-Blanc бледной трепонемы, выделенного еще в 1962 году. Полученные результаты свидетельствуют о сходной структуре исследованных геномов, а идентичность последовательности нуклеотидов в гомологичных участках достигает 99,57 – 99,98%. Эти авторы сделали вывод, что основные отличия между геномами микроорганизмов *T. pallidum* subsp. *pallidum* и *T. pallidum* subsp. *pertenue* приходится на шесть регионов, видимо, как раз и определяющих патогенность штаммов. Обезьяний изолят бледной трепонемы по их данным оказался заметно ближе к штаммам *T. pallidum* subsp. *pertenue*.

Известно, что нуклеотидные последовательности высококонсервативных генов рибосомных РНК весьма удобны для филогенетических построений и обнаружения родства между микроорганизмами. Так, проведенное нами с помощью компьютерной программы MegAlign из пакета LaserGene фирмы DNASTar, Inc. (США) множественное выравнивание известных и доступных из GenBank нуклеотидных последовательностей генов 16S и 23S рРНК ряда бактерий рода *Treponema* даже на основе фактически единичных замен, ввиду их близкородственности, позволило построить филогенетические деревья данных микроорганизмов (рис. 1 и 2).

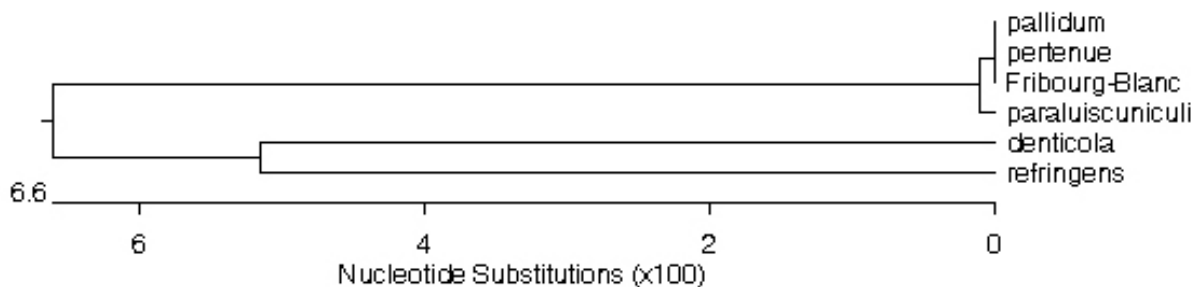


Рис.1. Филогенетическое дерево трепонем, построенное на основании сходства генов 16S рРНК

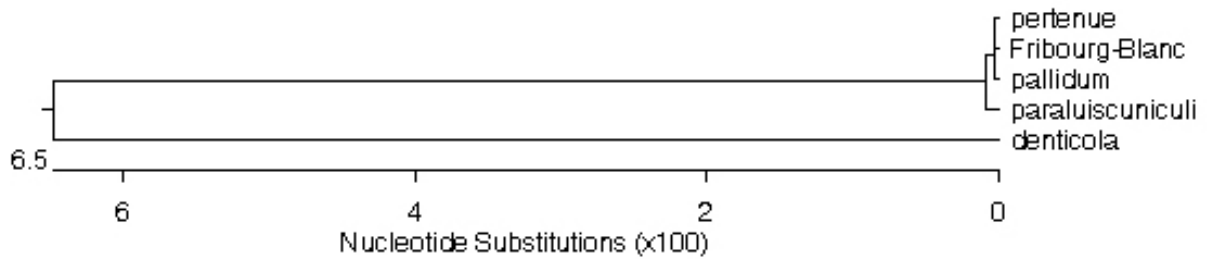


Рис.2. Филогенетическое древо трепонем, построенное на основании сходства генов 23S рНК

Как и следовало ожидать, *T.denticola* вместе с *T.refringens* (последовательность гена 23S рНК для последнего вида пока не известна), сформировав отдельную ветвь, оказались достаточно удаленными от остальных взятых в анализ трепонем. Подвид *pertenuae* весьма близок к обезьяньему изоляту трепонемы, подвид *pallidum* находится с ними в одном кластере, а бактерия *T.paraluisaniculi* также закономерно несколько отдалена от него.

Анализируя нуклеотидные последовательности 21 фрагмента, разбросанных по геному трепонем у 26 географически удаленных штаммов, включая изолят обезьяньего штамма и инфицирующий кроликов вид трепонем *T. paraluisaniculi*, международная группа авторов [Harper et al., 2008a] предприняла попытку выявить протосифилитическую бактерию. Ими было получено некоторое доказательство того, что в тропических лесах Гайаны на северо-восточном побережье Южной Америки существовала бактерия, вызывающая у местного, весьма изолированного и почти не контактирующего с внешним миром племени Аквио распространенную в тех местах фрамбезию, но не совсем обычную, а несколько напоминающую венерический сифилис. Таких больных еще в 1999 г. обнаружил канадский врач M.S.Silverman, который, целенаправленно поехав туда спустя несколько лет, доставил образцы ДНК для секвенирования [Zimmer, 2008]. К сожалению, он смог доставить только сильно разрушенную ДНК, непригодную для полногеномного секвенирования, но и полученная фрагментарная информация о нуклеотидных последовательностях участков некоторых генов этих штаммов, позволила сделать предварительный вывод, что среди представителей данного племени циркулировал штамм трепонемы, который мог ранее послужить исходным для мутирования и формирования из него агента уже венерического сифилиса после завоза этого штамма моряками Х.Колумба в более прохладный и сухой климат Старого Света, что до некоторой степени подтверждает гипотезу недавнего (517 - 518 лет назад) возникновения современного сифилиса. Так случилось, что в результате проведенной антибиотикотерапии болезнь в данном племени была излечена, а

инфекционный агент полностью ликвидирован. В последние годы новых случаев заболевания фрамбезией в этом племени не отмечается, следовательно, взять материал для полногеномного секвенирования этого необычного штамма сейчас уже негде.

