

**Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Dr. med. Dr. h.c. Thomas Ruzicka

**Molekularer Nachweis von *Treponema pallidum*
mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und
Hybridisierung in verschiedenen Proben von
Patienten mit Syphilis**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

**vorgelegt von
Alexander Vasilevich Kuznetsov
aus Moskau,
Russische Föderation**

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jörg Christoph Prinz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Heesemann
Priv.-Doz. Dr. Peter Jon Nelson

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Paul Trommler

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 24.05.2007

From the Department of Dermatology and Allergology

Ludwig-Maximilians University, Munich

Director: Professor Thomas Ruzicka MD, DSc (Hons)

Molecular detection of *Treponema pallidum*
by polymerase chain reaction (PCR) and hybridization in
various samples of patients with syphilis

Dissertation

for achieve of the title Doctor of Medicine
at the Medical Faculty
of the Ludwig-Maximilians University, Munich

Presented by

Alexander Vasilevich Kuznetsov

from Moscow

Russian Federation

2007

With authorisation from the Medical Faculty
Ludwig-Maximilians University, Munich

Reporter: Professor Jörg Christoph Prinz MD

Co-reporter: Professor Jürgen Heesemann MD, PhD
Assistant Professor Peter Jon Nelson PhD

Supervisor: Dr Paul Trommler PhD

Dean: Professor Dietrich Reinhard MD

Day of viva voice: 24.05.2007

Meiner Frau Laura und meinen Eltern, Tatyana und Vasily Kuznetsov gewidmet

To my wife Laura, and my parents Tatyana and Vasily Kuznetsov with love

PUBLIKATIONEN AUS DER DOKTORARBEIT/ PUBLICATIONS FROM THE DOCTORAL THESIS

Publikationen

Publications

1. **Kouznetsov AV**, Prinz JC (2002) Molecular diagnosis of syphilis: the Schaudinn-Hoffmann lymph-node biopsy. *Lancet*, 360: 388-389.
2. **Kouznetsov AV**, Prinz JC (2003) Papulopustulöse Syphilid bei einem HIV-infiziertem Patient im Stadium B2 (CDC). In: Plewig G, Prinz JC (Hrsg) Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie, Bd. 18. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, S. 663-666.
3. **Kouznetsov AV**, Prinz JC (2003) Syphilis: nouveau test diagnostique. *Rev Franc Labor*, 349: 16.
4. **Kouznetsov AV**, Weisenseel P, Trommler P, Multhaupt S, Prinz JC. (2005) Detection of 47-kDa immunogene gene of *Treponema pallidum* in various tissue sources. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 51; 143-145.
5. **Kouznetsov AV**, Burgdorf WHC, Prinz JC. (2005) Latent syphilis confirmed by polymerase chain reaction in two HIV-infected patients with inconclusive serological testing. *Arch Dermatol*, 141; 1169-1170.

Kongressbeiträge

Congress presentations

1. **Kouznetsov AV**, Trommler P, Prinz JC (2001) Detection of *Treponema pallidum* DNA by PCR. 10th Congress of European Academy of Dermatology and Venereology (EADV): October 10-14th, 2001, Munich, Germany; Poster/ Abstract in *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 15: 258
2. **Kouznetsov AV**, Trommler P, Prinz JC (2002) Tissue sources for molecular diagnosis of *Treponema pallidum* infection. 29th Annual Meeting of German Society of Dermatological Research (ADF). 28.02.-02.03.2002, Berlin, Germany; Poster/ Abstract in *Arch Dermatol Res*, 294: 66 [P129]
3. **Kouznetsov AV**, Prinz JC (2003). Nachweis *Treponema pallidum* mittels PCR. 49. Tagung der Deutschen STD-Gesellschaft (DSTDG), Juli 2003, München, Deutschland (Oral presentation)
4. **Kouznetsov AV**, Prinz JC (2004) Molecular diagnosis of *Treponema pallidum* infection: from research to clinic. 13th Congress of European Academy of Dermatology and Venereology (EADV), November 2004, Florence, Italy; Oral presentation/ Abstract in *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 18: 183 [FC12.13]

INHALTSVERZEICHNIS**CONTENTS**

ZUSAMMENFASSUNG	5
<i>SUMMARY</i>	7
ABKÜRZUNGEN/ ABBRAVIATIONS	9
I. EINLEITUNG/ INTRODUCTION	13
1.1 Kurze Geschichte der Syphilologie/ Short history of syphilology	13
1.2 Epidemiologie der Syphilis/ Epidemiology of syphilis	15
1.3 Ätiopathogenese, Immunologie und Klinik der Syphilis/ <i>Aetiology, pathogenesis, immunology & clinics of syphilis</i>	17
1.3.1 Morphologie von <i>T. pallidum</i>/ Morphology of <i>T. pallidum</i>	17
1.3.2 Genom von <i>T. pallidum</i>/ Genome of <i>T. pallidum</i>	18
1.3.3 Pathogenese und Immunologie der Syphilis/ <i>Pathogenesis & immunology of syphilis</i>	19
1.3.4 Humorale Immunität: diagnostische Bedeutung/ <i>Humoral immunity: diagnostical impact</i>	22
1.3.5 Klinik der Syphilis (natürlicher Verlauf)/ Clinics of syphilis (natural course)	25
1.3.5.1 Primäre Syphilis (Lues I)/ Primary syphilis	26
1.3.5.2 Sekundäre Syphilis (Lues II)/ Secondary syphilis	26
1.3.5.3 Latente Syphilis (Lues latens)/ Latent syphilis	26
1.3.5.4 Tertiäre Syphilis (Lues III)/ Tertiary syphilis	27
1.3.5.5 Neurosyphilis/ Neurosyphilis	27
1.3.5.6 Kongenitale Syphilis/ Congenital syphilis	27
1.3.5.7 Syphilis und HIV-Infektion/ Syphilis & HIV infection	28
1.4 Diagnostik der Syphilis/ Diagnosis of syphilis	29
1.4.1 Mikroskopische Diagnostik/ Microscopical diagnosis	30
1.4.1.1 Dunkelfeldmikroskopie/ Dark-field microscopy	30
1.4.1.2 Histologie/ Histology	30
1.4.1.3 Direkter Fluoreszenzantikörper-Test/ <i>Direct Fluorescence Antibody test (DFA)</i>	31
1.4.2 Serologische Diagnostik/ Serological diagnosis	31
1.4.2.1 Nichttreponemale Test/ Nontreponemal tests	31
1.4.2.2 Treponemal Tests/ Treponemal tests	32
1.4.2.3 Serologische Diagnostik der Neurosyphilis/ <i>Serological diagnosis of neurosyphilis</i>	35
1.4.2.4 Serologische Diagnostik der Syphilis bei HIV-Koinfektion/ <i>Serological diagnosis of syphilis at HIV co-infection</i>	35

1.4.3 PCR-Diagnostik/ <i>Diagnosis by PCR</i>	36
1.4.3.1 PCR-Methode/ <i>PCR methodology</i>	36
1.4.3.2 PCR-Diagnostik der Syphilis/ <i>PCR diagnosis of syphilis</i>	38
1.5 Problemstellung/ <i>Aim of the study</i>	43
II. MATERIAL UND METHODEN/ MATERIALS & METHODS	45
2.1 Material/ <i>Materials</i>	45
2.1.1 Geräte/ <i>Technical devices</i>	45
2.1.2 Arbeitsmaterial/ <i>Working materials</i>	45
2.1.3 Chemikalien und Enzyme/ <i>Chemicals & enzymes</i>	46
2.1.4 Lösungen/ <i>Solutions</i>	47
2.1.5 Nukleotide/ <i>Nucleotides</i>	48
2.2 Patientenkollektiv und –proben/ <i>Patients & samples</i>	49
2.2.1 Patienten/ <i>Patients</i>	49
2.2.2 Proben/ <i>Samples</i>	49
2.3 Methoden/ <i>Methods</i>	51
2.3.1 Materialgewinnung/ <i>Collection of samples</i>	51
2.3.1.1 Blut/ <i>Blood</i>	51
2.3.1.2 Liquor/ <i>Cerebrospinal fluid</i>	54
2.3.1.3 Rachenabstrich/ <i>Swab from the throat</i>	54
2.3.1.4 Schanker-Abstrich/ <i>Swab from the chancre</i>	54
2.3.1.5 Lymphknoten-Punktion/ <i>Lymph-nodes aspiration biopsy</i>	54
2.3.1.6 Ejakulat/ <i>Ejaculate</i>	55
2.3.1.7 Hautbiopsien/ <i>Skin biopsies</i>	55
2.3.2 Serologische Untersuchungen/ <i>Serological assays</i>	56
2.3.2.1 Treponema pallidum-Hämagglutinationstest (TPHA-Test)/ TPHA.....	56
2.3.2.2 Venereal-Disease-Research-Laboratory-Test (VDRL)/ VDRL.....	56
2.3.2.3 Fluoreszenz-Treponema-Antikörperabsorbtionstest/ FTA-ABS.....	56
2.3.3 DNS-Isolierung/ <i>DNA isolation</i>	57
2.3.4 PCR/ <i>PCR</i>	58
2.3.4.1 tpp47-PCR/ <i>tpp47 PCR</i>	59
2.3.4.2 Konzentrierung des 379 bp-Amplikons nach 1. tpp47-PCR/ Concentration of the 378 bp amplicon after 1st tpp47 PCR.....	62
2.3.4.3 1x und 3x (379 bp-Amplikon)-PCR/ 1x and 3x (379 bp amplicon) PCR.....	62

2.3.4.4 β-Actin-PCR / <i>β-Actin</i> PCR	63
2.3.4.5 Gel-Elektrophorese/ <i>Gel electrophoresis</i>	64
2.3.4.6 Southern-Blot, DNS-Hybridisierung, Autoradiographie/ <i>Southern blotting, DNA hybridization, autoradiography</i>	64
III. ERGEBNISSE/ RESULTS	67
3.1 Klinische und serologische Untersuchungen/ <i>Clinical & serological investigations</i>	67
3.1.1 Patienten mit Verdacht auf Syphilis (Gruppe A)/ <i>Patients suspected of syphilis (group A)</i>	67
3.1.1.1 Anamnese und klinische Symptome/ <i>Disease history & clinical signs</i>	67
3.1.1.2 Syphilis-Serologie/ <i>Syphilis serology</i>	67
3.1.2 Patienten nach Behandlung einer Syphilis (Gruppe B)/ <i>Patients after syphilis treatment (group B)</i>	69
3.1.3 Patienten nach Behandlung einer Neurosyphilis (Gruppe C)/ <i>Patients after treatment of neurosyphilis (group C)</i>	69
3.2 Molekularbiologische Untersuchungen/ <i>Molecular biologic investigations</i>	75
3.2.1 PCR-Sensitivität nach <i>T. pallidum</i>-Verdünnungsreihe/ <i>PCR sensitivity based on limiting dilution of <i>T. pallidum</i></i>	75
3.2.2 <i>T. pallidum</i>-PCR, β-Actin-PCR, DNS-Hybridisierung im Patientenkollektiv/ <i>T. pallidum PCR, β-Actin PCR, DNA hybridization in patients</i>	76
3.2.2.1 Patienten mit Syphilis (Gruppe A)/ <i>Patients with syphilis (group A)</i> ... 76	
3.2.2.2 Patienten mit behandelter Syphilis und Neurosyphilis (Gruppen C und D)/ <i>Patients with treated syphilis & neurosyphilis (groups C & D)</i>	79
3.2.3 Diagnostische Sensitivität der Gel-Elektrophorese vs. DNS-Hybridisierung/ <i>Diagnostic sensitivity of gel electrophoresis vs. DNA hybridization</i>	81
3.2.4 Diagnostische Sensitivität der 1x vs. 3x (379 bp-Amlikon)-PCR/ <i>Diagnostic sensitivity 1x vs. 3x (379 bp Amplicon) PCR</i>	82
3.2.5 Diagnostische Sensitivität der <i>T. pallidum</i>-PCR vs. Serologie/ <i>Diagnostic sensitivity of <i>T. pallidum</i> PCR vs. Serology</i>	83
3.2.6 PCR-Diagnostik der Syphilis bei einigen ausgewählten Patienten/ <i>PCR diagnosis of syphilis in some selected patients</i>	85
3.2.6.1 Nachweis der <i>T. pallidum</i>-DNS im Schanker/ <i>Detection of <i>T. pallidum</i> DNA in chancre</i>	85
3.2.6.2 Nachweis der <i>T. pallidum</i>-DNS im makulösen Syphilid/ <i>Detection of <i>T. pallidum</i> DNA in macular syphilid</i>	86
3.2.6.3 Latente oder sekundäre Syphilis bei HIV-Koinfektion? Diagnose mittels PCR/ <i>Latent or secondary syphilis in HIV co-infection? Diagnosis made by PCR</i>	87

**3.2.6.4 Lymphadenopathie bei latenter Syphilis:
Nachweis von *T. pallidum*-DNS/**

<i>Lymphadenopathy in latent syphilis: detection of T. pallidum DNA.....</i>	89
IV. DISKUSSION/ DISCUSSION.....	91
LITERATURVERZEICHNIS/ LITERATURE.....	107
DANKSAGUNG.....	117
<i>ACKNOWLEDGMENT.....</i>	119
PUBLIKATIONEN AUS DER DOKTORARBEIT/ PUBLICATIONS FROM THE DOCTORAL THESIS.....	120
LEBENS LAUF.....	121
<i>CURRICULUM VITAE</i>	122

ZUSAMMENFASSUNG

Syphilis ist eine der ältesten bekannten Geschlechtskrankheiten der Welt. Nach der Entdeckung des Erregers, *Treponema pallidum* (1905), und dem Einsatz des Antibiotikums Penicillin in der Syphilis-Therapie (1943) schienen Diagnostik und Bekämpfung der Syphilis nur noch eine Routineaufgabe. Die vergangenen Jahrzehnte haben gezeigt, dass die Syphilis eine sich immer noch verbreitende, oft epidemisch verlaufende Infektionskrankheit ist. Ungeachtet der immunologischen und serologisch-diagnostischen Fortschritte in der Syphilis-Diagnostik ist diese Infektionskrankheit besonders in ihrer latenten Form manchmal schwer zu diagnostizieren. Besonders im Falle einer Koinfektion mit human immunodeficiency virus (HIV) oder bei systemischen Autoimmunerkrankungen kann die etablierte Routinediagnostik der Syphilis fehlschlagen.

Die traditionelle mikrobiologische kulturelle Diagnostik lässt den Erreger auf Grund seiner sehr empfindlichen Struktur nicht wachsen. Dank der Entdeckung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, 1985) ist es möglich geworden, den Krankheitserreger anhand seiner spezifischen DNS-Struktur sicher zu identifizieren. Seit 1990 wurde die PCR für die Diagnostik der Syphilis bei Genital-Ulzera, bei angeborener Syphilis und Neurosyphilis eingesetzt. Für den klinischen Alltag war die PCR-Diagnostik der Syphilis bis jetzt nicht verfügbar.

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung und Überprüfung der PCR für die Molekulardiagnostik der Syphilis unter Verwendung von Patientenproben. Ein sensitives und spezifisches nested (verschachteltes)-PCR-Verfahren wurde für den Nachweis des *47 kDa treponema pallidum protein (tpp47)*-Gen eingesetzt. Für dieses Gen ist bis jetzt keine Polymorphismus bekannt. Spezifische DNS-Hybridisierung nach Southern-Blot des Amplikons mit einer internen DNS-Sonde sollte die PCR-Spezifität zusätzlich kontrollieren.

Die *tpp47*-PCR wurde mit verschiedenen Patientenproben getestet, unter anderem zum ersten Mal mit aufgereinigten peripheren Blut-mononukleären Zellen (PBMC), Granulozyten, Lymphknoten-Punktat und Ejakulat. Es stellte sich heraus, dass die Untersuchung der PBMC-Fraktion, gewonnen durch Ficollierung und anschließend Hochgeschwindigkeitszentrifugation die höchste diagnostische PCR-Sensitivität von 85,7 % auch bei latenter Infektion aufweist, während andere Studien, basierend auf Serum- und Vollblut-PCR, nur eine Sensitivität von 61 - 66 % hatten.

Die Lymphknoten-Punktion nach Schaudinn und Hoffmann (1905) in Kombination mit einer PCR erlaubte den Nachweis von *T. pallidum*-DNS auch bei Patienten ohne klinische Zeichen einer Syphilis (sog. latente Syphilis), was in der Differenzialdiagnostik bei einer Polylymphadenopathie im Rahmen der HIV-Infektion sehr wichtig ist.

Zum ersten Mal wurde mittels molekularbiologischer Methoden festgestellt, dass Ejakulat bei Syphilis infektiös ist, da es Treponemen enthält.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Hautbiopsate syphilitischer Läsionen nach der Gewinnung nicht in Paraffin eingebettet, sondern schockgefrohren sein sollten, um dann die *T. pallidum*-DNS mit höherer Sensitivität nachweisen zu können.

Es wurde auch gezeigt, dass bei Angina syphilitica, welche bei sekundärer Syphilis auftritt, keine Treponemen an der Oberfläche der Rachenschleimhaut nachweisbar sind.

Bei Patienten ohne Symptome einer Syphilis und mit unklarem serologischem Befund, unter anderem wegen einer HIV-Koinfektion, wurde mittels PCR-Analyse der PBMC eine latente Syphilis diagnostiziert und so eine adäquate antisiphilitische Therapie ermöglicht.

In der hier vorgelegten Doktorarbeit wurde gezeigt, dass die PCR-Diagnostik ein sensitives und klinisch wichtiges Verfahren in der Diagnostik der Syphilisinfektion darstellt. Der PCR-Einsatz kann in der Syphilis-Diagnostik besonders dann wichtig sein, wenn die Syphilis-Serologie nicht aussagekräftig ist und serologisch keine Diagnosestellung möglich ist.

SUMMARY

Syphilis is one of the longest recognized sexually transmitted diseases of the world. After the discovery of *Treponema pallidum* (1905), the causative agent of syphilis, and the effective use of the antibiotic penicillin to treat the disease (1943), the diagnosis and elimination of syphilis appeared to be easy. The intervening years have shown that the syphilis remains a widespread infectious disease, which may occur in epidemics. Despite progress in the immunologic and serologic diagnosis, syphilis can still be difficult to diagnose of, especially in its latent stage. Routine diagnosis of syphilis may also in patients with co-infection by human immunodeficiency virus (HIV) or with concomitant autoimmune disorders.

Because of its sensitive biological structure, *T. pallidum* cannot be cultured. Once the polymerase chain reaction (PCR) became available (1985), it became possible to identify *T. pallidum* with certainty on the basis of its specific DNA. Since 1990 PCR was used for diagnosis of syphilis in patients with genital ulcers, in congenital syphilis, and neurosyphilis. The PCR diagnosis of syphilis is not yet available for routine use.

The goal in this work was to establish and evaluate PCR for the molecular diagnosis of syphilis on patient samples. The sensitive and specific nested PCR method was used for detection of the 47 kDa *treponema pallidum* protein (*tpp47*) gene. No gene polymorphisms were identified for *tpp47* gene. After Southern blotting of the amplicon, an internal DNA probe should be used as an additional control.

The *tpp47* PCR was tested in various samples from patients. For the first time, PCR was used for samples of isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC), granulocytes, lymph nodes aspiration biopsy, and ejaculates. The PCR investigation of PBMC blood fraction had a highest sensitivity of 87.5 %, even in latent infection, if the PBMC was isolated by Ficoll following by high speed centrifugation. The previously published studies of PCR with serum and whole blood samples had a sensitivity of 61 – 66 %.

The lymph nodes biopsy after Schaudinn and Hoffmann (1905) combined with PCR allowed the detection of *T. pallidum* DNA in patients without clinical symptoms of syphilis (latent stage). This approach is very important for the differential diagnosis of widespread lymphadenopathy which may also be caused by HIV infection.

This work also showed for the first time by molecular biological methods that the ejaculate in syphilis is infectious, being positive for *T. pallidum*. In addition, this work showed that skin biopsy specimens from syphilitic lesions should not be embedded into paraffin before the DNA is extracted, but instead should be shock frozen for more sensitive detection of *T. pallidum* DNA. In addition, swab PCR was used to demonstrate that the pharyngeal mucosa in angina syphilitica of secondary syphilis does not contain *T. pallidum*. In patients without signs of syphilis and with unclear serological test results, sometimes

because of HIV co-infection, latent syphilis was diagnosed by PCR analysis of PBMC, allowing institution of therapy rather than waiting for traditional tests to become positive again. This doctor thesis shows that syphilis diagnosis based on PCR is a sensitive and clinically important method, which can be especially important, if the syphilis serology is inconclusive.