Генотипирование штаммов бледной трепонемы

Геном бледной трепонемы, помимо своего небольшого размера, имеет еще и другие своеобразные черты в виде повторяющихся генов или генов с внутренними повторами. К первым относится семейство генов *tpr*, которых насчитывается 12 [Fraser et al., 1998]. Эта группа генов, кодирующих поверхностные белки, принимающие участие в формировании иммунного ответа, была подразделена на 3 подсемейства: I (*C, D, F, I*); II (*E, G, J*); III (*A, B, H, K, L*). Для первого и второго подсемейства *tpr* генов характерны консервативные 5'- и 3'-фланкирующие участки с переменными последовательностями между ними, а *tpr* гены третьего подсемейства несут перемежающиеся консервативные и переменные участки. Гены *tprD* и *tprK* характеризуются наличием гетерогенных повторов [Centurion-Lara et al., 2000; 2000a; Stamm, Bergen, 2000]. Секвенирование генов *tprC, D, I, K, G, J* у большого числа штаммов трех подвидов бледной трепонемы (*pallidum, pertenuae, endemicum*), кроличьего и обезьяньего штаммов трепонем показало, что существует гораздо больший уровень вариативности между подвидами, чем внутри них [Gray et al., 2006]. Исходя из их вариативности, гены *tpr* могут быть использованы для генотипирования штаммов трепонем. Так, за счет того, что наряду с участками высокой гомологии, гены *tpr* содержат переменные последовательности, возможно проведение ПЦР с последующим расщеплением ампликонов подходящей рестрикционной эндонуклеазой (ПЦР-ПДФ) и разделением фрагментов ДНК по размеру с помощью гель-электрофореза [Pillay et al., 1998].

Другим оригинальным геном является ген *arp* (acid repeat protein), кодирующий кислый белок с внутренними повторами [Fraser et al., 1998]. Его оригинальность заключается в наличии в средней

части гена высокомолекулярных друг другу повторов длиной 60 пар нуклеотидов, которых у настоящего времени проанализированных штаммов обнаружено от 1 до 20. Исходя из числа повторов внутри гена *arp*, выявляемых с помощью ПЦР вкупе с электрофоретическим разделением ампликонов по размеру, и комбинаций рестриктазных фрагментов генов *tpr*, обнаруживаемых с помощью ПЦР-ПДРФ, появляется возможность генотипирования штаммов бледной трепонемы с присвоением им буквенно-цифрового обозначения, например - 14f или 20с, где числа обозначают количество 60-пн повторов гена *arp*, а буквы - характер распределения рестриктазных фрагментов в гене *tpr*. На основе предложенной системы проведено генотипирование штаммов бледной трепонемы в ряде штатов США, в Канаде, ЮАР, Португалии и других странах [Pillay et al., 1998; Sutton et al., 2001; Pillay et al., 2002; Pope et al., 2005; Liu et al., 2007; Molepo et al., 2007; Florindo et al., 2008; Castro et al., 2009; Martin et al., 2009; 2010]. Применение подобного подхода к генотипированию штаммов бледной трепонемы, обнаруженных у первично и повторно заразившихся, может помочь с решением вопроса относительно реинфекции или реверсии. Причем теоретическое число комбинаций сочетаний числа повторов в *arp* гене и числа рестриктазных фрагментов в группе генов *tpr* весьма велико, однако однозначный ответ на поставленный вопрос о реинфекции зависит и от циркулирующих на той или иной территории различающихся по этим признакам штаммов бледной трепонемы.

Так, серьезной проблемой при лечении сифилиса по-прежнему остается отсутствие надежных критериев излеченности, поскольку у многих больных серологические реакции остаются положительными в течение многих лет, а нередко и всю жизнь. Одной из возможных причин этого является трансформация бледных трепонем в L-форму, сохраняющихся в таком виде в малых количествах в организме переболевшего, не реверсируя в патогенную спиралевидную форму. Являясь слабыми антигенными раздражителями, трепонемы в L-форме способствуют формированию и поддержке позитивных серологических реакций. При этом количество бактерий так невелико, что обычно не выявляется с помощью даже более чувствительной вложенной ПЦР, о которой речь пойдет ниже. Однако известны случаи повторного заражения сифилисом, и здесь сразу возникает вопрос о произошедшей реверсии, поскольку постановка правильного диагноза в виде реинфекции или суперинфекции бывает затруднительной, хотя возможность реинфекции исходит из теоретически возможной полной излечимости сифилиса при отсутствии стойкого приобретенного иммунитета. В некоторой

степени ситуацию с реинфекцией или суперинфекцией могло бы прояснить проводимое с помощью ПЦР генотипирование штамма бледной трепонемы, которой пациент был заражен ранее, и генотипирование того штамма, который обнаружен у него вновь. В случае обнаружения у штаммов генетических отличий можно довольно уверенно говорить о реинфекции, в то время как совпадение анализируемых характеристик штаммов не позволит исключить обе версии. Еще одним вариантом может быть обнаружение обоих (разных) штаммов, что будет свидетельствовать и об имевшей место реинфекции и об одновременной реверсии имевшейся L-формы прежнего штамма, инициированной развивающейся инфекцией и ослаблением иммунного статуса организма.

Помимо генотипирования, не меньший интерес к *arp* генам вызван тем, что их внутренние 60 пн повторы неодинаковы по своей последовательности и их насчитывается в настоящее время до 7 типов, причем прослеживается довольно четкая зависимость патогенности штамма от конкретного типа повторов [Harper et al., 2008]. Так, для патогенных для человека штаммов Nichols, Dallas, Chicago, Mexico A и др., вызывающих у человека венерический сифилис, характерно наличие 4 типов повторов: I - III и II/III, являющихся неким гибридом повторов II и III типов. Для штаммов, относящихся к подвидам *pertenue* и *endemicum*, а также обезьяньего изолята трепонемы характерно наличие только одного типа повторов – II. Самостоятельный вид трепонемы – *T. paraluiscuniculi*, инфицирующий кроликов, несет иные типы повторов, обозначенных как IV, V, VI и VII. При этом все 7 типов данных повторов у различных штаммов трепонем высокомолекулярны друг другу и несут лишь единичные замены нуклеотидов, приводящие к заменам аминокислот в белке. Таким образом, эффект даже единичных замен в отдельных важных для вирулентности генов данных бактерий может быть весьма ощутим, что служит дополнительным доказательством возможности легкого и быстрого мутирования штамма подвида *pertenue* и превращения его в подвид *pallidum T.pallidum* 517 - 518 лет назад.

Диагностика сифилитической инфекции с помощью ПЦР по конечной точке

Использование ПЦР для обнаружения микроорганизма *T. pallidum* subsp. *pallidum* стало применяться в начале 90-х годов прошлого столетия. [Hay et al., 1990; Noordhoek et al., 1990; Burstain et al., 1991; Grimpel et al., 1991 Noordhoek et al., 1991; Wicher et al., 1992]. С тех пор появилась масса работ, посвященных различным вариантам детекции бледной трепонемы с помощью ПЦР. Так, во множестве экспериментальных и обзорных работ, где проводилось

сравнение ряда методов стандартной диагностики сифилиса с использованием ПЦР, подчеркивается, что с помощью последнего метода удавалось детектировать наличие трепонем у гораздо более высокого процента истинно больных [Sanchez et al., 1993; Jethwa et al., 1995; Cummings et al., 1996; Bruisten et al., 2001; Buffet et al., 2007; Scott et al., 2010 и др.] с высокой специфичностью, приближающейся к 100%. При этом упоминаемые в статьях детектируемые минимальные количества бактерий разнятся на порядки. В случаях вторичного и особенно третичного сифилиса эффективность обнаружения бледных трепонем с помощью ПЦР была значительно ниже, тем не менее, значительно превышая возможности остальных методов, тем более, если учесть, что многие переболевшие сифилисом остаются серопозитивными на всю жизнь. Главной причиной не 100%-ного выявления инфекционных агентов с помощью ПЦР-диагностики является, скорее всего, сниженное количество бактерий в разные периоды болезни в организме больных. Более того, поскольку трепонема способна переходить в неактивные L-формы, персистирующие в организме длительное время, то их количества оказываются слишком малыми для того, чтобы детектировать бактерии даже с помощью такой высокочувствительной реакции как ПЦР. Практически во всех работах, посвященных детекции трепонем на стадиях вторичного и третичного сифилиса, подчеркивается недостаточная чувствительность метода ПЦР, который при этом все равно остается наиболее чувствительным по сравнению с остальными методами. Цикл размножения трепонем таков, что деления бактериальных клеток происходят через 30 часов, тогда как для кишечной палочки достаточно для деления 30 минут, вследствие чего количество трепонем в организме человека всегда относительно невысокое. По этой причине для того, чтобы детектировать с помощью ПЦР специфичные участки генома бледной трепонемы применяют так называемую "вложенную" (nested) или "наполовину вложенную" (semi-nested) ПЦР, которые фактически представляют собой двухраундовую ПЦР, заметно увеличивающую конечное число ампликонов и соответственно снижающее необходимое стартовое количество молекул ДНК. Вложенная ПЦР представляет собой 4-х праймерную систему, где в первом раунде (25 - 30 циклов) "работают" внешние праймеры, а затем с алиquotой из первой реакции проводится второй раунд ПЦР (также 25 - 30 циклов), куда добавляются внутренние праймеры. Наполовину вложенной ПЦР называется реакция, в которую добавляется только один внутренний праймер, а один из внешних составляет ему пару. Считается, что при наличии в пробе искомым молекул ДНК в количестве в 10^5 будет достаточно 25 - 30 циклов ПЦР. Для 10^4 молекул уже потребуется 30 - 35 циклов. А если ожидаемое количество искомым молекул ДНК ниже 50

или даже 100 копий, то рекомендуется проводить вложенную ПЦР. Таким образом, при увеличении чувствительности метода при таком варианте проведения ПЦР время анализа увеличивается практически вдвое.