ABKÜRZUNGEN*ABBREVIATIONS*

AF	amniotische Flüssigkeit
APC	antigenpräsentierende Zellen (antigen presenting cells)
<i>arp</i>	<i>acidic repeat protein</i> -Gen
<i>bmp</i>	<i>basic membrane protein</i> -Gen
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
CDC	Center for Diseases Control and Prevention, Atlanta, USA
cDNS	komplementäre DNS
DFA	Direkter Fluoreszenzantikörper-Test (direct fluorescence antibody)
DFA-TP	Direkter Fluoreszenzantikörper-Treponema pallidum-Test (direct fluorescence antibody Treponema pallidum)
DFAT-TP	Direkter Fluoreszenzantikörper Tissue-Treponema pallidum-Test (direct fluorescence antibody tissue Treponema pallidum)
DFM	Dunkelfeldmikroskopie
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FTA-ABS-Test	Fluoreszenz-Treponema-Antikörperabsorptionstest (fluorescent treponemal antibody absorption test)
HIV	human immunodeficiency virus
HPLC	hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
HSC	Hochgeschwindigkeitszentrifugation [15000 g] (high speed centrifugation)
HSC-P	Pellet der PBMC-Fraktion nach der Zentrifugation mit Hochgeschwindigkeit (high speed centrifugation pellet)
HSC-S	Überstand der PBMC-Fraktion nach der Zentrifugation mit Hochgeschwindigkeit (high speed centrifugation supernatant)
HSV	Herpes Simplex-Virus
IL	Interleukin
kbp	Kilo-Basenpaare
LSC	Zentrifugation mit Niedriggeschwindigkeit [500 g] (low speed centrifugation)
LSC-P	Pellet der PBMC-Fraktion nach der Zentrifugation mit Niedriggeschwindigkeit (low speed centrifugation pellet)

Abkürzungen, Fortsetzung:

LSC-S	Überstand der PBMC-Fraktion nach der Zentrifugation mit Niedriggeschwindigkeit (low speed centrifugation supernatant)
MHA-TP	Mikrohämagglutinationstest-Treponema pallidum (microhaemagglutination assay-Treponema pallidum)
M _r	Molekulargewicht
M-PCR	Multiplex-PCR
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
<i>polA</i>	<i>polymerase A</i> -Gen
RIT	Rabbit Infectivity Test
RNA	RNS, Ribonukleinsäure
RNS	Ribonukleinsäure
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
RPR	Rapid-Plasma-Reagin-Test
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPHA	Solid Phase Haemadsorption-Test (solid phase haemadsorption assay)
SSC	Sodiumchlorid/ Sodiumcitrat
STI	sexually transmitted infections
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Lösung
Th1	T-Helferzellen 1
Th2	T-Helferzellen 2
T _m	Schmelztemperatur
<i>tmpA</i>	<i>treponema pallidum membrane protein A</i> -Gen
<i>tpf1</i>	<i>treponema pallidum f1</i> -Gen
<i>tpp47</i>	<i>47-kDa treponema pallidum protein</i> -Gen
<i>tpr</i>	<i>treponema pallidum repeat</i> -Gen
T _{ss}	Strangseparationstemperatur
TPHA	Treponema pallidum-Hämagglutinationstest (Treponema pallidum haemagglutination assay)
TPI	Treponema pallidum-Immobilisationstest (Treponema pallidum immobilisation assay)
TPPA	Treponema pallidum-Partikelagglutinationstest (Treponema pallidum particle agglutination assay)

Abkürzungen, Fortsetzung:

VDRL	Venereal-Diseases-Research-Laboratory-Test
ZNS	zentrales Nervensystem
U	Unit

I. EINLEITUNG

INTRODUCTION

*"Syphilis simulates every other disease. It is the only disease necessary to know.
One then becomes an expert dermatologist ... and an expert diagnostician".*

Sir Dr. William Osler, 1903-1905

Das Jahr 2005 ist das 100. Jubiläumsjahr der Entdeckung von *Treponema pallidum*, des Syphilis-Erregers. Syphilis war vor dieser Entdeckung und bis 35 Jahre danach eine unheilbare, epidemische, invalidisierende oder tödliche Erkrankung.

In dieser Arbeit wurde versucht, zwei der denkwürdigsten Ereignisse der Medizin und Naturwissenschaft des XX. Jahrhunderts - die Erregerentdeckung durch Friedrich Richard Schaudinn und Erich Hoffmann, 1905, und die Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch Kary Banks Mullis, 1985 (Nobelpreis für Chemie 1993) in den klinisch-diagnostischen Bereich umzusetzen, um die Syphilis-Diagnostik weiter zu entwickeln.

1.1 Kurze Geschichte der Syphilologie

Short history of syphilology

Die Syphilis ist eine weltweit verbreitete, durch *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* (Klassifikation 1984 [162]) ausgelöste chronische Infektionskrankheit, die überwiegend sexuell übertragen wird, und ohne Behandlung zu multiplen und schweren Organ-Beteiligungen führen und tödlich enden kann.

Die erste überlieferte medizinische Beschreibung der Syphilis stammt vom deutschen Arzt Joseph Grünpeck (1496) [51, 42]. Der Terminus „Syphilis“ kommt von Syphilus, dem Namen der an dieser Krankheit leitenden Hauptperson des mittelalterlichen Gedichtes *“Syphilis, sive de morbo gallico”* (1530) des italienischen Arztes, Philosophen, Astronomen, Mathematikers und Dichters Girolamo Fracastoro. G. Fracastoro kreierte diesen Namen vermutlich in Anlehnung an den mythischen Hirten Sypilus [150]. Der andere Begriff für Syphilis ist „Lues“ von lateinischen Plaque oder Seuche und wurde von dem französischen Arzt und Poet Jean François Fernel 1546 erstmalig erwähnt [111] und nach seinem Tod im Jahr 1579 veröffentlicht [42, 40].

Der Syphilis-Erreger entwickelte sich vermutlich aus den Frambösie-Erregern (*Treponema pallidum* subsp. *pertenue*) zwischen 15000 und 3000 v. C. [146]. Über den geographischen Ursprung der Krankheit existieren zwei Theorien: die „Neue Welt“ (Columbische)-Theorie

und die „Alte Welt“ (Pre-Columbische)-Theorie. Nach der ersten Theorie kam die Krankheit aus Amerika nach Europa durch Matrosen der Kolumbus-Flotte. Gemäß der Alten-Welt-Theorie existierte die Syphilis schon vor der Entdeckung Amerikas in Europa und Asien [135, 145].

In der Geschichte der Syphilologie waren folgende Meilensteine von Bedeutung:

- I. Der französische Dermatologe Phillipe Ricord (Paris) beweist 1837 die Existenz zweier unterschiedlicher Krankheiten – Syphilis und Gonorrhö [140, 72], die zuvor als eine Krankheit galten. Er klassifizierte 1858 die Syphilis als dreiphasige Erkrankung - Syphilis primaria, secundaria und tertiaria [139, 72].
- II. Die deutschen Wissenschaftler, der Zoologe Friedrich Richard Schaudinn und der Dermatologe Erich Hoffmann (Berlin) entdeckten, beschrieben und klassifizierten 1905 den Syphilis-Erreger - *Spirochaeta pallida* - in einem nach Giemsa gefärbten Abstrich-Präparat von nässendem syphilitischen Papeln, und eröffneten damit das erste diagnostische Verfahren der Krankheit mittels Mikroskop [152].
- III. Der deutsche Mediziner und Bakteriologe August Paul von Wassermann und die Dermatologen Albert Ludwig Sigismund Neisser und Carl Bruck (Berlin) entdeckten 1906 die Reaktivität des Serums von infizierten syphilitischen Patienten mit dem Lipidextrakt aus kongenital-syphilitisch veränderten Lebergewebe (später aus Rinderherz), dem sog. Kardiolipin. Sie etablierten auf Basis der Komplementbindungsreaktion von Jules Jean Baptiste Vincent Bordet und Octave Gengou (1901) die erste serologische Nachweismethode, die sog. Wassermann-Reaktion [180].
- IV. Der US-amerikanische Arzt John Friend Mahoney und Kollegen (New York) behandelten 1943 erfolgreich die Syphilis mit dem erstem Antibiotikum - Penizillin [95], welches bis heute das Antibiotikum der ersten Wahl ist.

Der Syphilis-Erreger, *T. pallidum* Stamm Nichols, bekam seine Stammbezeichnung von den Forschern H. A. Nichols und W. H. Hough, die 1913 den Erreger aus dem Liquor von Patienten mit Neurosyphilis isolierten [115].

1.2 Epidemiologie der Syphilis

Epidemiology of syphilis

Der mit Abstand wichtigste epidemiologische Übertragungsweg bei der Syphilis ist der sexuelle Kontakt. In absteigender Häufigkeit wird die Syphilis diaplazentar oder in nicht-sexuellem direkten Kontakt übertragen [119].

Nach der Einführung des Penizillins in die Therapie der Syphilis sind die Morbilität und Mortalität rasant gesunken [150]. Trotzdem ist Syphilis auch heute noch weltweit verbreitet und zeigt in allen Populationen einen wellenförmigen durchschnittlich 10jährigen zyklischen Inzidenzanstieg, welcher von medizinischen, sozialen und persönlichen Faktoren der jeweiligen Gesellschaft abhängig ist. Diagnostische und therapeutische Ausstattung, Gesundheitspolitik, Präventionsmaßnahmen gegen Geschlechtskrankheiten und Drogengebrauch, als auch das Sexualverhalten spielen dabei eine wichtige Rolle. Die Inzidenz fördernde epidemiologische Aspekte sind: Homosexualität, Prostitution, Promiskuität, intravenöser Drogenkonsum, Benutzung von nicht oder schwach treponemaziden Antibiotika für die Selbstprävention der Geschlechtskrankheiten, niedriges Sozial- und Ausbildungsniveau [188].

Mit In-Kraft-Treten des Infektionsschutzgesetzes im Jahr 2001 wurde in Deutschland ein deutlicher Anstieg der gemeldeten Syphilisinfectionen beobachtet (Gesamtzahl in 2001-2004: 10.387 Fälle) [156]. Für das Jahr 2004 liegen in Deutschland bei 72 % der Meldungen aussagefähige Angaben zur klinischen Symptomatik bzw. zum Infektionsstadium vor. Dabei handelt es sich in 27 % der Diagnosen um ein Primärstadium, in 44 % um ein Sekundärstadium und in 24 % um eine Infektion im Stadium der Früh- oder Spätlatenz. Erkrankungen im Tertiärstadium machen weniger als 5 % der Meldungen aus [156]. Im Jahr 2004 wurden mehr als drei Viertel der in Deutschland gemeldeten Fälle der Syphilis über Geschlechtsverkehr zwischen Männern übertragen. Die Syphilis-Inzidenz ist in dieser Gruppe 25-50 Mal höher, als in der gesamten männlichen Bevölkerung [156].

Die Inzidenz der Neurosyphilis im Deutschland verläuft mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung parallel zu den in den letzten Jahren um etwa 20 % angestiegenen Neuinfektionen der Syphilis insgesamt [78, 213]. Daten aus früheren Jahrzehnten lassen sich dahingehend interpretieren, dass die Inzidenz der Neurosyphilis um den Faktor 0,07 niedriger liegt als die Inzidenz der Neuerkrankungen [156]. Man kann also die derzeitige Inzidenz syphilitischer Komplikationen des zentralen Nervensystems (ZNS) auf etwa 0,21/100000 schätzen.

Rund 15 % der Patienten mit Syphilis in Deutschland haben gleichzeitig eine HIV-Koinfektion, bis zu 80 % der HIV-Infizierten haben Syphilis-Antikörper. Ein regelmäßiges halbjährliches Screening (klinische Untersuchung, Syphilisserologie) auf weitere sexuell übertragene Erkrankungen sollte daher bei allen HIV-Infizierten durchgeführt werden [156].

1.3 Ätiopathogenese, Immunologie und Klinik der Syphilis

Aetiology, pathogenesis, immunology & clinic of syphilis

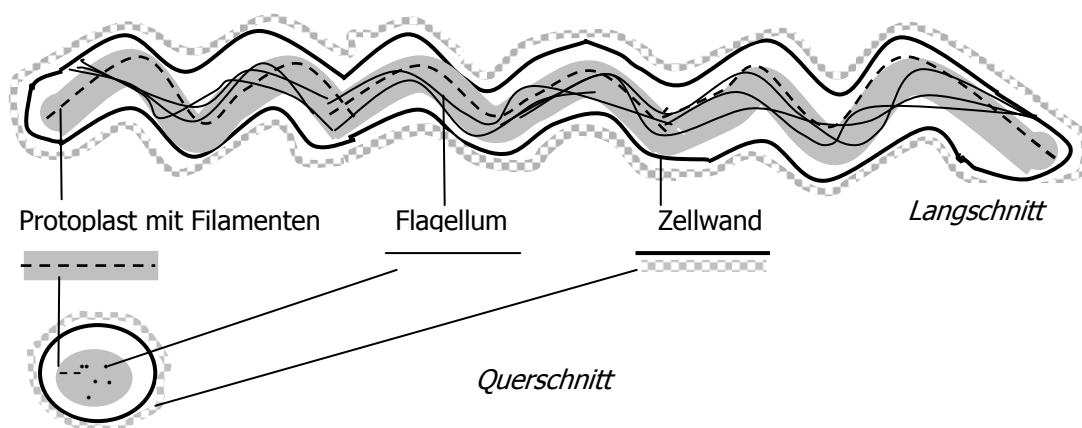
1.3.1 Morphologie von *T. pallidum*

Morphology of T. pallidum

Der Syphilis-Erreger, *Treponema pallidum* Subspezies *pallidum*, gehört zur Ordnung der *Spirochaetales*, der Familie *Spirochaetaceae*, dem Genus *Treponema*, und ist ein feines, korkenzieherartig gewundenes, fakultativ anaerobes Bakterium von 5-20 µm Länge, 0,1-0,18 µm Breite, mit 6-14 regulären Windungen mit 1 µm Abstand [119]. Der Syphilis-Erreger unterscheidet sich morphologisch nicht von den anderen pathogenen *Treponema*-Arten, wie *T. pallidum* subsp. *pertenue* (Erreger der Frambösie), *T. pallidum* subsp. *endemicum* (Erreger der Endemischen Syphilis, Bejel) und *T. carateum* (Erreger der Pinta). Alle drei Erreger werden auch nicht mittels immunologisch-serologischer Nachweismethoden differenziert [153, 92]. Die pathogenen Treponemen charakterisieren sich durch vier langsame Bewegungsarten: Vorwärts- und Rückwärtsbewegung, Rotation, Knickbewegung und Undulation (wellenartige Bewegung) [28]. Windungszahl und -abstand und die Mobilität sind morphologische Unterscheidungskriterien der pathogenen Treponemen von Saprophyten der Mund- (*T. denticola*, *T. vincentii*, *T. scolodontum*) und der Genitalflora (*T. phagedenis*, *T. refringers*, *T. minutum*).

Elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten drei wichtige Komponenten des Bakteriums (**Abbildung 1**) [121]:

Abbildung 1. Schematische Darstellung von *T. pallidum* (nach Norris et al, 1993 [121])



- den protoplasmatischen Zylinder (Protoplast) mit Genom, Organellen, umfassend mit zytoplasmatischen Filamenten (Endoflagellen),

- das axilläre periplasmatische Filament (Flagellum) aus 6 - 8 elastischen zusammengewundenen, den Protoplast umfassenden Fibrillen, die für die Form und Bewegung verantwortlich sind,
- die Zellwand aus heteropolymerischem Peptidoglykan, die den Protoplast schützt, die bakterielle Form unterstützt und die Transfusion der Makromoleküle erlaubt.

1.3.2 Genom von *T. pallidum*

Genome of T. pallidum

Das Genom der *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* (*T. pallidum*) wurde 1998 mittels Kompletengenom-Zufallsequenzierungsmethode (*whole genome random sequencing method*) entschlüsselt. Es stellt ein zirkuläres, aus 1138006 Basenpaaren (bp) mit 1041 kodierenden Genloci (sog. open reading frames, ORFs) bestehendes Chromosom dar [47]. Eine biologische Rolle wurde nach dem Klassifikationsschema von Riley (1993) für 577 ORFs (55 %) etabliert. 177 ORFs (17 %) besitzen Ähnlichkeit mit anderen Bakterien, 287 ORFs (28 %) haben keine bekannte Identität und sind möglicherweise eigenständige Gene [47, 161, 181]. Die DNS-Replikations-, -Transkriptions-, -Translations- und -Reparatur-Systeme des Mikroorganismus sind funktionsfähig, aber die biosynthetischen Kapazitäten für Enzyme, Fettsäuren und Nukleotide sind begrenzt. Das Gen für die DNS-Replikation ist klein und ähnelt dem Gen anderer obligaten Menschenpathogene, wie *Mycoplasma genitalis* und *Borrelia burgdorferi*. Sie bestimmen die biochemische Abhängigkeit des Erregers vom Wirt und beeinträchtigen wesentlich die kontinuierliche Kultivierung des Bakteriums im künstlichen Medium. *T. pallidum* besitzt auch Transportgene, die 5 % aller ORFs ausmachen und 18 verschiedene Transportproteine kodieren, vermutlich um Aminosäuren, Kohlenhydrate und Kationen in die Zelle zu bringen [47]. Der Mangel an Superoxiddismutase, Katalase und Peroxydase kodierenden Genen ruft eine hohe Sauerstoff-Empfindlichkeit hervor [136, 150], was das Überleben des Bakteriums nur bei niedrigen (1,5 % optimal) Sauerstoff-Konzentrationen ermöglicht [75].

67 Gene des *T. pallidum* -Genoms sind für die Pathogenität verantwortlich. Die 12 *tpr*-Gene (*tprA* - *L*) kodieren für die *major surface proteins* (Msp) und erfüllen vermutlich die Porin- und Adhäsion-Funktion, und bestimmen damit am meisten die *T. pallidum*-Virulenz [47, 181]. *T. pallidum* besitzt möglicherweise nicht nur endotoxische, sondern auch exotoxische Aktivitäten. Die fünf Gene, *tlyC*, *hlyA* - *C*, *hlyIII*, regulieren die Produktion von Lipopolysacchariden und Hämolytinen. Das *gcp*-Gen kodiert vermutlich eine neutrale

Metalloproteinase (Sialoglycoproteinase) gegen die *O*-Sialoglykoproteine der Wirtsgewebe und trägt zur Pathogenese bei [181].

1.3.3 Pathogenese und Immunologie der Syphilis

Pathogenesis & immunology of syphilis

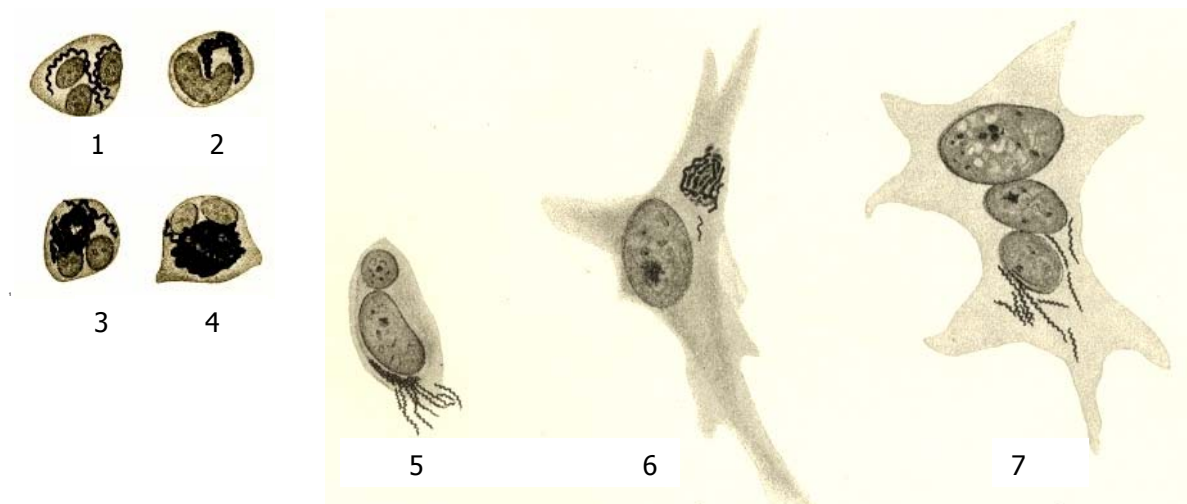
Die Erforschung der Ätiopathogenese der Syphilis begann noch vor Entdeckung des Erregers. So bewies Paul Haensell 1881 (Berlin) zum ersten Mal die Infektiosität der Syphilis durch die Übertragung pathogenen Materials von Menschen auf Kaninchen [54]. 1903 zeigten Ilya Ilyich Mechnikov und Pierre Paul Emil Roux (Paris), dass sich Syphilis auch von Menschen auf Affen übertragen ließ [98]. Der Mensch ist aber der einzige natürliche Wirt für *T. pallidum*. Gewisse Tierarten (besonders Kaninchen und Hamster) entwickeln eine Syphilis, die aber nicht stadiengemäß abläuft und nicht kongenital auftritt [153].

Die intakte Epidermis ist für *T. pallidum* nach heutigem Wissensstand undurchlässig [53]. Der Erreger ist aber fähig, die Epithelzellen der Schleimhaut zu durchdringen [173]. Es wird angenommen, dass die Eintrittspforte für die Infektion entweder die Schleimhaut oder mikroskopische Verletzungen der Epidermis sind. Bei der Inokulation adheriert *T. pallidum* durch eine Rezeptor-Ligand-Interaktion mit einem oder zwei ihrer Enden an der Zelloberfläche [53, 42]. Danach folgt die extrazelluläre (82 %) oder intrazelluläre (18 %) Invasion [42], welche durch wellenartige bohrende Bewegungen, spirale Form und Ausscheidung von Membran-lysierenden Toxinen begünstigt wird [43]. Das Bakterium besitzt eine zytotoxische Aktivität gegen Neurofibroblasten und anderen Zellen [42, 25], als auch eine Haemolysin-ähnliche Aktivität [161]. Die Generationsdauer von Treponemen beträgt ca. 30 Stunden [93, 110]. Mikroskopisch wurden Treponemen in zytoplasmatischen Vakuolen der neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Plasmazellen, Endothelzellen, Fibroblasten [4], im Zytoplasma und im Nukleus von Epithelzellen [169, 53], Leydig-Zellen (testikulären Zellen), Spermatozyten [170] und in Myozyten [43] nachgewiesen. 1913 beschrieb und zeichnete Benjamin Lipschütz (Wien) in seinem Atlas [87] intrazellulär liegender Treponemen (**Abbildung 2**). Für Infektion reichen im Kaninchen-Modell 1 - 5 Treponemen aus [93, 71, 153].

T. pallidum verbreitet sich von der Inokulationsstelle durch die lymphatischen Kapillaren und kann nach ca. 30 Minuten (bei intratestikulärer Inokulation) in den regionalen Lymphknoten nachgewiesen werden [153, 79]. Über den Ductus lymphaticus gelangt *T.*

pallidum ins Blut und in alle Gewebe und Organe als eine disseminierte Infektion. So wurde *T. pallidum*-DNS im Serum von Patienten im Inkubationsstadium nachgewiesen [96].

Abbildung 2. Intrazellulär liegende Treponemen (Lipschütz, 1913 [87])



Abkürzungen: 1, 2, 3, 4, „Phagozytoseformen der *Spirochaeta pallida* in polymorphkernigen Leukozyten“, 5, 6, 7, „Phagozytoseformen in Bindegewebszellen aus der Initialsklerose“ (Lipschütz, 1913)

Nach der *T. pallidum*-Infizierung wird eine infektiöse Immunität in Gang gesetzt, welche eine Resistenz gegenüber einer neuen Infizierung mit Syphilis- oder anderen Spirochätose-Erregern (Frambösie, Bejel) bedingt [185]. Der erste Schritt der Immunantwort läuft über polymorphnukleäre Leukozyten ab [53]. Treponemales 47 kDa-Antigen induziert die Expression von Adhensionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1, E-selectin) in den dermalen mikrovaskulären Endothelzellen, was die T-Zell-Adhäsion begünstigt [86]. Treponemale Lipoproteide induzieren eine zelluläre Th1-Immunantwort, welche durch aktivierte T-Lymphozyten, Plasmazellen und antigenpräsentierende Zellen (Makrophagen und dendritische Zellen), aktivierte Keratinozyten und Endothelzellen das morphologische Bild der frühen syphilitischen Hauterscheinungen prägen [97, 176, 159]. So führen die treponemalen Pathogenitätsfaktoren und die Immunreaktion zur Entstehung einer obliterierenden Endarteriitis, was klinisch als Primäraffekt imponiert [29].

Die zelluläre Immunität ist für die Elimination von *T. pallidum* aus den syphilitischen Hauterscheinungen wichtiger als die humorale [89, 175]. Die Anzahl der T-Zellen und Makrophagen, den wichtigsten Antigen-Präsentanten in primären und sekundären Syphilisläsionen, ist zeitlich und direkt mit dem Verschwinden der Hauterscheinungen

assoziiert [38, 175]. Die in die Haut, Schleimhaut, Muskeln, Knochen und das Nervensystem bei primärer Syphilis abgesiedelten Treponemen werden durch die zunehmende Immunreaktion abgetötet.

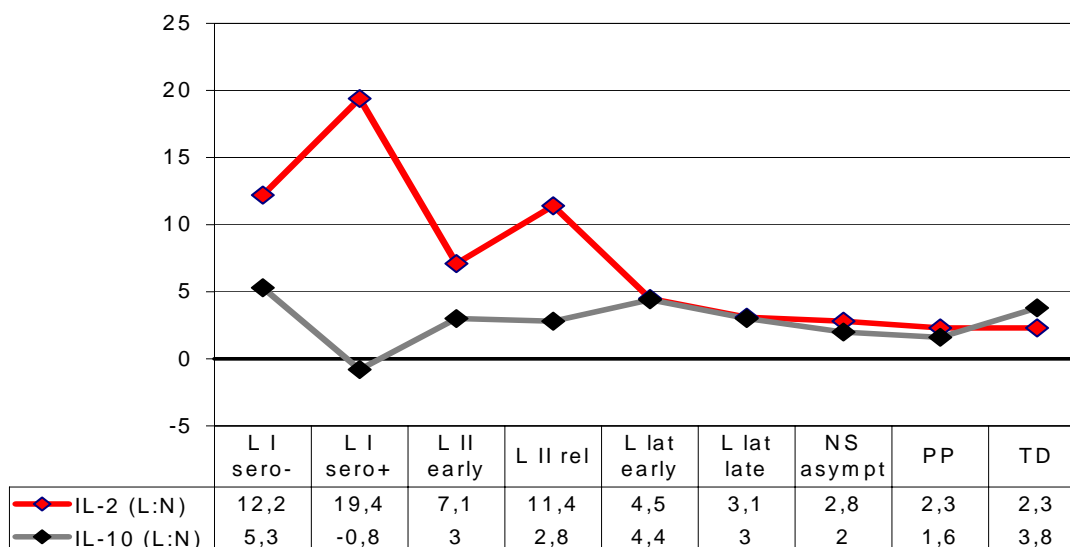
Die Abheilung der Hautläsionen bei Syphilis ist direkt abhängig davon, inwieweit die Th1-T-Lymphozyten die Zytokine IL-2, Interferon (IFN), *tumor necrosis factor* (TNF) und *migration inhibitor factor* (MIF) produzieren. Diese Produktion findet besonders bei primärer seropositiver und sekundärer Syphilis statt. Die Vernichtung von *T. pallidum* in den Hautläsionen bei primärer und sekundärer Syphilis bedeutet aber nicht die komplette Eliminierung des Erregers aus dem Organismus. Die genauen Mechanismen der nicht erfolgreichen Immunabwehr gegen *T. pallidum* sind unklar.

Bei der latenten Syphilis ist der Anteil von CD4-T-Lymphozyten höher als der CD8-T-Zellen. Eine prozentuale Abnahme der CD4-T-Zellen und ein Absinken der IL-2-Konzentration kann durch eine zelluläre Immunitätsschwäche oder Inaktivität gegenüber *T. pallidum* entstehen [132]. Die Funktion der CD8-T-Zellen in der Immunantwort gegen *T. pallidum* ist noch nicht ganz geklärt. Sie produzieren IFN- γ und aktivieren dadurch Makrophagen und Phagozytose der extrazellulären und der intrazellulären Treponemen [175].

Die Th1-Immunantwort ist aktiv bei primärer, eine Th2-Antwort bei sekundärer und späterer Syphilis. Die erhöhte Produktion der Th2-Zytokine (IL-6, IL-10) *in vitro* assoziiert sich mit der Reduktion der Synthese von Th1-Zytokinen (IL-2, IFN, TNF) (**Abbildung 3**). Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) produzieren IL-2, dessen maximale Konzentration bei der manifesten Frühsyphilis beobachtet wird, und dann aber langsam im Latenz- und Spätstadium absinkt. Je schwerer der Syphilisverlauf (Syphilis maligna, Tabes dorsalis) ist, desto niedriger wird die IL-2-Konzentration im Blut (**Abbildung 3**).

Die Mechanismen der Syphilis-Pathogenese sind noch nicht vollständig entschlüsselt. So basiert der aktuelle Wissensstand über die Syphilis-Pathogenese auf dem Zusammenhang der Ergebnisse von humanen und experimentell-biologischen Forschungen.

Abbildung 3. Die Relation der Konzentrationen des Th1- (IL-2) und Th2-Zytokins (IL-10) im Überstand einer PBMC-Zellkultur von Syphilis-Patienten nach der Stimulation mit *T. pallidum* zum durchschnittlichen Normwert (IL-2 \approx 350 U/ml, IL-10 \approx 7 pg/ml) (Podwinska et al, 2000 [131], modifiziert)



L, Lues; N, Normwert; L I, primäre Lues; L II, sekundäre Lues; L lat, latente Lues; NS, Neurosyphilis; PP, progressive Paralyse; TD, Tabes dorsalis; sero+, seropositive Lues; early, frühe Lues; late, spätere Lues; asympt, asymptomatisch

1.3.4 Humorale Immunität: diagnostische Bedeutung

Humoral immunity: diagnostical impact

Eine initiale humorale Immunantwort entsteht nach der *T. pallidum*-Infizierung in etwa zwei Wochen: es werden spezifische Antikörper – IgM und IgG – gegen treponemale Oberflächenproteine gebildet, die sich durch ihre unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeit - 19S und 7S trennen lassen [158]. Die IgM-Antikörper sind diagnostisch für die erworbene, als auch für die angeborene Syphilis sehr relevant, da sie nur nach dem Kontakt mit bakteriellen Antigenen produziert werden [158]. Ihr Nachweis spricht für eine aktive Syphilis und den Therapiebedarf [149]. Ausnahmen sind dabei: (1) der Zustand nach abgeschlossener Therapie, wobei IgM noch einige Zeit nachweisbar ist [45, 85], (2) eine HIV-Koinfektion, wobei falsch-positive IgM-Tests beobachtet wurden [100], (3) die Bildung von IgM gegen antitreponemale IgG-Antikörper (IgM-anti-IgG) bei lang bestehender unbehandelter Syphilis [149]. IgM bleibt nach der Behandlung der frühen Syphilis im Laufe von 3 - 9 Monate nachweisbar, bei der späteren Syphilis – 12 - 18 Monate und manchmal

sogar bis zu 24 Monate [45, 85] (**Abbildung 4**). Ein IgM-Nachweis später als 24 Monate nach Therapie kann für eine behandlungsbedürftige Infektion sprechen (Rezidiv, Reinfektion).

Die IgM-Tests können bei der Syphilis auch falsch negativ sein. Bei der manifesten Syphilis findet oft eine IgG-Hyperproduktion statt, welche die treponemalen Antigene des IgM-Testsystems überwiegend mit antitreponemalem IgG bedecken, was zu einer kompetitiven Hemmung der IgM-Bindung und fehlendem IgM-Nachweis führt (sog. Prozone-Phänomen) [172]. Durch die Abtrennung der 19S-IgM-Fraktion von der IgG-Fraktion kann das Prozone-Phänomen beseitigt werden (z.B. im 19S-IgM-FTA-ABS-Test) [107, 101]. Bei späteren Syphilis-Formen (z.B. tertiäre Syphilis) kann der „Erreger-Immunsystem-Kontakt wegen kleiner *T. pallidum*-Mengen so gering sein, dass IgM nicht mehr oder nicht in ausreichender Menge für den Nachweis produziert wird [150].

Die Bedeutung der 7S-IgM für die Syphilis-Diagnostik ist noch unklar [171].

Die treponemaspezifischen IgG (7S-IgG) sind ab der 4. - 5. Woche nach der Infizierung nachweisbar [149] und bleiben unabhängig von der Behandlung lebenslang positiv („Seronarbe“). Diese Antikörper werden auch passiv durch die Plazenta von der kranken Mutter auf das Kind übertragen [99].

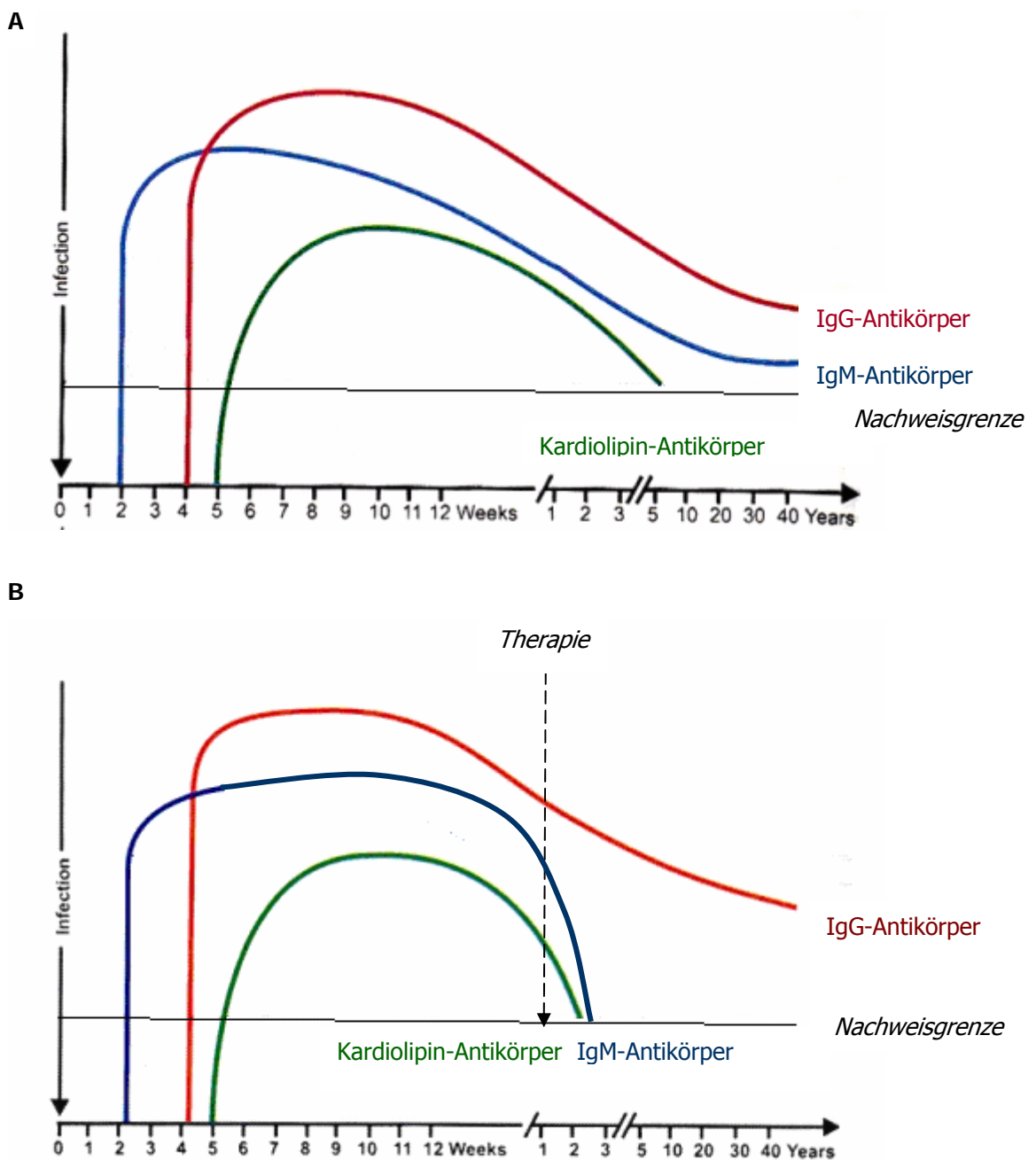
Das treponemaspezifische IgE wird in der Diagnostik nicht benutzt. Es kann aber für die Entstehung der toxinämischen Reaktion (Jahrsch-Herxheimer-Reaktion) [73, 61] bei dem therapiebedingten Zerfall der Treponemen verantwortlich sein. IgE-Antikörper können bei der Bildung von Immunkomplexen und der Entstehung der sekundären Hautläsionen mitwirken [185].

Ab der 5. - 6. Woche nach der Infizierung (2 - 3 Wochen nach der Entstehung des Schankers) werden nicht-treponemale IgM- und IgG-Antikörper gegen Lipoid-Moleküle (Kardiolipin, Cholesterin, Lipoproteide, Lecithin) synthetisiert, die bei der Zerstörung der humanen Zellen und Treponemen freigesetzt werden [185]. Nach der Bildung von nicht-treponemalen (Kardiolipin)-Antikörpern wird die primäre Syphilis labormäßig auf die seronegative und seropositive Phase geteilt. Im Laufe der Infektion sinkt der Titer der Kardiolipin-Antikörper unabhängig von der Therapie ab, so dass bei der tertiären Syphilis die Kardiolipin-Tests in 30 % der Patienten negativ werden [150]. Der Titer der Kardiolipin-Antikörper ist als indirekter Marker des Therapie-Erfolges anzusehen: Senkung bedeutet Rekonvaleszenz, Anstieg Reinfektion oder Therapieversagen. Die Lipoid-Antigene werden auch bei systemischen

Erkrankungen (Infektionen, Autoimmunkrankheiten, Malignome), bei denen eine Zellkern-Destruktion stattfindet, freigesetzt, was zu falscher Positivität führen kann [150].

Treponemen-spezifische IgA- und IgD-Antikörper sind auch bei der Syphilis nachzuweisen, ihre pathogenische Relevanz ist aber noch unklar und sie werden bisher in der Syphilis-Diagnostik nicht bestimmt [185, 52, 69].

Abbildung 4. Antikörper-Produktion vor (A) und nach der Therapie (B) der späteren Syphilis (Petzoldt, 2005 [127], modifiziert)

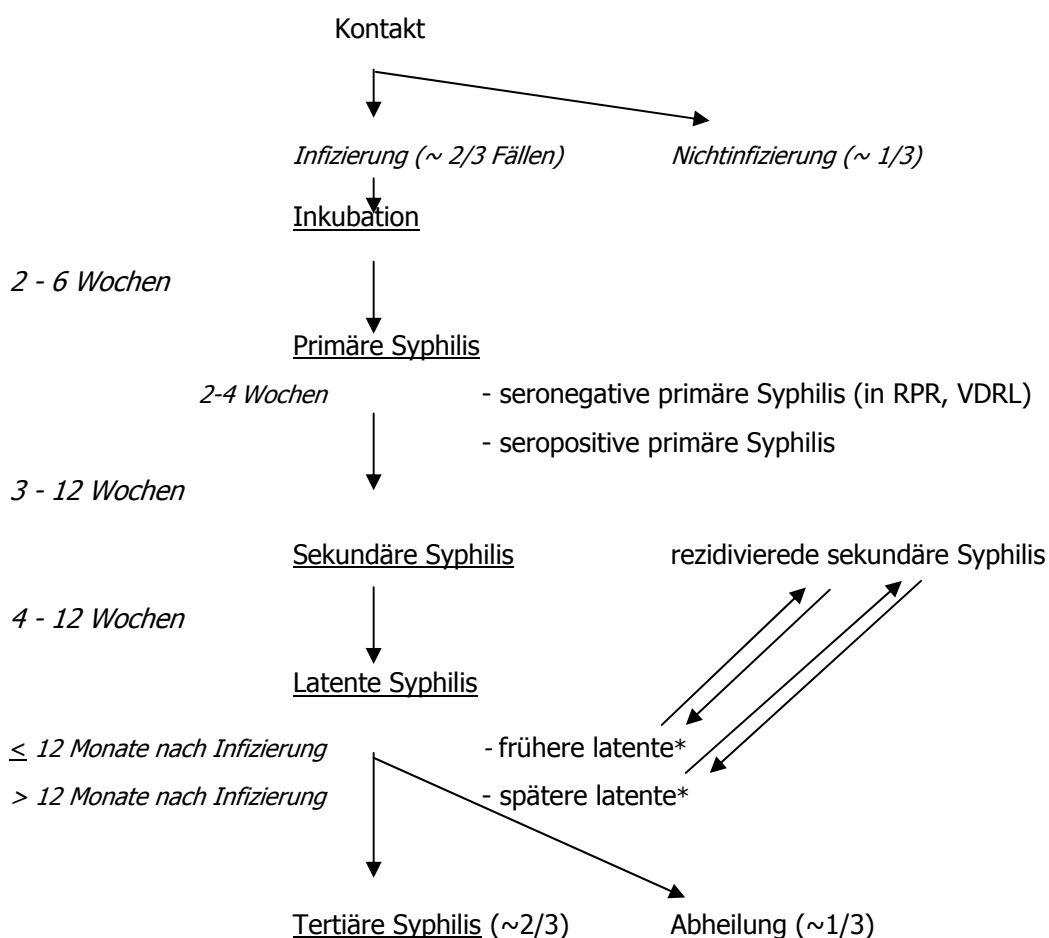


1.3.5 Klinik der Syphilis (natürlicher Verlauf)

Clinics of syphilis (natural course)

Die Syphilis tritt als erworbene oder angeborene (kongenitale) Infektion auf. Der Krankheitsverlauf der erworbenen Syphilis wird klinisch auf Grund der Hautsymptome in fünf Stadien gegliedert: Inkubation, primäre, sekundäre, latente, tertiäre Syphilis (**Abbildung 5**).

Abbildung 5. Natürlicher Verlauf der Syphilis nach sexuellem Kontakt mit Syphilis-Infiziertem (Sanchez, 1999 [150], modifiziert)



* „deutsche Klassifikation“ (Braun-Falco et al, 2000 [11])

Für epidemiologische und therapeutische Zwecke wird die Syphilis in die Frühsyphilis unterteilt, wenn die Infektion bis zu einem Jahr besteht (z.B. Deutschland [11], USA (CDC) [19]); bis zu zwei Jahren – WHO, UK [188], Russland [104]), und in die Spätsyphilis, wenn die Infektion mehr als ein Jahr dauert (mehr als zwei Jahre nach WHO). Die Behandlung der Spätsyphilis muss länger und intensiver durchgeführt werden.

Die Inkubationszeit ist kürzer, wenn der Patient mit vielen Treponemen gleichzeitig infiziert wird, immunologisch gesund ist (bei immunschwachen Patienten verlängert sich die

Inkubationszeit) und keine in den letzten Jahren durchgemachte Syphilis hatte (fehlende Immunität) [150].

1.3.5.1 Primäre Syphilis (Lues I)

Primary syphilis

Eine obliterierende Endarteriitis an der Eintrittspforte führt zu den klinischen Erscheinungen der primären Syphilis (Primäraffekt): Erythem (Makula), welches sich schnell in eine Papel, dann in eine Erosion, und oft weiter in ein Geschwür mit hartem schmerzlosem Grund (syphilitisches Ulcus, harter Schanker) umwandelt. Nach 5 - 8 Tagen entstehen eine Lymphangitis und regionale Lymphadenitis. Das Nervensystem kann bei HIV-positiven Patienten bereits in diesem Stadium betroffen werden [150]. Die primäre Syphilis dauert etwa 4 Wochen, ehe Symptome der sekundären Syphilis auftreten.

1.3.5.2 Sekundäre Syphilis (Lues II)

Secondary syphilis

Die zelluläre und humorale Antwort führt zur Entstehung von Entzündungsreaktionen an den Orten der treponemalen Absiedlungen, und vermittelt so die Symptome der sekundären Syphilis - disseminierte Hautläsionen - Syphilide der Haut (makulöse, papulöse, papulosquamösen, pustulöse) und/oder der Schleimhaut (makulöse, papulöse), Hypo-, Depigmentierungen (syphilitisches Leukoderm) und Haarausfall (Alopecia specifica). Dieses Stadium wird von Polyadenopathie und manchmal von allgemeinen (Fieber, Asthenie) und spezifischen Symptomen einer Infektionskrankheit (Neuropathie, Ophtalmopathie, Parotitis, Gastritis, Hepatitis, Cardiovasculopathie, Myo- und Osteo- und Artrophatie, Nephropathie) begleitet. Die Zahl der Syphilide und die Ausprägung nehmen im Verlauf ab [150].

1.3.5.3 Latente Syphilis (Lues latens)

Latent syphilis

Im latenten Stadium der Syphilis ist das Immunsystem maximal aktiviert und die *T. pallidum*-Konzentration im Organismus am niedrigsten. Die Hauterscheinungen heilen in diesem Stadium narbenlos ab (Ausnahme Lues maligna), allerdings enthalten die inneren Organe und das Nervensystem den Erreger und die Krankheit schreitet weiter fort. Der „Manifestation-Latenz-Manifestation“-Verlauf wird mit der Zeit durch die steigende Sensibilisierung des Immunsystems gegen den Erreger und seine Virulenzfaktoren gesteuert. Lässt die Aktivität des Abwehrmechanismen durch verminderten Kontakt mit dem Erreger nach, vermehrt sich *T. pallidum* und führt zu einem neuen Manifestationsschub an Haut/ Schleimhaut und anderen Organen (rezidivierende Syphilis) [9]. Spontanheilungen oder fehlende klinische Symptome der Syphilis bei positiver Serologie können bei bis zu 30 % der Patienten in diesem Stadium vorkommen [185].