С помощью вложенной или наполовину вложенной ПЦР в ряде работ была успешно осуществлена детекция возбудителя венерического сифилиса [Noordhoek et al., 1991; Zochling et al., 1997; Wicher et al., 1998; Pietravalle et al., 1999; Родионова и др., 2003; Wenhai et al., 2004; Woznicova et al., 2007; Behrohf et al., 2008; Talha et al., 2009]. В отдельных работах, где с помощью вложенной ПЦР детектировались фрагменты ДНК бледной трепонемы, сообщается о предварительных этапах концентрирования, преследующих цель детектировать изначально очень низкое число копий мишени [Noordhoek et al., 1991; Родионова и др. 2003].

В качестве мишеней для детекции бледных трепонем использовались различные фрагменты генов: 190 кДа мультимерного белка [Noordhoek et al., 1990], TmpA и 4D [Hay et al., 1990], 47 кДа белка внешней мембраны [Burstain et al., 1991; Grimpel et al., 1991; Jethwa et al., 1995; Zochling et al., 1997; Kouznetsov, Prinz, 2002; Palmer et al., 2003; Kouznetsov et al., 2005; Buffet et al., 2007; Talha et al., 2009], 39 кДа белка мембраны [Noordhoek et al., 1991; Wicher et al., 1992], ДНК полимеразы [Liu et al., 2001; Marfin et al., 2001; Behrohf et al., 2008], 15 кДа липопроотеида [Centurion-Lara et al., 1997; 2006], липопроотеида мембраны tmpC [Centurion-Lara et al., 1997; 1998; Woznicova et al., 2007], flaA гена [Champion et al., 2005; Salazar et al., 2007]. Отдельного упоминания заслуживает такая мишень как 16S рРНК, поскольку с помощью обратнотранскрипционной ПЦР ведется детекция не только копий генов рРНК в геномах трепонем, но и присутствующее в бактериальной клетке весьма большое число молекул самой рРНК, что повышает чувствительность такого подхода [Centurion-Lara et al., 1997a].

В отечественной литературе не так много работ, посвященных использованию ПЦР для диагностики сифилиса [Петухова, 2002; Стрельченко, 2002; Родионова и др. 2003; Гуцин и др., 2005; Иванов и др., 2006; Дударева, 2007; Китаева и др., 2008; Кубанова и др. 2006; Гуцин и др., 2009]. До сих пор диагностика сифилиса с помощью ПЦР носит в нашей стране исследовательский характер.

Диагностика сифилитической инфекции с помощью ПЦР в реальном времени

Серьезные преимущества применения ПЦР в реальном времени в виде улучшенной количественной оценки исходного числа копий мишеней, а также исключения при проведении стандартной ПЦР загрязнения рабочей зоны миллионами ампликонов,

поднимающихся в воздух при открытии пробирок и способных провоцировать в диагностических исследованиях ложно-положительные результаты, привели к тому, что в последние годы стали появляться статьи, где детекция бледных трепонем ведется именно с помощью ПЦР в реальном времени [Champion et al., 2005; Chen et al., 2006; Koek et al., 2006; Muller et al., 2006; Rajan et al., 2006; Leslie et al., 2007; Salazar et al., 2007; Gayet-Ageron et al., 2009; Suntoke et al., 2009; Neymans et al., 2010; Scott et al., 2010; Cornut et al., 2011]. Из целого спектра генов-мишеней, амплифицируемых в обычной ПЦР в ПЦР в режиме реального времени исследователи остановили свой выбор на детекции лишь некоторых генов: ДНК полимеразы, 47 кДа поверхностного белка, а также белка флагеллина. Чаще всего используется вариант ПЦР на основе TaqMan системы с гибридационным зондом. При этом размеры амплифицируемых фрагментов закономерно уменьшились и в большинстве случаев не превышают 80-100 пн. В некоторых работах проводилась мультиплексная ПЦР в реальном времени, позволяющая вести одновременную детекцию разных возбудителей, включая бледную трепонему [Suntoke et al., 2009; Scott et al., 2010].

Сообщается о выявлении азитромицин-устойчивых штаммов бледных трепонем с помощью амплификации в режиме реального времени фрагмента гена 23S рРНК [Pandori et al., 2007]. Ранее было обнаружено, что замена нуклеотида А на G в 2058 положении гена 23S рРНК обеспечивает устойчивость некоторых штаммов трепонем к данному антибиотику и соответственно непригодности последнего для лечения больных, инфицированных такими штаммами [Stamm, Bergen, 2000; Lukehart et al., 2004]. Так, с помощью амплификации короткого фрагмента гена 23S рРНК, включающего точку мутации, и последующего высокочувствительного плавления ампликонов оказалось возможным дискриминировать устойчивые к азитромицину штаммы бледных трепонем [Pandori et al., 2007].