1.3.5.4 Tertiäre Syphilis (Lues III)

Tertiary syphilis

3-5 Jahren nach der Infektion kann das tertiäre Stadium der Syphilis auftreten: kutane tuberöse oder subkutane knotige (Gumma) Syphilide, granulomatöse nekrotisierende ulzerierende Entzündungen [11]. Die Gummen können sich überall bilden, oft in der Unterhaut, aber auch im Hirn und in parenchymatösen Organen oder in den Knochen. Mit der Zeit steigt die Sensibilisierung des Immunsystems gegen den Erreger, welcher aber immer weniger vorhanden ist, was eine Art von Autoaggression verursacht. So sprechen die durch Syphilis verursachten Manifestationen der interstitiellen Keratitis, sensorische Schwerhörigkeit oder der syphilitischen Arthritis (Clutton-Gelenk) auf die antibiotische Therapie nicht an [185].

1.3.5.5 Neurosyphilis

Neurosyphilis

Die Wahrscheinlichkeit einer treponemalen ZNS-Invasion steigt schon ab dem Stadium der sekundären Syphilis (ca. 6 Monate nach Infizierung) an und erreicht nach 12 - 18 Monaten ihren Höhepunkt [122]. Bei HIV-Koinfektion kann das aber schon bei der primären Syphilis geschehen [150]. Die Diagnostik der Neurosyphilis basiert auf den klinischen Symptomen und neurologischen Zeichen und auch auf pathologischen und serologischen Liquor-Befunden. Die pathologischen Liquor-Befunde, wie Erhöhung der Zell-Konzentration – Pleozytose (bei $> 5 \times 10^6$ Zellen/l) und Protein-Konzentration ($> 0,4$ g/l), sind für Syphilis unspezifisch und weisen nur auf den Entzündungsprozess im Nervensystem hin (u.a. bei aseptischen Meningitis, Meningokokken-Meningitis, HIV-Infektion (40-60 %, [161]), Malaria, Neoplasie u.s.w.) [150]. Andererseits können bei Neurosyphilis diese Befunde fehlen [150]. Die eindeutige Diagnose einer Neurosyphilis wird beim Nachweis der treponemaspezifischen IgM-Antikörper oder der *T. pallidum*-DNS im Liquor ausgestellt.

1.3.5.6 Kongenitale Syphilis

Congenital syphilis

Eine infizierte Mutter kann *T. pallidum* diaplazentar oder seltener beim Geburtsakt übertragen, aber nicht durch die Muttermilch. Die Entwicklung der kongenitalen Syphilis ist vom Syphilis-Stadium der Mutter abhängig. Hat die Mutter eine primäre Syphilis mit Genitalulkus, wird das Kind bei der Geburt infiziert und entwickelt danach eine aquirierte primäre Syphilis mit Primäraffekt. Wenn die Mutter eine sekundäre Syphilis hat, wird das Kind intrauterin infiziert und die Hälfte der Kinder entwickelt eine manifeste, die andere Hälfte eine latente Syphilis. 40 % der Mütter mit latenter Frühsyphilis bekommen Kinder mit kongenitaler Syphilis, 20 % haben Frühgeburten, 10 % Totgeburten [150, 127].

Die kongenitale Syphilis wird in frühe kongenitale (Syphilis connata praecox) bis zum 2. Lebensjahr und späte kongenitale Syphilis (Syphilis connata tarda) nach dem 2. Lebensjahr eingeteilt [150].

1.3.5.7 Syphilis und HIV-Infektion

Syphilis & HIV infection

Die Syphilis erhöht das Risiko einer Infizierung mit dem HI-Virus: erosive und ulzerierte Hautläsionen sind eine Eintrittspforte für das HIV [123], die treponemalen Lipoproteine stimulieren die Expression des Adhäsions-Co-Rezeptors (Chemokin-Rezeptors CCR5) für den M-tropischen HIV-1-Stamm auf Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen [159]. Der Syphilis-Verlauf bei Menschen mit HIV-Koinfektion unterscheidet sich nicht wesentlich von klassischem Verlauf. Es wurde vereinzelt berichtet, dass bei HIV-positiven Patienten der Schanker länger besteht und noduläre, ulzerierende oder maligne (nekrotisierende) Hauterscheinungen öfters auftreten [150]. Der Ablauf der HIV-Infektion wird auch durch die Syphilis beeinträchtigt. So ist die HI-Viruslast bei den Syphilis-Patienten höher und die Zahl der CD4-Zellen niedriger, als bei HIV-positiven Patienten ohne Syphilis. Im Laufe der Syphilis-Therapie sinkt die Viruslast und steigt die CD4-T-Zellzahl an [15].

1.4 Diagnostik der Syphilis

Diagnosis of syphilis

Die diagnostischen Verfahren in der Syphilologie können methodisch in mikroskopische, serologische und molekulare Verfahren, nach Aufwandsgrad in routinemäßige (einfache) und wissenschaftliche (aufwendige) Verfahren unterschieden werden (**Tabelle 1**).

Tabelle 1. Diagnostischen Verfahren der Syphilis-Diagnostik

Routinverfahren	
1. Mikroskopie	<ul style="list-style-type: none"> - Dunkelfeldmikroskopie - Histologie - Direkter-Fluoreszenzantikörper-Test (DFA)
2. Nichttreponemale (nicht treponemaspezifische) Tests	<ul style="list-style-type: none"> - Rapid-Plasma-Reagin-Test (RPR, RPR Card) - Venereal-Diseases-Research-Laboratory-Test (VDRL-Test)
3. Treponemale (treponemaspezifische) Tests	<ul style="list-style-type: none"> - Treponema pallidum-Immobilisationstest (TPI) - Treponema pallidum-Hämagglutinationstest (TPHA)/ Treponema pallidum-Partikelagglutinationstest (TPPA)/ Mikrohämagglutinationstest-Treponema pallidum (MHA-TP) - Fluoreszenz-Treponema-Antikörperabsorbtionstest (FTA-ABS-Test, IgM-, 19S-IgM-, IgG-FTA-ABS-Test) - Enzyme Linked Immunosorbend Assay (ELISA) - IgM Solid Phase Haemadsorbtion-Test (IgM-SPHA) - Immunoblot (Westernblot)*
Wissenschaftliche Verfahren	
	<ul style="list-style-type: none"> - Elektronenmikroskopie - Rabbit Infectivity Test (RIT) - Immunoblot (Westernblot)* - PCR
Serologische Verfahren entsprechend klinischem Einsatz	
1. Suchtests (Screening)	<ul style="list-style-type: none"> - RPR, RPRC, VDRL - TPHA, TPPA, MHA-TP - IgG-ELISA, IgM-ELISA (angeborene Syphilis)
2. Bestätigungstests	<ul style="list-style-type: none"> - IgG-, IgM-, 19S-IgM-FTA-ABS-Test - IgM-ELISA
3. Verlaufstests (Therapie-Kontrolle)	<ul style="list-style-type: none"> - VDRL - IgM-, 19S-IgM-FTA-ABS-Test - IgM-SPHA

*, Der Immunoblot wird je nach der Laborausstattung entweder als Routine-, oder als wissenschaftliches Verfahren eingestuft

1.4.1 Mikroskopische Diagnostik

Microscopical diagnosis

1.4.1.1 Dunkelfeldmikroskopie

Dark-field microscopy

Der Syphilis-Erreger ist eine *in vitro* schlecht kultivierbare und schlecht anfärbare Spirochaeta [118]. Eine der ersten und routinemäßigen diagnostischen Methoden war die Mikroskopie des Nativpräparates mit Treponemen bei geschlossenem Kondensor, frisch gewonnen aus einer syphilitischen nässenden Läsion, Liquor, Lymphknoten-Punktat, die sog. Dunkelfeldmikroskopie (DFM, Coles, 1909 [26]). Die DFM-Diagnostik basiert auf dem Nachweis von Treponemen mit charakteristischen langsamen Bewegungen (Vorwärts- und Rückwärtsbewegung, Rotation, Knickbewegung, Undulation) und auf der Zahl der Windungen (6 bis 14) [119, 159]. DFM ist nicht spezifisch für den Syphilis-Erreger, da die Mundschleimhaut-Treponemen eine ähnliche Morphologie besitzen [150, 46], und ist auch sehr von der Erfahrung des Untersuchers und dem methodischen Ablauf abhängig [149]. Die DFM-Sensitivität beträgt ca. 75 - 80 % bei der Untersuchung des Primäraffektes [85].

DFM wurde durch den Rabbit Infectivity Test (RIT, Brown & Pearce, 1920 [13, 153]) verbessert. So wurde das Patientenmaterial mit DFM-negativem Befund in Kaninchenhoden injiziert und nach der Entwicklung der frischen nässenden Läsionen wieder in der DFM untersucht [153]. Der RIT bleibt noch bis heute ein Goldstandard in der Sensitivität, da er 1-5 lebende Treponemen nachweist. *T. pallidum*-PCR kann dabei mit dem RIT konkurrieren, da sie auch DNS oder RNS von einzelnen Mikroorganismen nachweisen lässt [68].

1.4.1.2 Histologie

Histology

Der Nachweis des Erregers im histologischen Präparat mittels der Haematoxilin-Eosin-Färbung ist kaum möglich, da die treponemale Membran die Färbung nicht annimmt. Die Histologie der syphilitischen Hautläsionen selbst ist auch nicht spezifisch [29]: die Plasmazellen als ein Hinweis auf Syphilis kommen nur in 75 - 80 % der Fälle der sekundären Syphilis vor [1, 36]. Der Erreger kann mittels Silber-Färbung nach Levaditi (1906) [87], Warthin-Starry (1920) [179] oder Steiner (1950) [166] im Gewebe nur in 33 % [74], 41 % [168], 60 % [128], oder 71 % [36] nachgewiesen werden. Bei dieser Färbung sind die Bakterien als spiralförmige schwarze Strukturen in den gelblich gefärbten Geweben besser erkennbar [29].

1.4.1.3 Direkter Fluoreszenzantikörper-Test

Direct Fluorescence Antibody test (DFA)

In den 60-er Jahren wurde für die spezifische Identifizierung des Syphilis-Erregers der Direkte Fluoreszenzantikörper-Test (DFA) für *T. pallidum* (DFA-TP) [77] und später monoklonale Antikörper für den Direct Fluorescence Antibody Tissue Test-Treponema pallidum-Test (DFAT-TP-Test) [64, 70] entwickelt. Das Verfahren wird mit Fluoreszenzmikroskopie und Dunkelfeld-Kondensator durchgeführt. Mittels DFA lassen sich die Treponemen in läsionalen Sekreten, Hautschnitten und Körperflüssigkeiten nachweisen. Die Sensitivität des DFA-TP-Testes variiert mit dem Untersuchungsmaterial und beträgt 70 % in Biopsaten der sekundären Syphilis [62] und bis zu 100 % in frischen nässenden Läsionen [70]. Der DFA-TP-Test ist bei der Untersuchung der Sekrete aus Genitalläsionen mit der *T. pallidum*-PCR in 93,6 % der Fällen und mit der *T. pallidum*-PCR-Blot-Hybridisierung in 95,5 % der Fälle übereinstimmend [76].

1.4.2 Serologische Diagnostik

Serological diagnosis

1.4.2.1 Nichttreponemale Tests

Nontreponemal tests

Die nichttreponemalen serologischen Tests basieren auf dem Präzipitations-(Flokulation)-Verfahren und weisen antilipoide Kardiolipin-(IgM/IgG)-Antikörper nach. Für diese Tests werden verschiedene Blutkomponenten benutzt: für den VDRL-Test (Harris et al, 1946 [58]) inaktiviertes Serum, für den RPR-Test (Portnoy et al, 1957 [134]) Plasma, bzw. natives Serum. Das Syphilis-Management orientiert sich am VDRL-Test, da dieses Verfahren indirekt die Aktivität der Infektions-Immunitäts-Beziehung widerspiegelt und so Hinweise auf den Infektionsablauf und die Therapiebedürftigkeit liefert (**Tabelle 2**).

VDRL- und RPR-Test werden 4-6 Wochen nach der Infizierung (1-2 Wochen nach der Entstehung des Primäraffektes) positiv. Bei Spätsyphilis und besonders bei tertiärer Syphilis kann der VDRL-Titer unabhängig von der vorliegenden Infektion negativ werden (**Tabelle 3**) [1]. Der VDRL-Titer fällt nach ausreichender Therapie, kann aber noch einige Zeit positiv (< 1:8 in 80 %) bleiben: nach der Therapie der primären Syphilis 6 - 12 Monate lang, nach der sekundären Syphilis 12 - 24 Monate, nach der frühlatenten Syphilis bis zu 5 Jahren, nach der spätlatenten Syphilis länger als 5 Jahre. Ein länger als zwei Jahre unverändert positiver VDRL-Test entspricht einer "Seronarbe" [1].

Tabelle 2. Management der Syphilis nach VDRL-Titer (Sanchez & Luger, 1993 [1], modifiziert)

VDRL-Test (Titer)	anamnestische Daten	Procedere
1:2 - 1:6	keine Angaben bezüglich Therapie	Kontrolle in 2-4 Monaten, bei Titeranstieg: Therapiebedürftigkeit + treponemale Tests
	behandelte Syphilis	Therapieerfolg, Kontrolle in 3-6 Monaten
≥ 1:8	keine Angaben bezüglich Therapie	Therapiebedürftigkeit
	behandelte Syphilis	Kontrolle (Dauer abhängig vom Syphilis-Stadium), bei Titersenkung: Therapieerfolg, bei Titeranstieg: Therapiebedürftigkeit + treponemale Tests

VDRL- und RPR-Test können bei HIV-Koinfektion (**Tabelle 4**) und bei Neurosyphilis (Liquor) falsch negativ ausfallen [91]. Falsch positive Resultate sind möglich bei der Produktion von anti-IgM-Autoantikörpern („Rheuma-Faktor“) bei Autoimmunkrankheiten (Lupus erythematodes [163, 2], Antiphospholipid-Syndrom [7], Overlap-Syndrom [2]), bei Neurosyphilis [31], bei Koinfektion mit HIV (**Tabelle 4**), HCV [164], anderen Spirochätosen, wie z.B. *Spirillum minus*-Infektion (Rattenbisskrakheit) [138], bei Plasmodien-Infektion [55], Mykoplasmen-Pneumonie [85]), Lymphosarkom [187], in der Schwangerschaft [163], oder im hohen Alter [174]. Die Sensitivität und Spezifität von RPR und VDRL sind in der **Tabelle 3** dargestellt.

1.4.2.2 Treponemale Tests

Treponemal tests

Die treponemalen (treponemaspezifischen) serologischen Tests basieren auf dem Nachweis von Antikörpern gegen treponemale Antigene und werden als Bestätigungstests bei positiven Screeningstests, bei unklaren Testergebnissen, oder bei einer HIV-Koinfektion eingesetzt. Die treponemalen Tests kann man in zwei Gruppen einteilen:

- Tests mit gleichzeitigem Nachweis der treponemaspezifischen IgM- und IgG-Antikörper, wie TPI-, TPHA-Test, FTA-ABS-Test, ELISA;
- Tests mit getrenntem Nachweis der treponemaspezifischen IgM- oder IgG-Antikörper, wie IgM-/ IgG-FTA-ABS-Test, 19S-IgM-FTA-ABS-Test, IgM-/ IgG-ELISA, IgM-SPHA, IgM-Immunoblot.

Die Vorteile der Tests mit gleichzeitigem IgM/IgG-Nachweis sind ihre einfache Handhabung und relative Preiswertigkeit. Diese Tests sind wenig spezifisch (s. unten) und sind für

Therapie-Kontrolle und für Diagnostik der frühen kongenitalen Syphilis wegen der IgG-Mitbestimmung ungeeignet.

Der erste treponemale Test, TPI-Test (Nelson & Mayer, 1949 [112]), ließ die aus Kaninchen isolierten pathogenen Treponemen nach der Inkubation mit dem Patienten-Serum immobilisieren und in DFM nachweisen. Der hohe technische Aufwand des Tests und die Notwendigkeit eines Vivariums führte dazu, dass dieser Test nur zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet wird [85].

Der TPHA-Test (Rathlev, 1965 [137]) und seine Modifikationen, MHA-TP-Test, TPPA-Test, basieren auf der Agglutination von mit *T. pallidum*-Antigen beschichteten Erythrozyten (Gelatinepartikel in TPPA-Test) durch die Antikörper im syphilitischen Serum. Die Sensitivität und Spezifität sind vergleichbar zum FTA-ABS-Test, aber geringer als bei primärer Syphilis (**Tabelle 3**).

Der FTA-Test (Deacon et al, 1957 [33]) wurde nach der Etablierung durch die Absorption der IgM- und IgG-Antikörper des Patientenserums mittels abgetöteter saprophytischer Treponemen (*Treponema phagedensis*, sog. Reiter-Stamm) (FTA-ABS-Test) wesentlich verbessert. Nach der Absorption wird das Patientenserum auf einem Objektträger mit abgetöteten pathogenen *T. pallidum* aufgebracht, mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen *T. pallidum*-Antikörper behandelt und im Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. Falsch negative Reaktionen des FTA-ABS-Tests sind selten. Falsch positiv kann der Test bei infektiöser Mononukleose, lepromatöser Lepra, Leptospirose, Borreliose, Malaria, Rückfall-Fieber, systemischem Lupus erythematodes [1], als auch bei der HIV-Koinfektion (**Tabelle 4**) ausfallen. Die Abtrennung der IgG-Antikörper und der separate Nachweis der IgM-Antikörper (wie z.B. im 19S-IgM-FTA-ABS-Test) mittels hochauflösender Flüssigkeitschromatographie (HPLC) dient zur Therapie-Kontrolle und der Diagnostik der kongenitalen Syphilis.

Im ELISA (Engvall & Perlman, 1971 [39]) reagieren die antitreponemalen Antikörper in zwei Schritten mit dem auf die Mikrotiter-Platte fixierten Antigen und dann mit dem Enzym-markierten antihumanen Immunglobulinen im Medium, und werden dann mittels einer Substrat-abhängigen Farbreaktion nachgewiesen. Der IgM-ELISA weist bei der Syphilis 19S-IgM gegen treponemale Antigene (vor allem 37 kDa-Antigen) [155] nach, welche ab dem Ende der zweiten Infektionswoche synthetisiert werden. Die Produktion des anti-37-kDa-IgM sinkt im Laufe der Infektion ab. Dadurch reduziert sich die Empfindlichkeit des Tests. Der

IgM-ELISA besitzt aber 100 %ige Spezifität und wird als Referenz-Test bei der kongenitalen Syphilis mit 90 %iger Sensitivität eingesetzt [1].

Der SPHA-Test (Schmidt, 1980 [155]) basiert auf der Solid-Phase-Immunsorbent-Technik (Krech & Wilhelm, 1979 [82]) und wird als eine sensitive diagnostische Methode für den Nachweis der antitreponemalen IgM-Antikörper (IgM-SPHA) eingesetzt. Die Reaktivität des IgM-SPHA-Tests bleibt nach der Behandlung der frühen Syphilis 3 - 6 Monate, der späteren Syphilis 6 - 12 Monate vorhanden.

Beim Immunoblot (Westernblot) werden die mittels der Polyacrylamid-Elektrophorese separierten *T. pallidum*-Antigene auf Membranen übertragen und mit dem Patienten-Serum inkubiert (Dettori et al, 1989) [34]. Die antitreponemale Antikörper werden mit markierten antihumanen IgG- oder IgM- Antikörpern visualisiert. Die Methode erlaubt den parallelen Nachweis von Antikörpern gegen mindestens drei verschiedene treponemale Antigene (15.5-, 17-, 44.5-, 47-kDa) und ist dadurch sehr spezifisch und sensitiv in jedem Stadium der Syphilis. Die Sensitivität der verschiedenen serologischen Verfahren ist in der **Tabelle 3** dargestellt. Der IgM-Immunoblot für Syphilis wurde aber noch nicht bei Patienten mit HIV-Koinfektion getestet, so dass sich seine Spezifität für diese Patientengruppe nicht beurteilen lässt.

Tabelle 3. Sensitivität (%) und Spezifität (%) der serologischen Nachweismethoden bei Syphilis (Larsen et al, 1995 [85], mit Nachtrag)

Test	Sensitivität (%)					Spezifität (%)
	primäre	sekundäre	latente	spätere/ tertiäre	kongenitale [#]	
RPR	55 ³⁶ – 86	100	84 ³⁶ – 98	73	-	98
VDRL	52 ³⁶ – 78	100	81 ³⁶ – 95	71	-	98
MHA-TP	76	100	97	94	-	99
FTA-ABS	84 - 95 ³⁶	100	100	96	-	97
19S-IgM	100 ¹⁵⁴	100 ¹⁵⁴	96 ^{154§}	-	77	99
IgM-ELISA	82	60	53	34	90	100
IgM-SPHA	40 ¹⁵⁴ – 50	50 - 69 ¹⁵⁴	73 ^{154§}	96	-	100 ¹⁵⁵
IgM-ImmB*	97	100	100	98	83	100

-, keine Daten; 19S-IgM, 19S-IgM-FTA-ABS-Test; IgM-ImmB, IgM-Immunoblot; *, 15.5-, 17-, 47-kDa-Antige; #, kongenitale manifeste Syphilis; §, frühe latente Syphilis

1.4.2.3 Serologische Diagnostik der Neurosyphilis

Serological diagnosis of neurosyphilis

Die serologische Diagnostik der Neurosyphilis ist ein wichtiges Verfahren, um die treponemale Invasion des ZNS festzustellen. Der VDRL-Test ist leider für die Neurosyphilis-Diagnostik nicht sensitiv genug und unspezifisch: in 30-70 % der Neurosyphilis-Patienten bleibt der VDRL-Test negativ [161, 91], und ein positiver VDRL-Test bedeutet noch keine ZNS-Infektion, weil IgG aus dem Blut die Blut-Hirn-Schranke passiv durchdringen kann (falsche Positivität). Aus demselben Grund kann auch ein positiver FTA-ABS-Test im Liquor keine eindeutige Aussage geben. Hingegen schließt ein negativer FTA-ABS-Test eine Neurosyphilis aus. Nur der Nachweis von antitreponemalem 19S-IgM im Liquor beweist eindeutig das Vorliegen einer Neurosyphilis. Dieser Test ist aber nicht sensitiv genug.

1.4.2.4 Serologische Diagnostik der Syphilis bei HIV-Koinfektion

Serological diagnosis of syphilis at HIV co-infection

Die serologische Diagnostik der Syphilis wird bei Patienten mit HIV-Koinfektion und bei Patienten ohne HIV in gleicher Weise durchgeführt. Bei klinischem oder anamnestischem Verdacht auf eine Syphilis werden die nichttreponemalen und treponemalen Tests durchgeführt, um falsche Reaktionen auszuschließen, welche auf Grund der polyklonalen B-Zell-Aktivierung bei HIV-infizierten Patienten vorkommen können [65]. Es wurden falsch negative und falsch positive nichttreponemale und treponemale Tests bei HIV-Koinfektion beschrieben (**Tabelle 4**).

Deswegen sollte man sich schon beim Verdacht auf eine Syphilis (ohne sichere Angaben über eine durchgeführte Therapie) und bei einem positiven serologischen Test auch ohne weitere Bestätigung durch Mikroskopie, PCR oder RIT für eine behandlungsbedürftige Syphilis entscheiden und prophylaktisch eine Syphilis-Therapie durchführen [83].

Tabelle 4. Falsche Syphilis-Serologie bei der Patienten mit HIV-Koinfektion (Kuznetsov et al, 2005 [83], modifiziert)

Syphilis-Serologie	Nicht treponemale Tests		Treponemale Tests		
	RPR	VDRL	TPHA	FTA-ABS	19S-IgM
Falsch negativ, %	FB	FB	0,7	FB	10
Falsch positiv, %	1 – 15,3*	10 – 30	-	0,35	B

19S-IgM, 19S-IgM-FTA-ABS-Test; FB, Fallberichte; *, positiver RPR beim negativen FTA-ABS-Test; -, wurde nicht berichtet; B, berichtet

1.4.3 PCR-Diagnostik

Diagnosis by PCR

1.4.3.1 PCR-Methode

PCR methodology

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Saiki et al. 1985 [147]; Mullis et al. 1986 [108]) ist eine Methode der enzymatischen Vervielfältigung von bestimmten Desoxyribonukleinsäure-(DNS)-Abschnitten. Mittels PCR ist es möglich geworden, bestimmte DNS-Fragmente in biologischem Material zu identifizieren, was die diagnostischen und methodischen Möglichkeiten der modernen Medizin und der Biowissenschaft wesentlich erweitert hat. In Anerkennung der Bedeutung der PCR-Erfindung erhielt Kary Banks Mullis, USA, im Jahr 1993 den Nobelpreis für Chemie [12].

Ursprünglich bediente man sich zur Verlängerung eines DNS-Fragments des temperaturempfindlichen Klenow-Fragmentes der DNS-Polymerase-I von *Escherichia coli*, das beim Denaturierungsschritt inaktiviert wurde und so immer eine neue Zugabe von Polymerase erforderte [113]. Dieses Verfahren ließ die DNS-Synthese nicht automatisieren und ermöglichte nur die Verlängerung kleiner DNS-Abschnitten (< 200 bp). Das zweite ursprüngliche DNS-Nachweisverfahren basierte auf der DNS-Hybridisierung, wobei die aus dem Biomaterial isolierte DNS mittels markierter komplementärer DNS-Sonden sichtbar gemacht wurde [148].

Die automatisierte PCR wurde durch den Einsatz der hitzestabilen bakteriellen *Taq*-DNS-Polymerase aus *Thermus aquaticus* und die Herstellung von Geräten für die Steuerung der Temperaturabläufe ermöglicht [113]. Dieses Verfahren ermöglichte den automatisierten Nachweis von Bakterien-, Viren-, Pilz-, Protozoen-, Eukarioten-DNS, als auch den Nachweis von Gen-Mutationen und -Polymorphismen.

Die PCR ist eine enzymatische Synthese (Amplifikation) eines bestimmten DNS-Fragments anhand einer vorhandenen DNS-Matrize (Template). Durch zyklische Veränderungen der Temperatur, initiieren gegenläufig orientierte Oligonukleotide (Primer) die Amplifikation. Die Primer sind je einen Template-Strang komplementär und definieren so das zu amplifizierende Fragment. Eine DNS-Polymerase synthetisiert anhand des Einzelstranges der denaturierten DNS-Matrize in der Anwesenheit von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) und Primern einen neuen zur DNS-Matrize komplementären DNS-Strang. Da auch der bereits synthetisierte Strang als Matrize dient findet eine exponentielle Vermehrung des DNS-Fragmentes statt. Am Ende der Amplifikation entstehen 10^4 - 10^7 DNS-Kopien (Amplikons), die sich mittels Gel-Elektrophorese auftrennen und durch Färbung oder DNS-

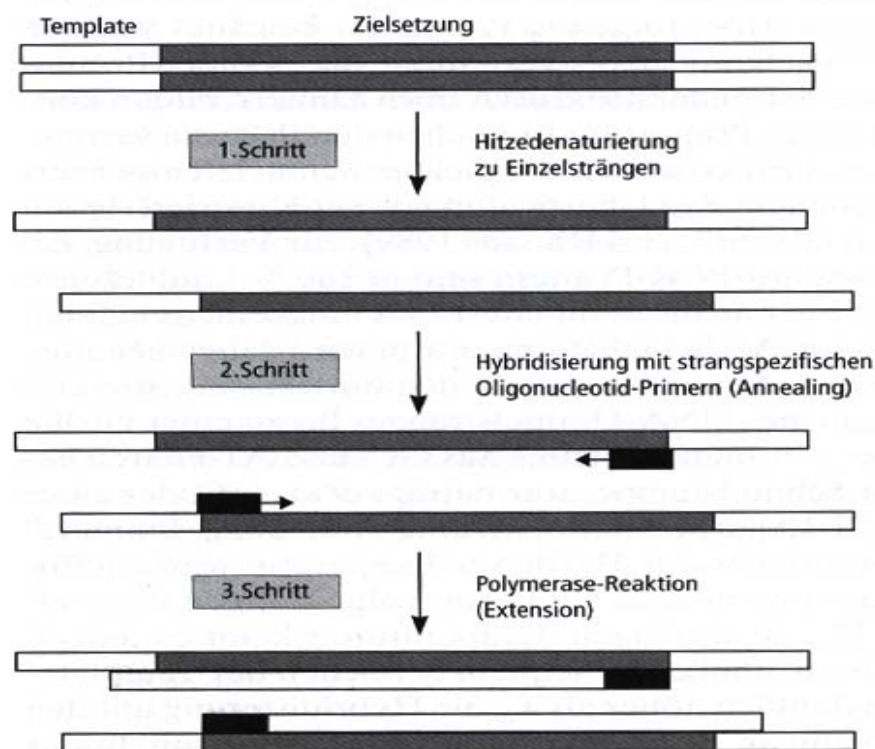
Hybridisierung identifizieren lassen. Die Kopienzahl der PCR-Fragmente in der PCR wird durch folgende Formel berechnet [113]:

$(2^n - 2n)x$; n, Anzahl der Zyklen; 2n, Produkte des ersten und zweiten Zyklus, deren Länge nicht definiert ist; x, Anzahl der Kopien der ursprünglichen DNS-Matrize.

Jeder Zyklus besteht aus drei nacheinander folgenden Schritten (**Abbildung 6**) [113, 68]:

1. Denaturierung – durch Erhitzen der doppelsträngigen Template-DNS (dsDNS) auf etwa 3 °C über den Schmelzpunkt der dsDNS (strand-separation temperature, T_{ss} ; gewöhnlich: 95 - 97 °C) erfolgt die Aufspaltung in deren Einzelstränge.
2. Annealing – bei einer bestimmter Temperatur (ca. 5 °C unter der Schmelztemperatur (T_m) der Primer, gewöhnlich 55 – 80 °C) erfolgt die Anlagerung der Primer an die jeweils komplementären Abschnitte der DNS-Matrize, wodurch der Startbereich für die DNS-Polymerase definiert wird.
3. Elongation – ausgehend vom 3'-Ende des Primers synthetisiert die DNS-Polymerase bei 72 °C anhand des Templates einen neuen komplementären DNS-Strang.

Abbildung 6. Schematische Darstellung des PCR-Ablaufs (Bangsow et al, 2002 [5])



Es werden normalerweise 25 - 40 PCR-Zyklen abhängig von der vermuteten Menge der Template-DNS durchgeführt. Eine Zyklenzahl unter 25 Zyklen kann zu falsch negativen

Resultaten führen, da wenige amplifizierte DNS-Kopien bei der Visualisierung unter der Nachweisgrenze bleiben können. Eine Zyklenzahl über 40 Zyklen kann dagegen durch falsche Primer-Bindungen (Mispriming) zur Entstehung von nicht spezifischer Amplifikation und somit zu falsch positiven Ergebnissen führen. Durch Optimierung der PCR kann die Spezifität und Sensitivität der Methode wesentlich erhöht werden [113, 68].

1.4.3.2 PCR-Diagnostik der Syphilis

PCR diagnosis of syphilis

Die PCR-Methode wird bei der Untersuchung des *T. pallidum*-Genoms (Amplifizierung, Klonierung, Sequenzierung), der Pathogenese der Syphilis (Verteilung von *T. pallidum* in Geweben, Überleben von *T. pallidum*), sowie für die Diagnostik eingesetzt.

Das *T. pallidum*-Genom ist stabil und weist wenig Genpolymorphismen auf, unter anderem einzelne Mutationen und Varianten im *tpr*- [133, 23] und *arp*-Gen [130]. Deshalb ist das PCR-Nachweisverfahren geeignet zum Nachweis einer *T. pallidum*-Infektion. Außerdem werden Punktmutationen mittels des routinemäßig durchgeführten PCR-Nachweises nicht detektiert.

Mit der PCR-Methode lassen sich Syphilis- (*T. pallidum* subsp. *pallidum*) und Frambösie-Erreger (*T. pallidum* subsp. *pertenue*) nicht differenzieren [119], da sie sich nur in einer einzelnen Aminosäure-Sequenzen unterscheiden [116]. Es ist nicht bekannt, auf welche Weise solche genetisch homologen Mikroorganismen zwei unterschiedliche Krankheiten auslösen [121]. Die Syphilis und Frambösie unterscheiden sich epidemiologisch und klinisch, deswegen ist die PCR für die Diagnostik beider Erkrankungen dennoch verwertbar.

In der ersten publizierten Studie über die PCR-Anwendung in der Syphilis-Diagnostik wurden 1990 von Philip E. Hay et al. [59, 60] zwei Gen-Fragmente von *tmpA* und *tpfI* mittels PCR, nested-PCR und DNS-Hybridisierung in 52,6 % (10/19) Liquor-Proben von Patienten mit positiver Syphilis-Serologie im Serum nachgewiesen. Die Spezifität der PCR-Diagnostik aus Liquor betrug 96,7 % (29/30) und die Ursache der nicht hundertprozentigen Spezifität der PCR-Diagnostik wurde nicht erläutert.

Es wurden insgesamt acht unterschiedliche Gene von *T. pallidum* für den PCR-Nachweis eingesetzt (**Tabelle 5**). Dabei lag die PCR-Sensitivität zwischen 10^{-3} Treponema-Äquivalent/ Probe (gerechnet nach Amplikon-Molekularmasse) [20] und 800 Treponemen/ Probe [126], in meisten Fällen 10 Treponemen/ Probe (**Tabelle 6**). *T. pallidum*-DNS wurde in verschiedenen Patienten-Materialien nachgewiesen, sowohl in flüssigen Proben – Vollblut, Serum, Liquor,

amniotischer Flüssigkeit, als auch in Geweben – Biopsaten von Hautläsionen (primäres, sekundäres, tertiäres Stadium), Plazenta, Hirn, Aorta und Magenschleimhaut.

Tabelle 5. Zielgene für die PCR-Diagnostik der Syphilis

Gen	Peptide	Funktion
1. <i>tmpA</i> (<i>treponema membrane protein A</i>) ⁵⁷	TpN44.5a; TmpA	Membranassoziiertes Lipoprotein, Signalpeptid, M _r = 42 kDa ¹²¹
2. <i>tpf1</i> (<i>treponema pallidum f1</i>) ¹⁶	TpN19; 4D	oberflächliches Polysaccharid und Lipopolysaccharid der Zellhülle, Kationentransporter, Immunogen, M _r = 190 kDa ¹²¹
3. <i>tpp47</i> (47-kDa <i>treponema pallidum protein</i> ; <i>main membrane immunogen gene</i>) ⁶⁷	TpN47	Hautmembranprotein (major membrane protein), Lipoprotein, hoch immunogen, aktiviert Endotelzellen, M _r = 47 kDa ¹²¹
4. <i>bmp</i> (<i>basic membrane protein</i>) ³²	TpN39(b)	Basisches Membranprotein, Signalpeptid, M _r = 38 kDa ¹²¹
5. 16s rRNA	-	Herstellung von 16S rRNA ²¹ für Translation an Ribosomen
6. <i>polA</i> (<i>polymerase A</i>) ¹⁴³	PolA	DNA-Polymerase I für die DNS-Synthese, -Reparatur, M _r = 112 kDa ¹²¹
7. <i>arp</i> (<i>acidic repeat protein</i>) ¹³⁰	Arp	unbekannte Funktion
8. <i>tpr*</i> (<i>treponema pallidum repeat</i>) ⁴⁷	Tpr	Membranassoziierte Proteine, Signal-, Transportproteine, Immunogene ¹²⁰

* es gibt 12 *tpr*-Gene (*tprA* – *tprL*), die 12 Tpr-Proteine kodieren

Die diagnostische PCR-Sensitivität lag dabei mit 13 bis 95 % sehr unterschiedlich und war vom Syphilis-Stadium, der Syphilis-Form (angeborene/ erworbene), dem verwendeten Untersuchungsmaterial und von zusätzlicher Benutzung von DNS-Hybridisierung oder Sequenzierung abhängig. Die Spezifität der PCR wurde selten ermittelt und lag bei 90 % [102], 96,7 % [59], oder bei 100 % [14, 50, 151].

Tabelle 6. Publierte Studien des *T. pallidum*-Nachweises mittels PCR

Erstauthor, Jahr	<i>T. pallidum</i> -Gen	Material	PCR-Sensitivität, <i>T. pallidum</i> / Probe	Diagnostische PCR-Sensitivität, % (n/n)	PCR-Spezifität, % (n/n)
Syphilis-Inkubation					
Marfin, 2001 ⁹⁶	<i>polA, arp, tpr</i>	VB	nd	42,9 (3/7)	nd
Primäre Syphilis					
Jethwa, 1995 ⁷⁶	<i>tpp47</i>	Abstr	10, 100	89,7 (26/29)	nd
Orle, 1996 ¹²⁴	<i>tpp47, bmp</i>	Abstr	10	91,5 (75/82)*	nd
Bruisten, 2001 ¹⁴	<i>bmp</i>	Abstr	1	75 (12/16)	100 (348/348)
Sutton, 2001 ¹⁶⁸	<i>polA, arp, tpr</i>	Abstr ^{LI, LII}	nd	93,2 (41/44)	nd
Liu, 2001 ⁸⁸	<i>polA</i>	Abstr	10 ^a , 2 ^b	81,5 (22/27)	nd
Marfin, 2001 ⁹⁶	<i>polA, arp, tpr</i>	VB	nd	14,3 (1/7)	nd
Palmer, 2003 ¹²⁶	<i>tpp47</i>	Abstr	800 ^c	94,7 (18/19)	nd
Sekundäre Syphilis					
Zoechling, 1997 ¹⁸⁹	<i>tpp47</i>	Haut ^d	nd	66,7 (4/6)	nd
Palmer, 2003 ¹²⁶	<i>tpp47</i>	Abstr	800 ^c	80 (8/10)	nd
Wenhai, 2004 ¹⁸²	<i>tpp47</i>	Haut ^d	nd	41,7 (10/24)	nd
Latente Syphilis					
Marfin, 2001 ⁹⁶	<i>polA, arp, tpr</i>	VB	nd	61,5 (8/13)	nd
Tertiäre Syphilis					
Zoechling, 1997 ¹⁸⁹	<i>tpp47</i>	Haut ^d	nd	14,2 (1/7)	nd
Neurosyphilis					
Hay, 1990 ^{59, 60}	<i>tppA, tpf1</i>	Liq ^{HIV}	65	52,6 (10/19)	96,7 (29/30)
Noordhoek, 1991 ¹¹⁷	<i>bmp</i>	Liq	1,6 ^c	25,9 (7/27)	nd
		Liq ^{M-NS}		45,5 (5/11)	
		Liq ^{Lat-NS}		12,5 (2/16)	
		Liq ^{Chr}		0 (0/4)	

Tabelle 6. Fortsetzung					
Erstauthor, Jahr	<i>T. pallidum</i> -Gen	Material	PCR-Sensitivität, <i>T. pallidum</i> / Probe	Diagnostische PCR-Sensitivität, % (n/n)	PCR-Spezifität, % (n/n)
Neurosyphilis					
Chung, 1994 ²⁵	<i>tpp47</i>	Liq ^{LI, LII}	10 ^a , 1 ^e	25 (4/16)	nd
		Liq ^{Lat}		40 (4/10)	
Moskophidis, 1995 ¹⁰⁶	<i>tpp47</i>	Liq	10	60 (6/10)	nd
Kongenitale Syphilis					
Grimprel, 1991 ⁵⁰	<i>tpp47</i>	AF	10	81,8 (9/11)	100 (5/5)
		Liq		25 (5/20)	100 (16/16)
		Se		45 (9/20)	nd
Sanchez, 1993 ¹⁵¹	<i>tpp47</i>	Liq	10	26,3 (5/19)	100 (12/12)
		Se		42,1 (8/19)	nd
		Se ^{M-KS}		85,7 (6/7)	
		Se ^{Lat-KS}		16,7 (2/12)	
Michelow, 2002 ¹⁰²	<i>tpp47</i>	Blut/Serum [#]	10	94 (16/17)	90 (53/59)
		Liq		65 (11/17)	97 (57/59)
Parenchymatöse Syphilis					
Genest, 1996 ⁴⁸	<i>tpp47</i>	Plazenta	nd	100 (4/4)*	nd

Abstr, Abstrich; AF, amniotische Flüssigkeit, Liq, Liquor; Haut, Hautbiopsie; Se, Serum; nd, nicht durchgeführt; VB, Vollblut; Haut, Hautbiopsat; *, vermutlich (nicht kontrolliert); #, nicht differenziert;

^{Chr}, chronisch; ^{HIV}, HIV-Koinfektion; ^{Ink}, Inkubation; ^{LI}, Lues I; ^{LII}, Lues II; ^{Lat}, latente Lues; ^{Lat-KS}, latente kongenitale Syphilis; ^{Lat-NS}, latente Neurosyphilis; ^{M-KS}, manifeste kongenitale Syphilis; ^{M-NS}, manifeste Neurosyphilis;

^a, nachgewiesen mittels Gel-Elektrophorese; ^b, nachgewiesen mittels Sequenzer; ^c, *T. pallidum*-Äquivalent, gerechnet nach der DNS-Masse; ^e, nachgewiesen mittels Hybridisierung; ^d, nachgewiesen aus Paraffinblöcken;

Die diagnostische PCR-Sensitivität kann sich verringern, wenn die Proben bei der Raumtemperatur aufbewahrt werden, wie es z.B. in einer Studie mit Abstrichproben und 90-tägigem Aufbewahren belegt wurde [184]. Die im Tris/EDTA aufbewahrten Hautbiopsien verlieren dagegen nicht die Nachweisbarkeit von *T. pallidum*-DNS [184]. In einer anderen

Studie konnte gezeigt werden, dass das dreifache Auftauen von Liquor-Proben zu keinen Sensitivitätsminderung führt [177]. Trotz allem ist bei dem Aufbewahren Proben für die PCR-Diagnostik eine konsequente kühle Lagerung geboten.

Um die PCR-Sensitivität zu erhöhen schlugen Centurion-Lara et al. (1997) [20] ein Verfahren mittels Reverse Transcriptase (RT)-PCR (RNS-PCR) vor. Dabei wurde 16S rRNS aus der Zelle isoliert, in cDNS umgeschrieben und dann als PCR-Template eingesetzt. Das Amplikon wurde weiter durch Southern blotting und DNS-Hybridisierung spezifiziert. Die Sensitivität der 16S rRNS-PCR wurde mit der *tpp47*-(DNS)-PCR verglichen. Sie zeigte eine höhere Sensitivität als die DNS-PCR, wie durch Grenzverdünnungsversuche nachgewiesen wurde:

	16S rRNS-PCR	<i>tpp47</i> -PCR
	<i>T. pallidum</i> /Probe	
RNS/DNS-Isolierung, dann Verdünnung:	10^{-3}	10
<i>T. pallidum</i> -Verdünnung, dann RNS/DNS-Isolierung:	1	10

Die 16S rRNS-PCR weist nur lebendige Mikroorganismen nach, da die RNS nach dem Zelltod nur eine kurze Zeit intakt ist und durch RNasen sehr schnell abgebaut wird [113]. Die Autoren untersuchten auch Liquor-Proben von Neurosyphilis-Patienten und fanden heraus, dass die Sensitivität der RNS-PCR dabei 10^{-2} *T. pallidum*-Äquivalent/ Probe war.

Auf die Frage, wie lange *T. pallidum*-DNS im Gewebe persistieren kann, gaben Wicher et al. (1998) [183] eine Antwort. Die zuvor abgetöteten, in Kaninchen injizierten Treponemen waren mittels PCR im Gewebe bis zum 30. Tag nach Injektion nachweisbar. Durch diese Studie wurde zum ersten Mal die Dauer der *T. pallidum*-DNS-Persistenz ermittelt, was besonders bei der Interpretation des diagnostischen PCR-Einsatzes nach der Behandlung zur Kontrolle des Therapieerfolges wichtig ist.