Заключение

Учитывая высокую чувствительность и специфичность обнаружения бледных трепонем в различных тканях и жидкостях организма больного, представляется вполне вероятным, что уже в недалеком будущем ПЦР-диагностика сифилиса войдет в обязательный перечень методов детекции этой опасной инфекции. Причем, вне всякого сомнения тот факт, что преимущественно будет рекомендоваться проведение амплификации в режиме реального времени. При этом для диагностики сифилиса необходимо разработать еще более высокочувствительный и высокоспецифичный метод, который при проведении

ПЦР или ее аналога будет способен быстро дать однозначный ответ о наличии данных бактерий и осуществить количественную оценку. Важное значение может иметь генотипирование штаммов бледных трепонем, циркулирующих на территории Российской Федерации.

"Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг., в рамках реализации мероприятия № 1.2.1. Государственный контракт №П385 от 30.07.2009."

Цитированная литература

1. Гуцин А.Е., Баткаев Э.А., Топоровский Л.М., Чухриенко И.Ю., Дударева Л.А. Возможности и перспективы метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в диагностике ранних форм сифилиса // Вестн. последиплом. мед. образования. 2005. №1. С.65.
2. Гуцин А.Е., Топоровский Л.М., Фриго Н.В., Дударева Л.А., Ротанов С.В. Перспективы применения полимеразной цепной реакции в диагностике ранних форм сифилиса // Вестник дерматологии и венерологии, 2009. № 1. С.46-51.
3. Дударева Л.А. Клиническая оценка современных методов диагностики у больных ранними формами сифилиса (клинико- лабораторное исследование). Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. М., 2007.
4. Иванов А.М., Гуцин А.Е., Топоровский Л.М., Фриго Н.В., Баткаев Э.А., Дударева Л.А., Ротанов С.В. Современные методы диагностики ранних форм сифилиса: ПЦР в реальном времени и иммуноблоттинг // Вестник последипломного медицинского образования, 2006. № 2. С.18-20.
5. Китаева Н.В., Фриго Н.В., Мелехина Л.Е. Современные технологии диагностики сифилитической инфекции // Вестник дерматологии и венерологии. - 2008. - № 5. - С. 51-59.
6. Кубанова А.А., Говорун В.М., Китаева Н.В., Фриго Н.В., Кубанов А.А., Ротанов С.В. Достижения и перспективы изучения *Treponema pallidum* // Вестник дерматологии и венерологии, 2006. № 5. С.34-37.
7. Петухова И.И. Возможности полимеразной цепной реакции в детекции бледной трепонемы у больных сифилисом: Автореф. дис...канд. мед. наук. М., 2002.
8. Родионова Е.Н., Гуцин А.Е., Шипудин Г.А., Хлудова Н.А., Топоровский Д.М., Николенко