Die systematische Übersicht der Ergebnisse von publizierten Studien bezüglich der PCR-Diagnostik der Syphilis ist in der **Tabelle 6** dargestellt. Aus dieser Übersicht geht hervor, dass es noch andere diagnostisch interessante Patienten-Materialien gibt, wie z.B. zelluläre Blutfraktionen, Lymphknoten-Punktat und Samenflüssigkeit, die einfach zu gewinnen sind und die mittels PCR noch nicht untersucht wurden. Welche Blutfraktionen besitzen die höchste diagnostische Sensitivität? Beherbergt der entzündliche Rachen bei syphilitischer Angina an der Schleimhautoberfläche die Treponemen? Die Antworten auf diese Fragen sollte in dieser Arbeit erläutert werden.

1.5 Problemstellung

Aim of the study

In dieser Arbeit sollte ein Nachweisverfahren mittels nested-PCR und DNS-Hybridisierung für das 47-kDa *treponema pallidum protein gene (tpp47)* des Syphilis-Erregers etabliert und auf verschiedenen Proben von Patienten mit manifester und latenter Syphilis getestet sowie serologisch kontrolliert werden. Die Proben von Patienten mit diagnostizierter Syphilis sollten umfassen: Serum, läsionale Hautbiosien (bei manifester Syphilis), Abstriche von nässenden Hautläsionen und vom Rachen, und zum ersten Mal die Fraktion der peripheren mononukleäre Blutzellen (PBMC), Granulozyten, Lymphknoten-Punktate und Ejakulate. Es sollte festgestellt werden, welches Proben-Ausgangsmaterial die höchste diagnostische Sensitivität ermöglicht. Der Einfluss von unterschiedlichen Isolierungsverfahren (Zentrifugationsgeschwindigkeiten) bei der Gewinnung von PBMC hinsichtlich der diagnostischen Sensitivität der PCR sollte untersucht werden. Weiterhin sollte der Einfluss der Probenmenge auf die diagnostische PCR-Sensitivität getestet werden.

Die *tpp47*-PCR und DNS-Hybridisierung sollten für Patienten nach ausreichender Therapie einer manifesten oder latenten Syphilis und Neurosyphilis mit noch positiven serologischen Testsergebnissen im Blut und/oder in der zerebrospinalen Flüssigkeit eingesetzt werden, um den Therapieerfolg zu überprüfen.

Weiterhin sollte die *tpp47*-PCR für die Syphilis-Diagnostik bei Patienten mit Verdacht auf eine Infektion bei nicht eindeutiger Syphilis-Serologie angewendet werden.

Diese Arbeit sollte ein molekularbiologisches diagnostisches Vorgehen etablieren, welches in unklaren klinischen Syphilis-Fällen eine eindeutige diagnostische Aussage bei maximaler diagnostischer Sensitivität ermöglicht.

II. MATERIAL UND METHODEN

MATERIALS & METHODS

2.1 Material

Materials

2.1.1 Geräte

Technical devices

Elektrophorese Spannungsgerät 3000XI	Biorad, München
Gelkammer groß, Protean II XI 16/18 cm x 20 cm	Biorad, München
Gelkammer klein, Mini Mighty small	Hoefer, San Francisco, USA
Heizblock, Thermomixer 5436	Eppendorf Netheler, Hinz GmbH, Hamburg
Lichtmikroskop	Olympus, Hamburg
Neubauer-Zellkamer	Assistent, München
PCR-Gerät, GeneAmp 9700	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Rotationsschüttler	Desaga, Wiesloch
Sterilwerkbank, LaminAir HB 2472	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge, 5415C	Eppendorf AG, Hamburg
UV-Transilluminator, Gel Doc 2000™	Biorad, München
Vortex, Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Zentrifuge, Sorvall RC-5B Superspeed	Du Pont Instruments, Leipzig

2.1.2 Arbeitsmaterial

Working materials

Einfrierröhrchen, 2 ml	Nunc, Roskilde, Dänemark
Kanüle, 20 G, ½", Nr 1	Becton Dickinson, Fraga, Spanien
3 MM-Filterpapier	Whatman Paper Ltd., Maidstone, UK
Nylonmembranen (positiv geladen)	Boehringer, Mannheim
PCR-Reaktionsgefäß, 0.2 ml	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Pipetten, sterile	Stone, Staffs, UK
Reaktionsgefäße 1.5 ml, 2.0 ml	Eppendorf, Hamburg
EDTA-Blutröhrchen, 9 ml (S-Monovette)	Sarstedt AG & Co, Nürnberg
Objektträgerschalen mit Vertiefungen (14 mm)	Kartell, Noviglio, Italien
Röhrchen, Falcon 2070, 50 ml	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Röhrchen, Falcon 2096, 15 ml	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Röntgenfilm X-OMAT AR-5	Kodak, Rochester, USA
Sephadex G50-Säulen	Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg

Arbeitsmaterial, Fortsetzung:

Serum-Röhrchen, 4,7 ml (S-Monovette)	Sarstedt AG & Co, Nürnberg
Spritzen, 20 ml, 0,9 x 40 mm	Becton Dickinson, Fraga, Spanien
Tupfer, PS-Abstrichbesteck, steril, 16,0 / 110 mm	Greiner bio-one, Frickenhaus

2.1.3 Chemikalien und Enzyme*Chemicals & enzymes*

[γ - ³² P]-Adenosin-5'-triphosphat (3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic, Braunschweig
Agarose ultrapure	Gibco BRL/ Invitrogen, Karlsruhe
Chlorwasserstoff (HCl)	Merk, Darmstadt
Desoxyribonuclease I (DNase I)	Boehringer Mannheim, Mannheim
Dithiothreitol (DTT)	Boehringer Ingelheim, Buchs, Schweiz
DNAzol BD Reagent	Gibco BRL, Rockville, USA
DNS-Marker (PhiX174 DNA- <i>Hae</i> III Digest)	Sigma, München
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ficoll 400	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
FTA-ABS-Test	BAG, Biologische Analysesystem GmbH, Lich
Glykogen, molecular biology grade	Boehringer, Mannheim
Isopropanol	Sigma, München
Kinase-Puffer, 10x	Promega GmbH, Mannheim
Lachssperma DNA	Sigma, München
Magnesiumchlorid, 25 mM	Promega GmbH, Mannheim
Natriumhydroxid	Merk, Darmstadt
Orange G	Sigma, München
phosphat buffered saline (PBS)	Apotheke, Klinikum Innenstadt, LMU München
Polymorphprep	Axis-Shield AS, Oslo, Norwegen
Polynucleotid-Kinase-Puffer	Boehringer, Mannheim
Polyvinylpyrolidon	Merk, Darmstadt
Rinderserumalbumin (BSA)-Lösung	Sigma, München
Scandicain Lösung, 1 %	AstraZeneca GmbH, Wedel
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, München
Sodiumchlorid/Sodiumcitrat-Lösung (SSC)	Sigma, München

Chemikalien und Enzyme, Fortsetzung:

Taq-DNA-Polymerase, 100 U (5 U/ μ l)	Promega GmbH, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase 10 x Buffer, Magnesium frei	Promega GmbH, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase Puffer	Promega GmbH, Mannheim
TPHA-Test	BAG, Biologische Analysesystem GmbH, Lich
Tris	Sigma, München
Tris-Borat-EDTA (TBE)-Lösung, 10 x	Gibco BRL/ Invitrogen, Karlsruhe
Tris-HCl	Sigma, München
Trypan blue	Sigma, München
T4-Polynukleotid-Kinase	Boehringer, Mannheim
VDRL-Test	Dade Behring Marburg GmbH, Marburg

2.1.4 Lösungen*Solutions*

Orange G-Ansatzlösung:	0,05 g Orange G 1,5 g Ficoll 400 Wasser ad 10 ml
Kinase-Puffer:	0,5 M Tris-HCl (pH 9,5) 0,1 M MgCl ₂ 50 mM DTT
Kinasierung-Lösung (50 μ l) auf Eis:	1,0 μ l Oligonukleotid Trep-Hyb (10 pmol) 10,0 μ l 10 x Kinase-Puffer 5,0 μ l [γ - ³² P]-ATP (40 pmol) 2,0 μ l T4-Polynucleotid-Kinase (2 U) 32,0 μ l Aqua destillata
Denhardt's Reagenz, 100 x:	2 % Ficoll 400 2 % Polyvinylpyrrolidon 2 % Rinderserumalbumin (BSA)-Lösung

Lösungen, Fortsetzung:

Hybridisierungslösung:	5 x SSC 5 x Denhardt's Reagenz 0,1 % SDS
Waschlösung:	6 x SSC

2.1.5 Nukleotide*Nucleotides*Primer für *T. pallidum* (*tpp47*)-PCR:

Tp-336

Tp-714

Tp-370

Tp-563

Trep-Hyb

Primer für β -Actin-PCR:

Actin-1

Actin-2

Sequenz (5' - 3'):

CAGCAGGGGAAGAAAAAAGTGGG

AAGGTCGTGCGGGCTCTCCAT

GACCCAAGCGTTACTAAGATGG

ACCGCAACTGGGACAACTTCAT

GCAGTAGCGTTGGCGGATC

Sequenz (5' - 3'):

GAGCGGGAAATCGTGCGTGACATT

AGACAGTCTCCACTCACCCAGGAA

Hersteller: MWG-Biotech, Ebersberg

2.2 Patientenkollektiv und -proben

Patients & samples

2.2.1. Patienten

Patients

Es wurde Proben von den 37 Patienten mit dem Verdacht auf manifeste oder latente Syphilis vor Therapie, als auch nach Behandlung in die Untersuchung eingeschlossen. Es wurde drei Patientengruppen gebildet:

- Gruppe A (n = 15), Patienten mit klinischem oder serologischem Verdacht auf manifeste oder latente Syphilis;
- Gruppe B (n = 10), Patienten nach ausreichender Behandlung einer manifesten oder latenten Syphilis vor 1 - 24 Monaten und mit positivem 19S-IgM-FTA-ABS-Test;
- Gruppe C (n = 12), Patienten nach Behandlung einer Neurosyphilis vor 3 - 7 Jahren und mit positiver Syphilis-Serologie im Blut und Liquor.

2.2.2 Proben

Samples

Bei allen Patienten erfolgte die Materialgewinnung im Rahmen der Untersuchung zum Zweck einer besseren Diagnostik einer Syphilis-Infektion. Jeder Patient wurde über den Zweck der Untersuchung aufgeklärt und gab ein Einverständnis hinzu.

Die Proben der Patienten aus der Gruppe A und B wurden in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München gesammelt. Die Proben der Patienten der Gruppe C stammen aus dem Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie (Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Bettina Wilske) der LMU München.

Bei den Patienten, die in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie aufgenommen wurden, sind die klinisch-anamnestischen Daten ausführlich erhoben worden. Bei den Patienten, deren Proben aus dem Max von Pettenkofer-Institut erhalten wurden, sind die klinisch-anamnestischen Daten begrenzt vorhanden.

Bei allen Patienten außer der Gruppe C wurde das Serum gewonnen, um serologische Untersuchungen für Syphilis-Diagnostik durchzuführen. Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen der Patienten der Gruppe C, als auch deren Seren wurden uns von dem Max von Pettenkofer-Institut übergeben.

Die Proben, die bei den Patienten gewonnen wurden, um PCR-Diagnostik durchzuführen sind in die **Tabelle 7** dargestellt.

Tabelle 7. Patienten-Proben für *T. pallidum*-PCR

Gruppe	Proben von allen Patienten	Proben vom Teil der Patienten	Verdacht auf Syphilis-Stadium
A	<ul style="list-style-type: none"> - Serum - Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) - Granulozyten - Rachenabstrich 	<ul style="list-style-type: none"> - Lymphknoten-Punktat (n = 4) - Ejakulat (n = 4) - Hautbiopsien (n = 4) - Abstriche von nässenden Läsionen (n = 2) 	<ul style="list-style-type: none"> - sekundäre (n = 2) - latente (n = 2) - primäre (n = 1) - sekundäre (n = 2) - latente (n = 1) - sekundäre - primäre
B	<ul style="list-style-type: none"> - Serum 		
C	<ul style="list-style-type: none"> - Serum - Liquor 		

2.3 Methoden

Methods

2.3.1 Materialgewinnung

Collection of samples

2.3.1.1 Blut

Blood

Blutproben wurden durch Punktion der Antekubitalvene in einem 7,5-ml Serum-Röhrchen für serologische und PCR-Diagnostik der Syphilis und in zehn 5-ml EDTA-Röhrchen für PCR-Untersuchungen gewonnen. Diese Proben wurden im Laufe einer Stunde nach der Gewinnung bearbeitet.

Serum

Für serologischen und PCR-Untersuchungen des Blutserums wurden das Serumröhrchen bei Raumtemperatur (RT) gelassen, um Gerinnungsblut zu bekommen. Dann wurden die Blutröhrchen mit Geschwindigkeit von 350 g, 15 min bei RT abzentrifugiert, in 0,5 ml aliquotiert und untersucht. Wenn die Untersuchungen nicht am selben Tag stattfinden konnten, wurde das Serum bei -20 °C eingefroren.

Serumproben aus dem Max von Pettenkofer-Institut wurden bei -20 °C bis zur Untersuchung aufbewahrt.

PBMC

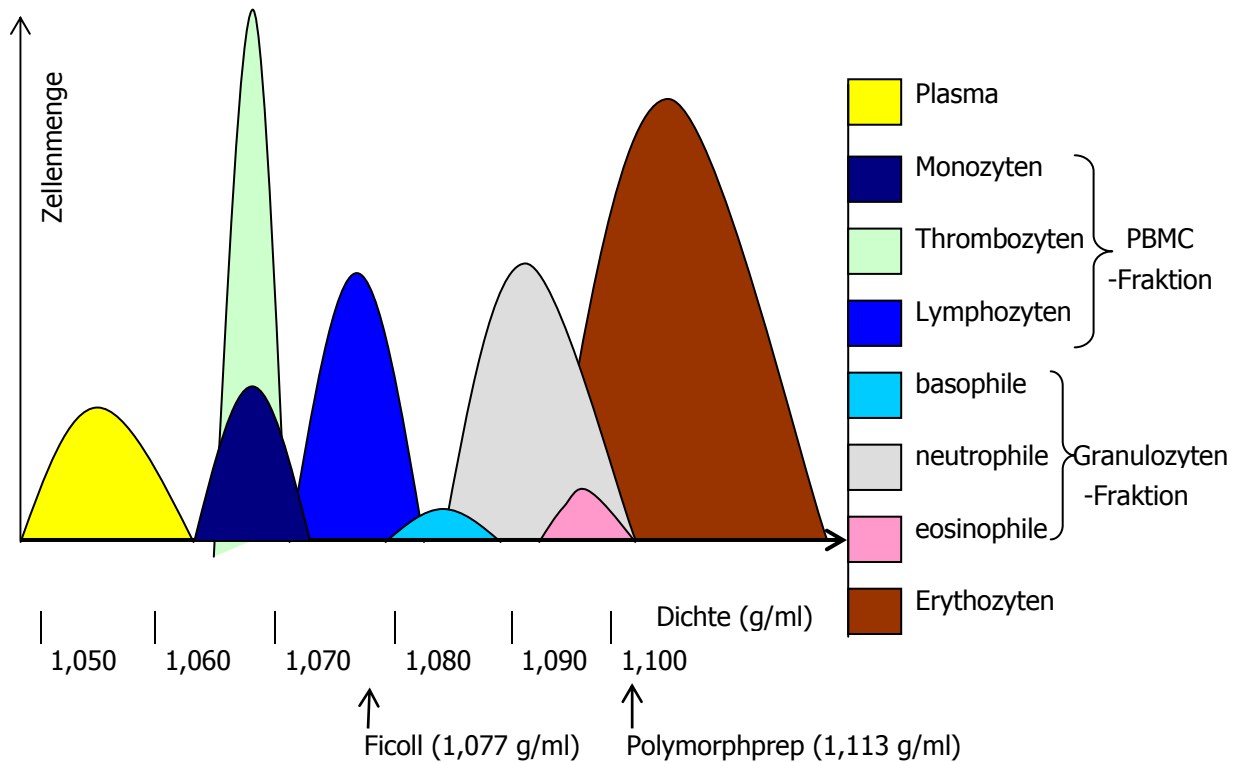
Für PCR-Untersuchungen wurden die Blutzellfraktionen, periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC-Fraktion: Monozyten, Thrombozyten, Lymphozyten) und Granulozyten (Basophile, Neutrophile und Eosinophile) im Laufe einer Stunde nach der Blutentnahme isoliert und bei -20 °C eingefroren. Die Dichten der flüssigen und zellulären Blutanteile und der separierenden Lösungen (Ficoll und Polymorphprep) sind in der **Abbildung 7** dargestellt.

50 ml EDTA-Vollblut wurde mit PBS (10 mM, pH 7.4) 1:1 gemischt. Jeweils 30 ml EDTA-Vollblut-PBS wurde in 50 ml Falconröhrchen über 15 ml Ficoll ($\rho = 1,077 \text{ g/ml}$) geschichtet und dann für 30 min bei 800 g, RT, abzentrifugiert [27]. Durch die Zentrifugation bildeten sich vier Schichten: die obere Phase war PBS-verdünntes Plasma, die obere Interphase bestand aus der PBMC-Fraktion (Monozyten, Thrombozyten, Lymphozyten) (**Abbildung 8**), die untere Interphase aus Ficoll und untere Phase (Pellet) aus den sedimentierten Granulozyten und Erythrozyten. Das PBS-verdünnte Plasma wurde entfernt. Die untere Phase (Granulozyten-Erythrozyten) wurde für die Gewinnung von Granulozyten benutzt.

Die obere Interphase (PBMC) wurde vorsichtig mit der 10 ml Pipette in anderes Röhrchen übertragen und die Zellen wurden gezählt. Dafür wurde die PBMC-Fraktion 1:10 mit PBS

verdünnt, 1:10 mit Trypan blue gemischt, in einer Neubauer-Zellkammer ausgezählt. Nach der Zellzählung wurden die PBMC-Fraktion für die weitere Verarbeitung auf die Konzentration von 2×10^7 PBMC pro ml eingestellt.

Abbildung 7. Schema der Dichten der humanen Blutzellen (www.axis-shield.com [225], modifiziert)



Die aliquotierte PBMC-Fraktion wurde mit zwei Geschwindigkeiten, Niedriggeschwindigkeitszentrifugation von 500 g (low speed centrifugation, LSC), 30 min bei RT, und Hochgeschwindigkeitszentrifugation von 15000 g (high speed centrifugation, HSC), 30 min bei RT, abzentrifugiert. Bei der Niedriggeschwindigkeitszentrifugation (LSC) entstehen der PBMC-Überstand (low speed centrifugation-supernatant, LSC-S) und das PBMC-Sediment (low speed centrifugation-pellet, LSC-P). Bei der Hochgeschwindigkeitszentrifugation (HSC) entstehen entsprechend high speed centrifugation-supernatant (HSC-S) und high speed centrifugation-pellet (HSC-P).

Die Treponemen können sich sowohl frei im Blutplasma, als auch intrazellulär oder zelladhäsiv befinden. Bei Niedriggeschwindigkeitszentrifugation (LSC) werden die intrazellulären/ zelladhäsiven Treponemen mit der Zellfraktion abzentrifugiert. Die freiliegenden Treponemen bleiben im Überstand. Die Hochgeschwindigkeitszentrifugation (HSC) sedimentiert dagegen alle Treponemen, so dass der Überstand keine Treponemen enthält (**Abbildung 7**). Mit diesen zwei unterschiedlichen Zentrifugationen sollte untersucht

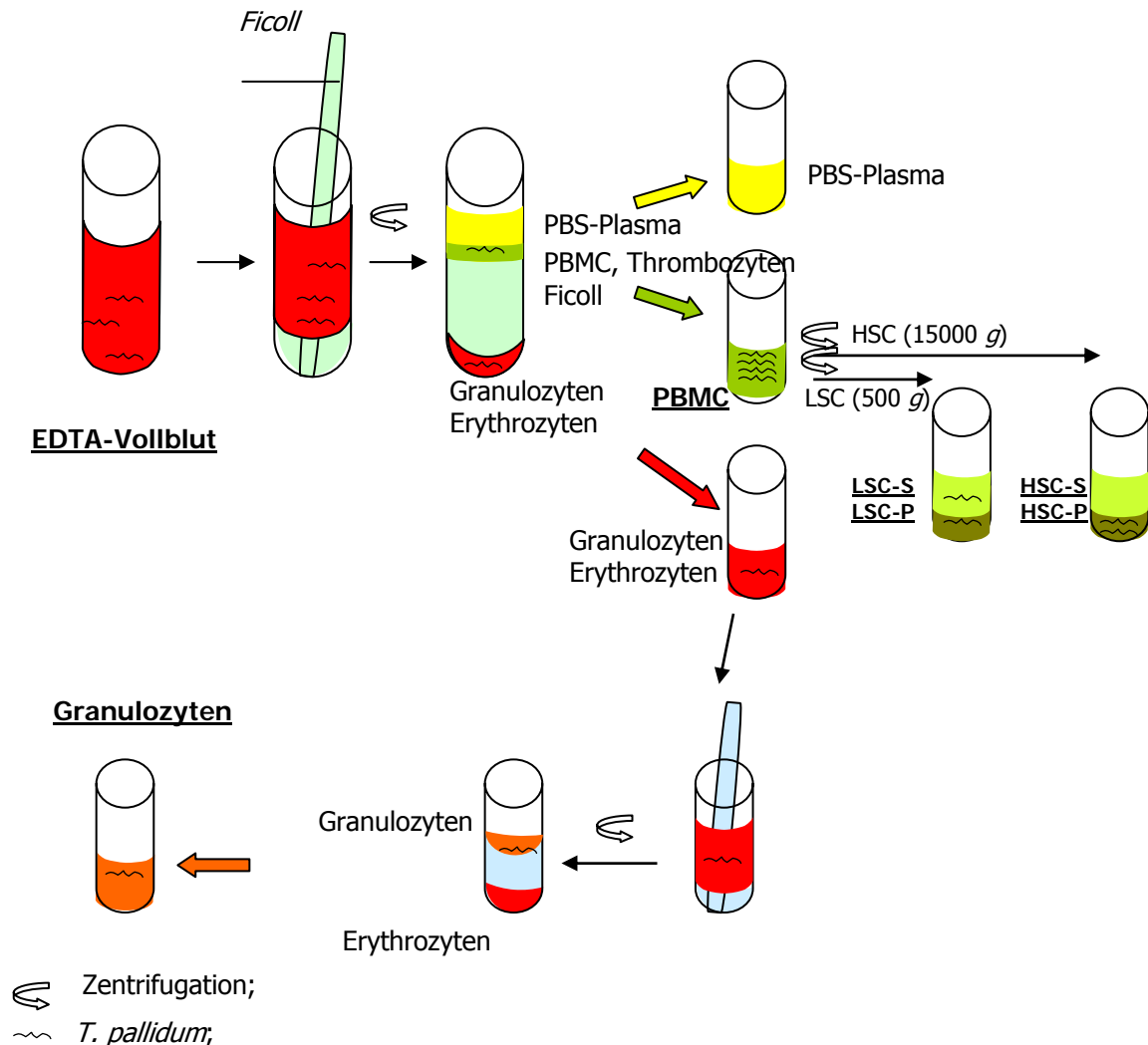
werden, ob die unterschiedliche Zentrifugationsgeschwindigkeiten die diagnostische PCR-Sensitivität bewirken können.

Granulozyten

Die Granulozyten wurden aus dem bei Ficoll-Separation gebildeten Pellet (Granulozyten-Erythrozyten) mittels Polymorphprep ($\rho = 1,113 \text{ g/ml}$) isoliert [41] (**Abbildung 8**).

Da *T. pallidum* sich bei einer Dichte von $1,051 \text{ g/ml}$ konzentriert [56], ist zu erwarten, dass das Plasma und die PBMC-Fraktion die freiliegende *T. pallidum* enthalten.

Abbildung 8. Schema der Gewinnung und Aufreinigung der Blutzellfraktionen (modifiziert nach Coligan et al, 1984 [27], und Ferrante & Thong, 1980 [41])



HSC, high speed centrifugation (15000 g); HSC-P, PBMC-Pellet nach der Hochgeschwindigkeitszentrifugation; HSC-S, PBMC-Supernatant nach der Hochgeschwindigkeitszentrifugation; LSC, low speed centrifugation (500 g); LSC-P, PBMC-Pellet nach der Niedriggeschwindigkeitszentrifugation; LSC-S, PBMC-Supernatant nach der Niedriggeschwindigkeitszentrifugation; PBS-Plasma, mit PBS verdünnte Plasma

Das Granulozyten-Erythrozyten-Pellet (ca. 15 ml) wurde hierzu mit PBS 1:1 verdünnt, über Polymorphprep 1:1 geschichtet und abzentrifugiert (500 g, 30 min, RT). Hierbei bildeten sich vier Schichten: obere Schicht - PBS-verdünntes Plasma, zweite Schicht – Lymphozyten, Granulozyten, dritte Schicht – Polymorphprep, Pellet - Erythrozyten. Die Granulozyten wurden abgenommen, gezählt und auf eine Konzentration von $5,0 \times 10^7$ Zellen pro ml eingestellt.

2.3.1.2 Liquor

Cerebrospinal fluid

Die Liquorproben aus dem Max-von-Pettenkofer-Institut wurden bei -80 °C aufbewahrt. Diese Proben waren allerdings einige Male noch vor der Übergabe in unserer Labor für die serologischen Untersuchungen des Institutes aufgetaut. Der Liquor wurde direkt vor der DNS-Isolation aufgetaut und in 0,5 ml aliquotiert.

2.3.1.3 Rachenabstrich

Swab from the throat

Es wurden jeweils drei Abstriche mit sterilem Wattestäbchen vom Rachen von jedem Patienten mit und ohne Symptome einer Angina specifica abgenommen.

2.3.1.4 Schanker-Abstrich

Swab from the chancer

Die Läsionen wurden seitlich manuell komprimiert, und das gewonnene Reizserum wurde mit drei feuchten Steriltupfern abgenommen und in der Reihenfolge der Abnahme markiert (Nr. 1, Nr. 2, Nr. 3).

2.3.1.5 Lymphknoten-Punktion

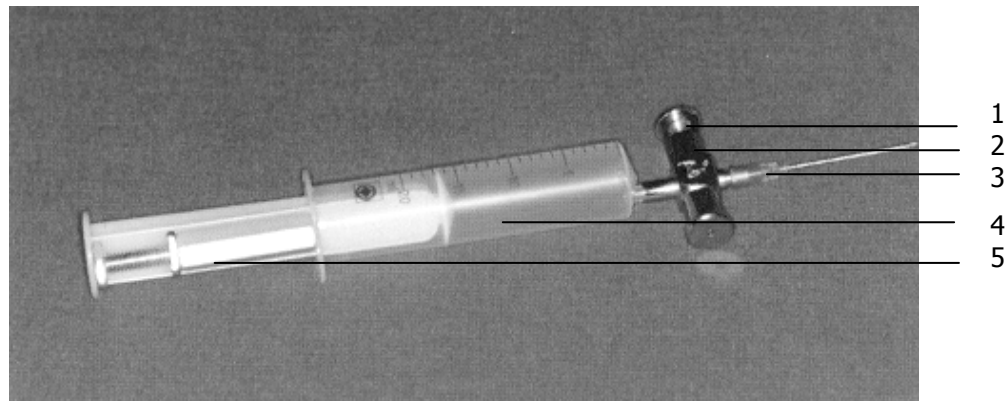
Lymph-nodes aspiration byopsy

Die syphilitische Polyadenopathie wurde mittels Palpation der peripheren Lymphknoten und 7,5 MHz-Sonographie untersucht. Die Sonographie zeigte die Größe und Position, die Form und die Struktur der untersuchten Lymphknoten [18, 10]. Bei der Sonographie wurden die oberflächliche inguinale Lymphknoten und ihre Lage auf der Haut mit einem Hautstift markiert.

Die Lymphknoten-Punktion fand nach der Einverständniserklärung der Patienten statt. Die Punktion wurde mittels eines Feinnadel-Vakuum-Aspirators und einer 20-ml Spritze mit Kanüle 20 G (**Abbildung 9**) nach Binder (1987) durchgeführt [8].

In die ausgewählten Lymphknoten wurde 0,5 ml sterile Kochsalzlösung injiziert und dann mit dem Vakuum-Aspirator aspiriert (0,3 - 0,5 ml), in ein 1,5 ml Röhrchen überführt und bei -20 °C eingefroren.

Abbildung 9. Feinnadel-Vakuum-Aspirator mit der Spritze (Volkenandt et al, 1997 [178])



1, Ventil für den Druckausgleich; 2, Vakuum-Aspirator; 3, Nadel; 4, Spritze (20 ml); 5, einstellbare Fixator für den Aufbau des Unterdruckes

Nach jeder Punktion wurde der Vakuum-Aspirator zur Reinigung mit Desoxyribonuklease I (DNase I)-Lösung und in 1 M HCl behandelt und anschließend mit sterilem Wasser durchgespült und autoklaviert. Für die Kontaminationskontrolle des Vakuum-Aspirators nach der durchgeführten Spüllung wurde das letzte Spülwasser (ca. 1,0 ml) in der *T. pallidum*-PCR zusammen mit der positiven Kontrolle getestet.

2.3.1.6 Ejakulat

Ejaculate

Ejakulat wurde von Patienten ohne syphilitische Hautläsionen an Genitale und Händen gewonnen, um eine Kontamination auszuschließen. Das Ejakulat wurde in sterilen 50 ml Probenröhrchen (Falcon) gesammelt und in 0,5 ml-Portion aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.1.7 Hautbiopsien

Skin biopsies

Die zwei Vollhaut-Stanz-Biopsien (0,5 x 0,5 cm) aus einem Syphilid und eine Biopsie aus nicht betroffener Kontrollhaut wurde nach Infiltrationsanästhesie mit 1 % Scandicain Lösung (2-4 ml) entnommen. Eine Biopsie aus der Läsion wurde histologisch untersucht. Die anderen Biopsien aus der Läsion und aus der gesunden Haut wurden sofort schockgefrohren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.3.2 Serologischen Untersuchungen

Serological assays

2.3.2.1 Treponema pallidum-Hämagglutinationstest (TPHA-Test)

TPHA

Der TPHA-Test wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden Titrationsreihen 1:40 bis 1:81920 aus dem Patientenserum parallel mit gleichen Titrationsreihen von Kaninchenserum hergestellt.

Die Hämagglutination wurde nach Kriterien der Firma BAG, Lich, interpretiert. Die Erythrozytenansammlung in Knopfform in der Mitte der Schale mit glattem Außenrand wurde als keine Hämagglutination bewertet. Die Erythrozytenansammlung in der Form eines kompakten Ringes mit glattem runden Außenrand wurde als unbestimmte Hämagglutination bewertet. Die Erythrozytenansammlung in Form einer großen Ringes mit rauem unregelmäßigem Außenrand und peripherer Agglutination, oder bei der gleichmäßigen Verteilung der agglutinierten Partikeln über den Schalenboden wurde als positive Hämagglutination interpretiert.

2.3.2.2 Venereal-Disease-Research-Laboratory-Test (VDRL)

VDRL

Für den VDRL-Test wurde zuerst eine Antigensuspension mit Kardiolipin hergestellt. Dafür wurde 0,4 ml Verdünnungsflüssigkeit aus dem VDRL-Set in einer Glasflasche mit 0,5 ml Kardiolipin-Antigen langsam unter Schütteln zusammengemischt. Danach wurde zusätzlich 4,1 ml Verdünnungsflüssigkeit zugesetzt, stark geschüttelt und innerhalb eines Tages verwendet. Das Patientenserum wurde bei 56 °C 30 min inaktiviert. Das inaktivierte Patientenserum wurde mit Verdünnungsflüssigkeit von 1:2 bis 1:128 verdünnt. Als Positivkontrolle wurde Serum von Syphilis-Patienten benutzt.

Auf einen Objektträger mit Vertiefungen (14 mm) wurden 50 µl inaktiviertes Patientenserum verteilt, dann 17 µl Antigensuspension zugegeben, auf einem Rotationsapparat 4 min bei RT bewegt (ca. 150 UpM, 1,9 cm Kreisbewegung) und danach sofort unter dem Mikroskop mit 100x Vergrößerung beurteilt.

Die positiven Seren wurden nach Vorschriften der Firma Dade Behring Marburg GmbH bewertet: deutlich sichtbare Agglutination bedeutete positive Ergebnisse.

2.3.2.3 Fluoreszenz-Treponema-Antikörperabsorbtionstest (FTA-ABS-Test)

FTA-ABS

Der FTA-ABS-Test wurde in drei Varianten, IgM-, IgG- und 19S-IgM-FTA-ABS-Test durchgeführt. Für den IgM-FTA-ABS-Test wurden die IgG-Antikörper aus dem Patientenserum mittels hochauflösender Flüssigkeitschromatographie (HPLC) entfernt. Vor

der Durchführung des FTA-ABS-Testes wurden vier Kontrollen vorbereitet: (i) ein Teil des positiven Kontroll-Serums von Syphilis-Patienten 1:5 mit FTA-Absorptionsmedium aus der abgetöteten saprophytischen *Treponema phagedensis* verdünnen, ein Teil des Kontroll-Serums 1:5 mit PBS verdünnen; (ii) ein Teil des unspezifisch-positiven Kontroll-Serums (in FTA-ABS-Test unspezifisch positiv) 1:5 mit FTA-Absorptionsmedium, ein Teil 1:5 mit PBS verdünnen; (iii) FTA-Absorptionsmedium-Kontrolle; (iv) PBS-Kontrolle.

Das Patientenserum wurde 1:5 mit FTA-Absorptionsmedium verdünnt, bei 37 °C 30 min inkubiert, 10 µl davon wurde auf dem auf Raumtemperatur (RT) erwärmten FTA-Objektträger mit ca. 20000 *T. pallidum* Nichols pro Reaktionsfeld aufgetragen und erneut bei 37 °C 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der Inkubation wurde das verdünnte Serum vom Objektträger mit PBS abgewaschen und anschließend mit Aqua destillata vorsichtig nachgespült. Der Objektträger wurde bei RT getrocknet und dann jedem Feld 10 µl Anti-Humanglobulin-Lösung (Anti-IgG- und -IgM-Antikörper) zugegeben, bei 37 °C, 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert und danach erneut mit PBS abgespült. Nach dem Trocknen wurden auf dem Objektträger 3 Tropfen Glycerin (1:10 verdünnt mit PBS) gegeben, der Objektträger mit einem Deckglas abgedeckt und im Laufe von zwei Stunden im Fluoreszenzmikroskop mit Quecksilber-Hochdrucklampe bei 400x Vergrößerung untersucht. Die Intensität der Fluoreszenz wurde nach den Vorgaben der Firma BAG, Lich, beurteilt und die Ergebnisse der Analyse semiquantitativ erfasst:

Fluoreszenzstärke	Test-Ergebnis
sehr starke, ++++	positiv, +
starke, +++	positiv, +
mittlere, ++	schwach positiv, (+)
schwache, +	grenzwertig positiv, +/-
sehr schwache, ±	negativ, -
fehlende, -	negativ, -

2.3.3 DNS-Isolierung

DNA isolation

Die DNS-Isolierung wurde mittels Genomic DNA Isolation Reagent, DNAzol BD Reagent[®], unter sterilen Bedingungen in der sterilen Werkbank durchgeführt. Mit dem DNAzol BD Reagent lassen sich DNS-Fragmente der Größe von 100 bp bis 100 kbp isolieren. Serum, HSC-S, LSC-S, HSC-P, LSC-P, Granulozyten und Ejakulat wurden direkt mit dem DNAzol BD Reagent gemischt. Abstriche wurden zuerst mit 1,0 ml sterilem Wasser gevortext, und 0,5

ml davon wurde für die DNS-Isolierung verwendet. Die DNS-Isolation aus dem Hautbiopsat wurde sofort nach der Entnahme aus dem Stickstoff durchgeführt.

Aus jeder Patienten-Probe mit Ausnahme der Hautbiopsien wurde DNS in drei unabhängigen Ansätzen isoliert und jede DNS-Isolierung wurde separat mittels PCR analysiert. Die DNS-Isolierung umfasste die Zelllysis, DNS-Präzipitation, DNS-Reinigung und Lösung der gewonnenen DNS.

1. *Zelllysis*: je 0,5 ml Serum, Plasma, HSC-S, LSC-S, Ejakulat, Lymphknoten-Punktat und Abstrich-Spülung, je $1,5 \times 10^6$ HSC-P-Zellen und LSC-P-Zellen, und $3,0 \times 10^6$ Granulozyten wurden mit 1,0 ml DNAzol BD Reagent gemischt und 1 min gevortext. Die Hautproben wurden mit einem Skalpell zerkleinert und in einem Gewebehomogenisator in 0,5 ml DNAzol BD Reagent homogenisiert. Das Homogenisat wurde in 2 ml Röhrchen überführt, mit weiterem 0,5 ml DNAzol BD Reagent gemischt und 1 min gevortext.

2. *DNS-Präzipitation*: 0,4 ml Isopropanol wurde zum Homogenisat gegeben, gevortext, 5 min bei RT inkubiert und anschließend abzentrifugiert (10000 g, 10 min, 4 °C).

3. *DNS-Reinigung*: der Überstand wurde abgenommen, zum DNS-Pellet wurde 0,5 ml DNAzol BD Reagent gegeben, das Gemisch 30 sec gevortext und abzentrifugiert (2000 g, 4 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und das DNS-Pellet mit 1,0 ml 95 % Ethanol versetzt (nicht gevortext), 3 min bei RT inkubiert und abzentrifugiert (2000 g, 4 min, 4 °C).

4. *Lösung der DNS*: der Ethanol-Überstand wurde abgenommen, das DNS-Pellet wurde bei Raumtemperatur ca. 1 Stunde getrocknet, in 20 µl Wasser gelöst und bei - 20 °C aufbewahrt.

2.3.4 PCR

PCR

Um eine Kontamination der gewonnenen Proben durch *T. pallidum*-positive Patientenproben oder durch das Amplifikat zu vermeiden, wurden die Vorbereitung zur PCR, die PCR selbst und die Amplifikat-Analyse an getrennten Arbeitsplätzen durchgeführt:

- Raum I für die Bearbeitung von frisch gewonnen Proben, Zentrifugation und Aliquotieren der Proben, DNS-Isolation;
- Raum II für die Vorbereitung des PCR-Ansatzes für 1. und 2. *tpp47*-PCR, β -Actin-PCR und der Reagenzien für die DNS-Hybridisierung;
- Raum III für die 1. und 2. *tpp47*-PCR, β -Actin-PCR mit jeweils getrennten Arbeitsplätzen, DNS-Fällung, Gel-Elektrophorese;

- Raum IV für die Vorbereitung von radioaktiven Reagenzien und DNS-Hybridisierung.

Die molekularbiologische Arbeit wurde in eine Richtung von Probenbearbeitung, DNS-Isolation, Herstellung von PCR-Ansatzes, 1. *tpp47*-PCR, Amplikon-Fällung, β -Actin-PCR und 2. *tpp47*-PCR, Gel-Elektrophorese, DNS-Hybridisierung bis zum Probenaufbewahren durchgeführt, um die Kontamination durch Amplikon zu vermeiden. Es wurde an UV-belichteten sterilen Werkbänken gearbeitet.

β -Actin ist ein Strukturprotein, ein Bestandteil des Zytoskeletts und gleichzeitig eines der fünf häufigsten Proteine in eukaryotischen Zellen [114]. β -Actin wurde als „house keeping gene“ als Positivkontrolle für die Qualität der DNS-Isolierung (DNS-Qualität und -Quantität) [186] aus dem zellhaltigen Patientenmaterial, wie Blutzellen (PBMC-Fraktionen (HSC-P, LSC-P), Granulozyten), Ejakulat, Hautbiopsaten parallel unter gleichen PCR-Bedingungen und mit gleicher Reagenzien-Konzentration, wie die *tpp47*-PCR durchgeführt. Um die Menge der isolierten DNS einschätzen zu können, wurde die β -Actin-PCR mit zwei Ansätzen, in der Verdünnung 1:10 und ohne Verdünnung durchgeführt.

2.3.4.1 *tpp47*-PCR

tpp47 PCR

Für den Nachweis vom Syphilis-Erregern wurde das *tpp47*-Gen [67] ausgesucht, da dieses Gen in vielen Studien zur molekularen Syphilis-Diagnostik mit anderen Humanpathogenen und keine Positivität in der PCR aufwies [88]. Der epidemiologische, anamnestische und klinische Ausschluß von nicht-syphilitischen Treponemen (Frambösie- und Pinta-Erregern) erlaubt die Zuordnung der positiven *tpp47*-PCR zur venerischen Syphilis.

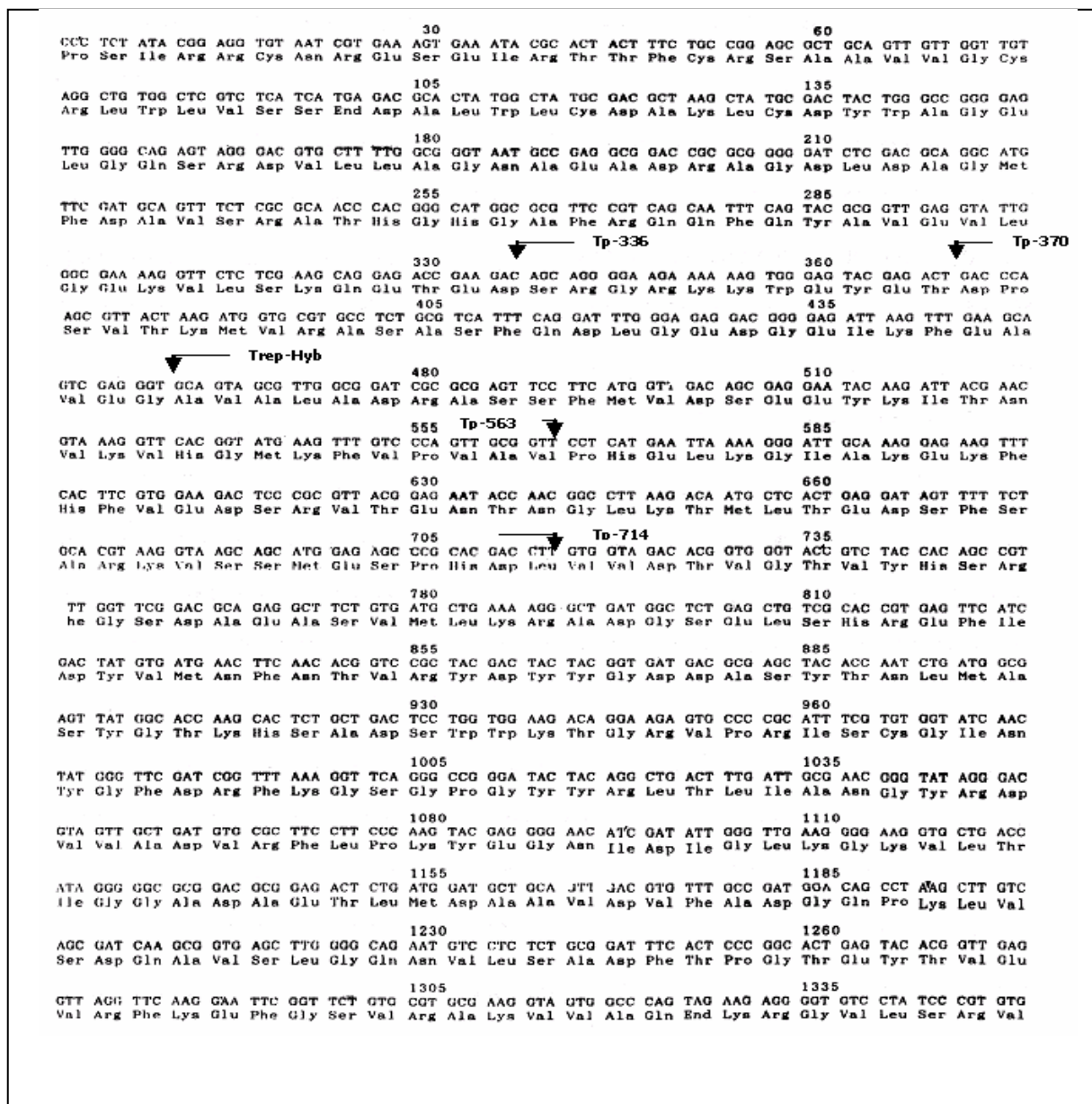
tpp47-PCR mit Patienten-Proben

Die *tpp47*-PCR wurde im nested-PCR-Verfahren mit der "Hotstart"-Technik (Zugabe von *Taq*-Polymerase nach der DNS-Denaturierung) mit je 35 Zyklen durchgeführt. Mit dem externen Primer-Paar Tp-336 (Position: 336 - 358) und Tp-714 (Position: 693 - 714) wurde das 379 bp-Fragment des *tpp47*-Gens amplifiziert (**Abbildung 10**). Mit den internen Primern Tp-370 (Position: 370 - 392) und Tp-563 (Position: 540 - 563) wurde in der 2. PCR ein 199 bp-Großes DNS-Fragment amplifiziert.