- Ю.А., Тома В.С., Дударева Л.А., Покровский В.В. Выявление ДНК и РНК *Treponema pallidum* в клиническом материале у пациентов с различными стадиями сифилиса // Журн. Микробиол. 2003. №3. С.43-50.
9. Стрельченко О.В. Информативность полимеразной цепной реакции при диагностике серорезистентности после лечения сифилиса / М. ВНТИЦ, 2002. 100с.
 10. Behrhof W., Springer E., Brauninger W., Kirkpatrick C.J., 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. V.61. P.390-395.
 11. Blattner F.R., Plunkett G. 3rd, Bloch C.A. et al., The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12 // *Science.* 1997. V.277. P.1453-1462.
 12. Bruisten S.M., Cairo I., Fennema H., Pijl A., Buimer M., Peerbooms P.G., Van Dyck E., Meijer A., Ossewaarde J.M., van Doornum G.J. Diagnosing genital ulcer disease in a clinic for sexually transmitted diseases in Amsterdam, The Netherlands // *J. Clin. Microbiol.* 2001. V.39. P.601-605.
 13. Buffet M., Grange P.A., Gerhardt P., Carlotti A., Calvez V., Bianchi A., Dupin N. Diagnosing *Treponema pallidum* in secondary syphilis by PCR and immunohistochemistry // *J. Invest. Dermatol.* 2007. V. 127. P.2345-2350.
 14. Burstain J.M., Grimprel E., Lukehart S.A., Norgard M.V., Radolf J.D. Sensitive detection of *Treponema pallidum* by using the polymerase chain reaction // *J. Clin. Microbiol.* 1991. V.29. P.62-69.
 15. Castro R., Prieto E., Aguas M.J., Manata M.J., Botas J., Pereira F.M. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Lisbon, Portugal // *J. Clin. Microbiol.* 2009. V.47. P.2510-2512.
 16. Centurion-Lara A., Arroll T., Castillo R., Shaffer J.M., Castro C., Van Voorhis W.C., Lukehart S.A. Conservation of the 15-kilodalton lipoprotein among *Treponema pallidum* subspecies and strains and other pathogenic treponemes: genetic and antigenic analyses // *Infect. Immun.* 1997. V.65. P.1440-1444.
 17. Centurion-Lara A., Castro C., Castillo R., Shaffer J.M., Van Voorhis W.C., Lukehart S.A. The flanking region sequences of the 15-kDa lipoprotein gene differentiate pathogenic treponemes // *J. Infect. Dis.* 1998. V.177. P.1036-1040.
 18. Centurion-Lara A., Castro C., Shaffer J.M., Van Voorhis W.C., Marra C.M., Lukehart S.A. Detection of *Treponema pallidum* by a sensitive reverse transcriptase PCR // *J. Clin. Microbiol.* 1997a. V.35. P.1348-1352.
 19. Centurion-Lara A., Godornes C., Castro C., Van Voorhis W.C., Lukehart S.A. The *tpkK* gene is heterogeneous among *Treponema pallidum* strains and has multiple alleles // *Infect. Immun.* 2000. V.68. P.824-831.
 20. Centurion-Lara A., Molini B.J., Godornes C., Sun E., Hevner K., Van Voorhis W.C., Lukehart S.A. Molecular differentiation of *Treponema pallidum* subspecies // *J. Clin. Microbiol.* 2006. V.44. P.3377-3380.
 21. Centurion-Lara A., Sun E.S., Barrett L.K., Castro C., Lukehart S.A., Van Voorhis W.C. Multiple alleles of *Treponema pallidum* repeat gene D in *Treponema pallidum* isolates // *J. Bacteriol.* 2000a. V.182. P.2332-2335.
 22. Champion C.I., Blanco D.R., Lovett M.A. Quantitative assessment of protection in experimental syphilis // *Infect. Immun.* 2005. V.73. P.5923-5927.
 23. Chen C.Y., Chi K.H., George R.W., Cox D.L., Srivastava A., Rui Silva M., Carneiro F., Lauwers G.Y., Ballard R.C. Diagnosis of gastric syphilis by direct immunofluorescence staining and real-time PCR testing // *J. Clin. Microbiol.* 2006. V.44. P.3452-3456.
 24. Cornut P.L., Sobas C.R., Perard L., De Bats F., Salord H., Manificat H.J., Denis P., Burillon C. Detection of *Treponema pallidum* in aqueous humor by real-time polymerase chain reaction // *Ocul. Immunol. Inflamm.* 2011. V.19. P.127-128.
 25. Cummings M.C., Lukehart S.A., Marra C., Smith B.L., Shaffer J., Demeo L.R., Castro C., McCormack W.M. Comparison of methods for the detection of *treponema pallidum* in lesions of early syphilis // *Sex. Transm. Dis.* 1996. V.23. P.366-369.
 26. Florindo C., Reigado V., Gomes J.P., Azevedo J., Santo I., Borrego M.J. Molecular typing of *treponema pallidum* clinical strains from Lisbon, Portugal // *J. Clin. Microbiol.* 2008. V.46. P.3802-3803.
 27. Fraser C.M., Norris S.J., Weinstock G.M. et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete // *Science.* 1998. V.281. P.375-388.
 28. Gayet-Ageron A., Ninet B., Toutous-Trellu L. et al. Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse biological samples. // *Sex. Transm. Infect.* – 2009. – V. 85. – P. 264-269.
 29. Giacani L., Jeffrey B.M., Molini B.J. et al. Complete genome sequence and annotation of the *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* Chicago strain. // *J. Bacteriol.* – 2010. – V. 192. – P. 2645-2646.

30. Gray R.R., Mulligan C.J., Molini B.J., Sun E.S., Giacani L., Godornes C., Kitchen A., Lukehart S.A., Centurion-Lara A. Molecular evolution of the *tpc*, *D*, *I*, *K*, *G*, and *J* genes in the pathogenic genus *Treponema* // *Mol. Biol. Evol.* 2006. V.23. P.2220-2233.
31. Grimprel E., Sanchez P.J., Wendel G.D., Burstain J.M., McCracken G.H. Jr., Radolf J.D., Norgard M.V. 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. V.29. P.1711-1718.
32. Harper K.N., Liu H., Ocampo P.S., Steiner B.M., Martin A., Levert K., Wang D., Sutton M., Armelagos G.J. The sequence of the acidic repeat protein (*arp*) gene differentiates venereal from nonvenereal *Treponema pallidum* subspecies, and the gene has evolved under strong positive selection in the subspecies that causes syphilis // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2008. V.53. P.322-332.
33. Harper K.N., Ocampo P.S., Steiner B.M., George R.W., Silverman M.S., Bolotin S., Pillay A., Saunders N.J., Armelagos G.J. On the origin of the treponematoses: a phylogenetic approach // *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2008a. V.15. e148.
34. Hay P.E., Clarke J.R., Strugnell R.A., 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. V.15. P.233-238.
35. Heymans R., van der Helm J.J., de Vries H.J. et al. Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. – V. 48. – P. 497-502.
36. Jethwa H.S., Schmitz J.L., Dallabetta G., Behets F., Hoffman I., Hamilton H., Lule G., Cohen M., Folds J.D. Comparison of molecular and microscopic techniques for detection of *Treponema pallidum* in genital ulcers // *J. Clin. Microbiol.* 1995. V.33. P.180-183.
37. Koek A.G., Bruisten S.M., Dierdorp M., van Dam A.P., Templeton K. Specific and sensitive diagnosis of syphilis using a real-time PCR for *Treponema pallidum* // *Clin. Microbiol. Infect.* 2006. V.12. P.1233-1236.
38. Kouznetsov A.V., Prinz J.C. Molecular diagnosis of syphilis: the Schaudinn-Hoffmann lymph-node biopsy // *Lancet.* 2002. V.360. P.388-389.
39. 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. V.51. P.143-145.
40. Leslie D.E., Azzato F., Karapanagiotidis T., Leydon J., Fyfe J. Development of a real-time PCR assay to detect *Treponema pallidum* in clinical specimens and assessment of the assay's performance by comparison with serological testing // *J. Clin. Microbiol.* 2007. V.45. P.93-96. - Erratum in: *J. Clin. Microbiol.* 2008. V.46. P.1895.
41. Liu H., Rodes B., Chen C.Y., 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 // *J. Clin. Microbiol.* 2001. V.39. P.1941-1946.
42. Liu H., Rodes B., George R., Steiner B. Molecular characterization and analysis of a gene encoding the acidic repeat protein (*Arp*) of *Treponema pallidum* // *J. Med. Microbiol.* 2007. V.56. P.715-721.
43. Lukehart S.A., Godornes C., Molini B.J., Sonnett P., Hopkins S., Mulcahy F., Engelman J., Mitchell S.J., Rompalo A.M., Marra C.M., Klausner J.D. Macrolide resistance in *Treponema pallidum* in the United States and Ireland // *N. Engl. J. Med.* 2004. V.351. P.154-1548.
44. Marfin A.A., Liu H., Sutton M.Y., Steiner B., Pillay A., Markowitz L.E. Amplification of the DNA polymerase I gene of *Treponema pallidum* from whole blood of persons with syphilis // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2001. V.40. P.163-166.
45. Martin I.E., Gu W., Yang Y., Tsang R.S. Macrolide resistance and molecular types of *Treponema pallidum* causing primary syphilis in Shanghai, China // *Clin. Infect. Dis.* 2009. V.49. P.515-521.
46. Martin I.E., Tsang R.S., Sutherland K., Anderson B., Read R., Roy C., Yanow S., Fonseca K., White W., Kandola K., Kouadjo E., Singh A.E. Molecular typing of *Treponema pallidum* strains in western Canada: predominance of 14d subtypes // *Sex Transm. Dis.* 2010. V.37. P.544-548.
47. Matejkova P., Strouhal M., Smajs D. et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* strain SS14 determined with oligonucleotide arrays // *BMC Microbiol.* 2008. V.8. 76.
48. Mikalova L., Strouhal M., Cejkova D. Genome analysis of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* and subsp. *pertenue* strains: most of the genetic differences are localized in six regions // *PLoS One.* 2010. V.29. e15713.
49. Molepo J., Pillay A., Weber B., Morse S.A., Hoosen A.A. Molecular typing of *Treponema pallidum* strains from patients with neurosyphilis in Pretoria, South Africa // *Sex Transm. Infect.* 2007. V.83. P.189-192.
50. Muller M., Ewert I., Hansmann F., Tiemann C., Hagedorn H.J., Solbach W., Roeder J., Nolle B.,

- Laqua H., Hoerauf H. Detection of *Treponema pallidum* in the vitreous by PCR // *Br. J. Ophthalmol.* 2007. V.91. P.592-595.
51. Noordhoek G.T., Wieles B., van der Sluis J.J., van Embden J.D. Polymerase chain reaction and synthetic DNA probes: a means of distinguishing the causative agents of syphilis and yaws? // *Infect. Immun.* 1990. V.58. P.2011-2013.
 52. Noordhoek G.T., Wolters E.C., de Jonge M.E., van Embden J.D. Detection by polymerase chain reaction of *Treponema pallidum* DNA in cerebrospinal fluid from neurosyphilis patients before and after antibiotic treatment // *J. Clin. Microbiol.* 1991. V.29. P.1976-1984.
 53. 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. V.79. P.479-483.
 54. Pandori M.W., Gordones C., Castro L., Engelman J., Siedner M., Lukehart S., Klausner J. Detection of azithromycin resistance in *Treponema pallidum* by real-time PCR // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007. V.51. P.3425-3430.
 55. Pietravalle M., Pimpinelli F., Maini A., Capoluongo E., Felici C., D'Auria L., Di Carlo A., Ameglio F. Diagnostic relevance of polymerase chain reaction technology for *T. pallidum* in subjects with syphilis in different phases of infection // *New Microbiol.* 1999. V.22. P.99-104.
 56. Pillay A., Liu H., Ebrahim S., Chen C.Y., Lai W., Fehler G., Ballard R.C., Steiner B., Sturm A.W., Morse S.A. Molecular typing of *Treponema pallidum* in South Africa: cross-sectional studies // *J. Clin. Microbiol.* 2002. V.40. P.256-258.
 57. Pillay A., Liu H., Chen C.Y., Holloway B., Sturm A.W., Steiner B., Morse S.A. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* // *Sex. Transm. Dis.* 1998. V.25. P.408-414.
 58. Pope V., Fox K., Liu H., Marfin A.A., Leone P., Sena A.C., Chapin J., Fears M.B., Markowitz L. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* from North and South Carolina // *J. Clin. Microbiol.* 2005. V.43. P.3743-3746.
 59. Rajan M.S., Pantelidis P., Tong C.Y., French G.L., Graham E.M., Stanford M.R. Diagnosis of *Treponema pallidum* in vitreous samples using real time polymerase chain reaction // *Br. J. Ophthalmol.* 2006. V.90. P.647-648.
 60. Salazar J.C., Rathi A., Michael N.L., Radolf J.D., Jagodzinski L.L. Assessment of the kinetics of *Treponema pallidum* dissemination into blood and tissues in experimental syphilis by real-time quantitative PCR // *Infect. Immun.* 2007. V.75. P.2954-2958.
 61. Sanchez P.J., Wendel G.D. Jr., Grimpel E., Goldberg M., Hall M., Arencibia-Mireles O., Radolf J.D., Norgard M.V. Evaluation of molecular methodologies and rabbit infectivity testing for the diagnosis of congenital syphilis and neonatal central nervous system invasion by *Treponema pallidum* // *J. Infect. Dis.* 1993. V.167. P.148-157.
 62. Scott L.J., Gunson R.N., Carman W.F., Winter A.J. A new multiplex real-time PCR test for HSV1/2 and syphilis: an evaluation of its impact in the laboratory and clinical setting // *Sex Transm. Infect.* 2010. V.86. P.537-539.
 63. Seshadri R., Myers G.S., Tettelin H. et al. Comparison of the genome of the oral pathogen *Treponema denticola* with other spirochete genomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V.101. P.5646-5651
 64. Smajs D., Zbanikova M., Strouhal M. et al. Complete Genome Sequence of *Treponema paraluis-cuniculi*, Strain Cuniculi A: The Loss of Infectivity to Humans Is Associated with Genome Decay // *PLoS One.* 2011. V.6. e20415
 65. Stamm L.V., Bergen H.L. The sequence-variable, single-copy *tprK* gene of *Treponema pallidum* Nichols strain UNC and Street strain 14 encodes heterogeneous *TprK* proteins // *Infect. Immun.* 2000. V.68. P.6482-6486.
 66. Stamm L.V., Bergen H.L. A point mutation associated with bacterial macrolide resistance is present in both 23S rRNA genes of an erythromycin-resistant *Treponema pallidum* clinical isolate // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000. V.44. P.806-807.
 67. Suntoke T.R., Hardick A., Tobian A.A. et al. Evaluation of multiplex real-time PCR for detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, herpes simplex virus type 1 and 2 in the diagnosis of genital ulcer disease in the Rakai District, Uganda. // *Sex. Transm. Infect.* – 2009. – V. 85. – P. 97-101.
 68. Sutton M.Y., Liu H., Steiner B., Pillay A., Mickey T., Finelli L., Morse S., Markowitz L.E., St Louis M.E. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* in an Arizona County with increasing syphilis morbidity: use of specimens from ulcers and blood // *J. Infect. Dis.* 2001. V.183. P.1601-1606.
 69. Talha E., Juhasz E., Kanizsai S. et al. Molecular detection of *T. pallidum* by PCR in seronegative cases. // *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* – 2009. – V. 56. – P. 181-189.
 70. Wicher K., Abbruscato F., Wicher V., Collins D.N., Auger I., Horowitz H.W. Identification of persistent infection in experimental syphilis by PCR // *Infect. Immun.* 1998. V.66. P.2509-2513.

71. Wicher K., Noordhoek G.T., Abbruscato F., Wicher V. Detection of *Treponema pallidum* in early syphilis by DNA amplification // *J. Clin. Microbiol.* 1992. V.30. P.497-500.
72. Wenhai L., Jianzhong Z., Cao Y. Detection of *Treponema pallidum* in skin lesions of secondary syphilis and characterization of the inflammatory infiltrate // *Dermatology.* 2004. V.208. P.94-97.
73. Woznicova V., Smajs D., Wechsler D., Matejkova 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 // *J. Clin. Microbiol.* 2007. V.45. P.659-661.
74. Zimmer C. Infectious diseases. Isolated tribe gives clues to the origins of syphilis // *Science.* 2008. V.319. P.272.
75. Zochling N., Schluepen E.M., Soyer H.P., Kerl H., Volkenandt M. Molecular detection of *Treponema pallidum* in secondary and tertiary syphilis // *Br. J. Dermatol.* 1997. V.136. P.683-686.

Поступила в редакцию 24 мая 2011 г.

GENOMES OF *TREPONEMA PALLIDUM* AND PCR DIAGNOSTICS OF SYPHILIS

Zhukova I.Yu.¹, Magazova R.A.¹, Chemeris D.A.², Mavzyutov A.R.³

¹Republic Dermatovenerologic Clinic, Ufa, ²Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre of Russian Academy of Sciences, Ufa, Уфа, ³Bashkirian Medicine Government University, Ufa, ufalab@mail.ru

Resume

Peculiarities of genome organization for representatives of genus *Treponema* including repeated regions suitable for strain genotyping are considered. Arguments in favor of recent (516 – 518 years ago) origin of venereal syphilis are adduced. On the basis of nucleotide sequence of 16S and 23S rRNA genes created phylogenetic trees of several treponemal species together with subspecies of *Treponema pallidum*. Examples of elucidation of pale treponemas via detection some genes with the aid of end-point PCR and real-time PCR.

Keywords: genome, genomics, syphilis, PCR, real-time PCR, genotyping, *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, *T.pallidum* subsp. *pertenue*, 16S rRNA and 23S rRNA genes