Für die erste und zweite *tpp47*-(nested)-PCR wurde ein Reagenzien-Gemisch aus Primer, dNTPs, PCR-Puffer, MgCl₂ und Wasser auf Eis vorbereitet. Die Menge von Reagenzien wurde so gerechnet, dass das Endvolumen in jedem Röhrchen, einschließlich der isolierten DNS und der *Taq*-Polymerase, 25 μ l betrug. Der Reaktionsansatz für die 1. und 2. *tpp47*-PCR war identisch; die Konzentrationen und Mengen der Reagenzien für diese PCR sind in der

Tabelle 8 dargestellt. Für die PCR wurde das Reagenzien-Gemisch in PCR-Röhrchen (0,2 ml) auf Eis aliquotiert, DNS-Probe (4,0 µl DNS-Isolat für 1. *tpp47*-PCR, 14,7 µl Amplikon für 2. *tpp47*-PCR) in das jeweilige PCR-Röhrchen gegeben und im PCR-Gerät (GenAmp 9700) denaturiert. Nach der DNS-Denaturation (**Tabelle 9**) wurde sofort die *Taq*-Polymerase dazu gegeben („Hot-Start“-Technik), um die DNS zu amplifizieren. 0,25 µl *Taq*-Polymerase wurde vor der Zugabe nach „Hot-Start“-Technik (2 µl) in 1,55 µl Aqua destillata und 0,2 µl 10 x Puffer gemischt.

Abbildung 10. *tpp47*-Gen (Hsu et al, 1989 [67]); Primer-Positionen sind markiert



Jede *tpp47*-PCR mit den Patienten-Proben wurde mit zwei negativen Kontrollen durchgeführt: Aqua destillata und DNS-Isolat aus gleichartigen Proben gesunder Probanden,

die anamnestisch, klinisch und serologisch keinen Anhalt auf Syphilis und HIV-Infektion hatten. Als Positivkontrollen dienten die β -Actin-positive Patienten-Probe (DNS-Isolierungskontrolle) und *T. pallidum* ($1,25 \times 10^4/\mu\text{l}$) aus der *T. pallidum* Nichols-Stammsuspension des FTA-ABS-Testes ($5,0 \times 10^4/\mu\text{l}$).

Tabelle 8. PCR-Ansatz (25 μl) für 1. und 2. *tpp47*-PCR, und für β -Actin-PCR von Patienten-Proben

Reagenz	Stamm-konzentration	Volumen, μl	Endmenge	Endkonzentration
Primer	125,0 pmol/ μl (je)	0,2 (je)	25,0 pmol (je)	1,0 pmol/ μl
Taq-Polymerase	5,0 U/ μl	0,25	1,25 U	0,05 U/ μl
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	0,00005 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ (je)	4,0	0,005 μmol (je)	0,0002 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$
10 x Puffer:		2,5		
Tris-HCl (pH 9,0)	100,0 mmol/l		0,00025 mmol	10 mmol/l
KCl	500,0 mmol/l		0,00125 mmol	50 mmol/l
Triton X-100	1,0 %			
MgCl ₂	25,0 mmol/l	1,6	0,00004 mmol	1,6 mmol/l
DNS-Isolat (1. PCR)		4,0*		
Amplikon (2. PCR)		14,7**		
Gesamtvolumen		25,0		

*, gleiche Volumen für *tpp47*- und β -Actin-PCR; **, Amplikon-Volumen nur für 2. *tpp47*-PCR

Tabelle 9. PCR-Bedienungen für 1. und 2. *tpp47*-PCR, und für β -Actin-PCR

Zahl der Zyklen	Vorgehen	Zeit	T °C
1	Denaturierung	10'	95
	<i>Abkühlung</i>		80
	<i>Zugabe der Taq-Polymerase</i>		
35	Denaturierung	30"	95
	Primeranlagerung	30"	55*/ 60**
	Polymerisation	30"	72
1	Elongation	10'	72

', Minuten; ", Sekunden; *, Temperatur in 1. *tpp47*-PCR und in β -Actin-PCR; **, Temperatur in 2. *tpp47*-PCR

Die Spezifität des *tpp47*-Gens für den Nachweis von *T. pallidum* war von anderen Arbeitsgruppen gegen verschiedene humane Pathogene, unter anderem auch gegen Borrelien, getestet worden [59, 88]. Der epidemiologische, anamnestische und klinische Ausschluss von

nicht-syphilitischen Treponemen (Frambösie- und Pinta-Erregern) erlaubt die Zuordnung der positiven *tpp47*-PCR zur venerischen Syphilis. Die Spezifität der *tpp47*-PCR in den Patienten-Proben wurde auch durch die nested-PCR und die Blot-Hybridisierung mit spezifischen radioaktiv markiertem Primer kontrolliert.

***tpp47*-PCR mit *T. pallidum*-Verdünnungsreihe**

Die *tpp47*-PCR-Sensitivität wurde mittels einer Verdünnungsreihe von *T. pallidum* Stamm Nichols aus dem FTA-ABS-Test (Stamm-Konzentration 1000 *T. pallidum*/μl) untersucht. Die Verdünnungsreihe bestand aus 9 aufeinander folgenden Verdünnungen *T. pallidum*/μl: 250; 100; 50; 25; 10; 5; 2,5; 1,0; 0,5. 4 μl *T. pallidum*-Suspension aus dem FTA-ABS-Test wurde in die 1. *tpp47*-PCR und 4 μl des Amplikons in die 2. *tpp47*-PCR eingesetzt, so dass die Menge von Treponemen/ Probe war: 10³; 400; 200; 100; 40; 20; 10; 4; 2. Als Negativkontrolle diente Aqua destillata.

2.3.4.2 Konzentrierung des 379 bp-Amplikons nach 1. *tpp47*-PCR

Concentration of the 378 bp amplicon after 1st tpp47 PCR

Für die weitere Erhöhung der PCR-Sensitivität wurde das 379 bp-Amplikon nach der 1. *tpp47*-PCR konzentriert. 25 μl des 379 bp-Amplikons wurde mit 1,0 μl Glykogen, 2,5 μl 2M Ammoniumacetat und 75,0 μl 100 % Ethanol gemischt, 15 min bei -20 °C gekühlt und dann abzentrifugiert (12000 g, 30 min, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen, 250,0 μl 70 % Ethanol wurde zum Amplikon-Pellet gegeben und dieses erneut abzentrifugiert (12000 g, 30 min, 4 °C). Nach der Abnahme des Überstandes wurde das Amplikon-Pellet luftgetrocknet, in 30,0 μl Wasser aufgenommen und 14,7 μl davon in die 2. *tpp47*-PCR eingesetzt.

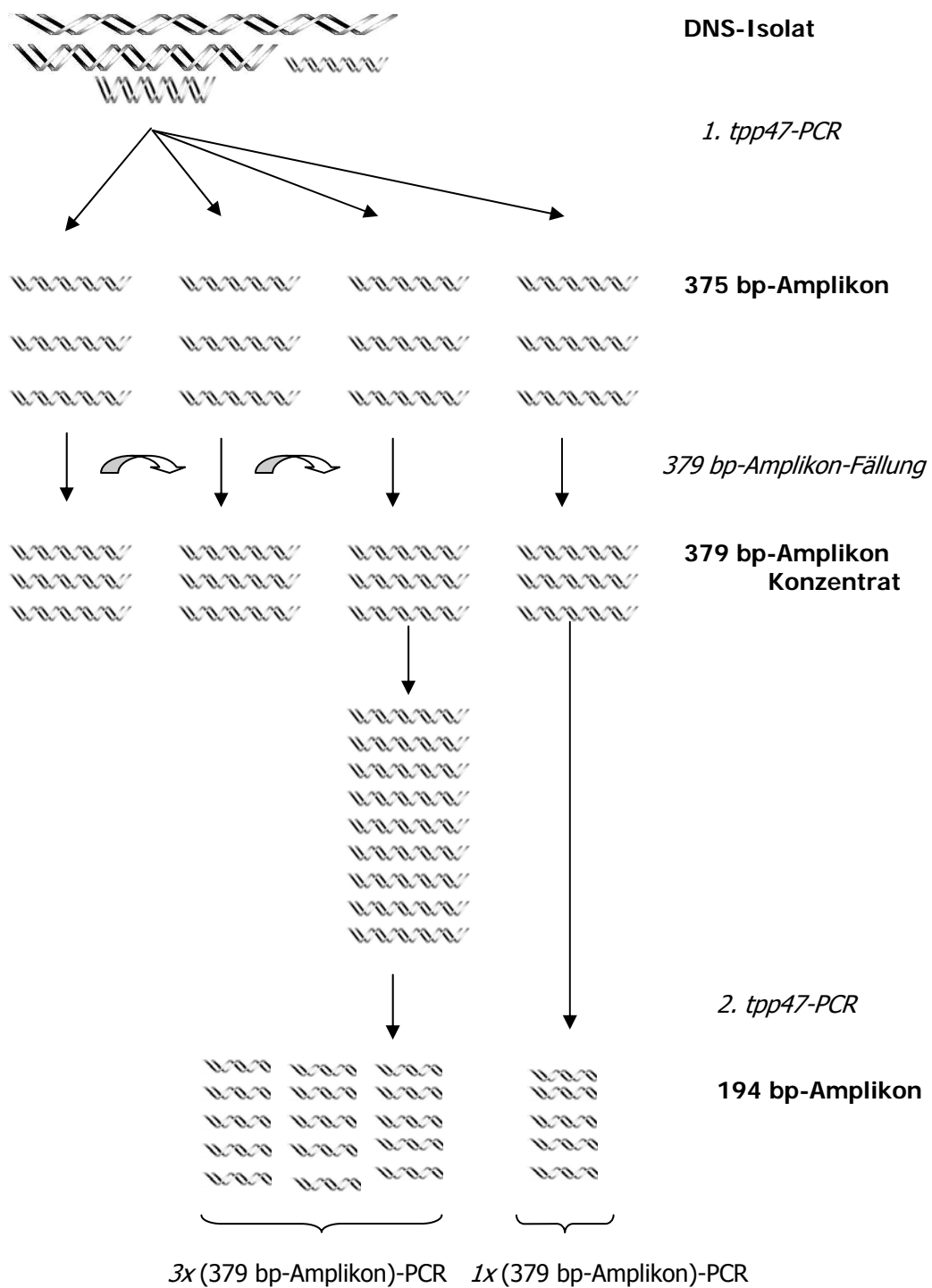
2.3.4.3 1x und 3x (379 bp-Amplikon)-PCR

1x and 3x (379 bp amplicon) PCR

Da die diagnostische PCR-Sensitivität vom Vorhandensein des Templates in der Probe abhängig ist (Fehlen des Templates in der Probe führt zur falsch negativen Diagnose), wurde der Einfluss der einfachen (1x) und dreifachen (3x) Menge von 379 bp-Amplikon auf die diagnostische PCR-Sensitivität der 2. PCR untersucht (sog. 1x- und 3x-(379 bp-Amplikon)-PCR; **Abbildung 11**).

Für die 3x-379 bp-Amplikon-PCR wurden drei Ansätze der 1. *tpp47*-PCR mit gleichem Patientenmaterial parallel durchgeführt, das 379 bp-Amplikon von drei PCR präzipitiert und alle drei 379 bp-Amplikons in 30 μl Wasser nacheinander gelöst und 14,7 μl davon in die 2. *tpp47*-PCR eingesetzt.

Abbildung 11. Schema der 1x und 3x (379 bp-Amplikon)-PCR



2.3.4.4 β -Actin-PCR

β -actin PCR

In der β -Actin-PCR wurden die Primer Actin-1 (Position: 2106 - 2127) und Actin-2 (Position: 2286 - 2310) für die Amplifizierung des 206 bp-Fragmentes eingesetzt [186]. Der PCR-Ansatz für das β -Actin-Gen war der *tpp47*-PCR mit der Ausnahme der Primer gleich gestaltet

(**Tabellen 8 und 9**). Die Bedingungen der β -Actin-PCR entsprachen den Bedingungen der *tpp47*-PCR, so dass die *tpp47*- und β -Actin-PCR gleichzeitig und parallel durchgeführt werden konnte. Für die Positiv- und Negativkontrolle wurden β -Actin-positive Patienten-Proben bzw. Aqua destillata eingesetzt.

2.3.4.5 Gel-Elektrophorese

Gel electrophoresis

Es wurden 7,5 μ l des Amplikons der *T. pallidum*-DNS oder der β -Actin-DNS mit 1,5 μ l Orange G-Ansatzlösung vermischt und in einem 2,5 % Agarosegel (2,5 g Agarose in 100 ml 1 x TBE-Lösung) durch Elektrophorese in 1 x TBE-Lösung in einer horizontalen Gelkammer über eine Stunde bei 2600 Volt, 25 Amper and 90 Watt aufgetrennt [148]. Nach der Gel-Elektrophorese wurde das Amplikon in Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) 15 min gefärbt, einmal mit Aqua destillata gewaschen und im UV-Transilluminator fotografiert.

2.3.4.6 Southern-Blot, DNS-Hybridisierung, Autoradiographie

Southern blot, DNA hybridization & autoradiography

Die Southern-Blot-Hybridisierung bestand aus vier Schritten:

1. Southern-Blot: Transfer des im Gel aufgetrennten Amplikons auf die Membran;
2. Kinasierung: Markierung der spezifischen DNS-Sonde (Oligonukleotid) mit radioaktivem [γ -³²P]-Adenosintriphosphat ([γ -³²P]-ATP);
3. DNS-Hybridisierung: spezifische Bindung der radioaktiv markierten DNS-Sonde an das Amplikon;
4. Autoradiographie: durch Exposition eines Röntgenfilmes.

Southern-Blot

Das Southern-Blot-Transfer der amplifizierten DNS vom Gel auf die Membrane verläuft in einer Wanne mit Kapillarblot in folgenden Schritten [148, 165, 63]:

- *DNS-Depurinisierung*: nach der Elektrophorese wurde das DNS-Gel in 0,25 M HCl für 20 min auf einem Schüttler inkubiert und anschließend mit Aqua destillata gewaschen;
- *DNS-Denaturierung*: das DNS-Gel wurde zwei Mal in 1,5 M NaCl/ 0,5 M NaOH für 20 min auf einem Schüttler denaturiert und mit Aqua destillata gewaschen;
- *DNS-Neutralisierung*: das DNS-Gel wurde in 0,5 M Tris (pH7,5)/ 3 M NaCl für 20 min neutralisiert;

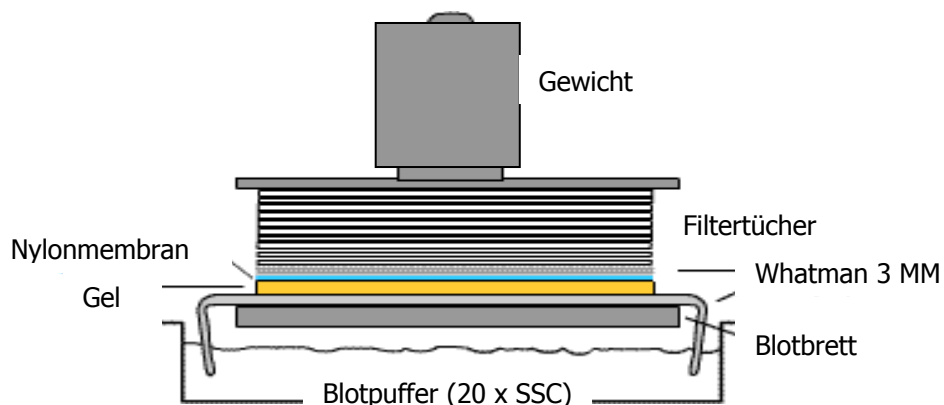
- *DNS-Transfer*: das DNS-Gel wurde mit einer Nylon-Membran luftblasenfrei und dann mit Filterpapiere, Papierhandtücher, Glasplatte mit 2 kg Gewicht bedeckt und 12 h in 20 x SSC bei RT über Nacht mit der Kapillarkraft nach Southern (1975) [165] übertragen (**Abbildung 12**);
- *DNS-Fixierung*: die DNS-Membran wurde nach dem Transfer bei 120 °C, 20 min, gebacken und damit fixiert.

Kinasierung (5'-Phosphorylierung der DNS-Sonde)

Für die Visualisierung des Amplikons auf der Membrane wurde die komplementäre DNS-Sonde, das Oligonukleotid Trep-Hyb, mit der γ -Phosphatgruppe des radioaktiven $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -Adenosintriphosphates ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$) durch Phosphorylierung seiner Hydroxylgruppe am 5'-Ende mittels T4-Polynukleotid-Kinase markiert (Kinasierung) [63].

Zur radioaktiven Markierung wurde 10 pmol Oligonukleotid Trep-Hyb, 10 x Kinase-Puffer, 40 pmol $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, 2 U Polynukleotidkinase und Aqua destillata ad 30 μl für 30 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde danach bei 80 °C für 2 min inaktiviert. Das freie (nichtgebundene) $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$, wurde nach der Kinasierung mittels der Gelpermeationschromatographie durch Zentrifugation über eine Sephadex G-50-Säule abgetrennt (600 g, 2 min, RT) [103].

Abbildung 12. Schematische Darstellung des Southern-Blots (Southern, 1975 [165])



DNS-Hybridisierung und Autoradiographie

Das einzelsträngige 194 bp-Amplikon wurde mit dem radioaktiv-markierten Oligonukleotid, Trep-Hyb- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$, hybridisiert und dann das Signal röntgenologisch mit Hilfe der Autoradiographie detektiert. Die Hybridisierungstemperatur wurde über die Schmelztemperatur (T_m) des radioaktiv markierten Oligonukleotides Trep-Hyp- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$

errechnet. T_m wird für Oligonukleotides mit wenigen Basenpaaren (< 20 bp) nach folgender Formel gerechnet [63]:

$$T_m = 4 (G + C) + 2 (A + T) - 5 \text{ } ^\circ\text{C}; \text{ wobei } G, C, A \text{ und } T \text{ die Zahl der } G\text{-, } C\text{-, } A\text{- und } T\text{-Nukleoside ist.}$$

Für Trep-Hyb (GCAGTAGCGTTGGCGGATC) ist die T_m wie folgt:

$$T_m = 4 \times 12 + 2 \times 7 - 5 = 57 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Bei der DNS-Hybridisierung wurden folgende Schritte wurden durchgeführt [63]:

- *Prähybridisierung:* die DNS-Nylonmembran wurde mit 2 x SSC angefeuchtet, zusammengerollt und in einem Glasrohr mit 20 ml Hybridisierungspuffer mit 100 μ l Heringsspermien-DNS (hitzenaturiert: 95 $^\circ\text{C}$, 5 min, dann auf Eis abgekühlt) bei 57 $^\circ\text{C}$ 45 min prähybridisiert;
- *Hybridisierung:* die Prähybridisierungslösung (Hybridisierungspuffer mit Heringsspermien-DNS) wurde durch 10 ml Hybridisierungspuffer mit dem radioaktiv-markiertem Olygonukleotid Trep-Hyb ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP-Trep-Hyb}$) ersetzt und bei 57 $^\circ\text{C}$, 12 h im Schüttler hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde der radioaktive Hybridisierungspuffer bei -20 $^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Die DNS-Membran wurde danach mit 6 x SSC bei 57 $^\circ\text{C}$ 2-3 Mal für 5 min gewaschen;
- *Autoradiographie:* die DNS-Membran wurde getrocknet, in Folie verpackt und auf einem Röntgenfilm (DNS-Seite zum Film) bei -80 $^\circ\text{C}$ mit einer Verstärkungsfolie 1-2 Tage abhängig von der Signalstärke gelagert, danach entwickelt und analysiert.

III. ERGEBNISSE

RESULTS

3.1 Klinische und serologische Untersuchungen

Clinical & serological investigations

3.1.1 Patienten mit Verdacht auf Syphilis (Gruppe A)

Patients suspected of syphilis (group A)

3.1.1.1 Anamnese und klinische Symptome

Disease history & clinical signs

Die Gruppe A bestand aus 15 Patienten (18 - 35 Jahre, Durchschnittsalter 30 Jahre) mit klinischem oder serologischem Verdacht auf Syphilis. Das serologische Screening wurde mit dem TPHA-Test von niedergelassenen Ärzten, im Gesundheitsamt München, oder im Serologie-Labor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, LMU München, durchgeführt. Danach wurden diese Patienten in die Gruppe A eingeschlossen.

Fünf Patienten (A2, A6, A7, A14, A15, **Tabelle 10**) hatten eine HIV-Koinfektion in verschiedenen Stadien entsprechend der Klassifikation des Center for Diseases Control and Prevention (CDC), Atlanta, USA (1997) [19].

Die Patienten mit klinischem Verdacht auf manifeste Syphilis (A1 – A8; **Tabelle 10**) gaben eine eindeutige sexuelle Anamnese an. Drei Patienten ohne klinische Symptomen einer Syphilis (A9 - A11) hatten anamnestisch ungeschützten Geschlechtsverkehr und konnten sich an einen Hautausschlag vor einigen Monaten, der ohne Therapie abheilte, erinnern, so dass eine frühe latente Syphilis bei diesen Patienten angenommen werden konnte.

Patient A12 meinte, keinen Primäraffekt, generalisierten Ausschlag oder Haarausfall im Laufe der letzten 12 Monaten gehabt zu haben. Patient A13 (Asylbewerber aus China) hatte eine Syphilis gehabt, welche im Ausland vor mehr als einem Jahr behandelt worden war, jedoch es fehlten Angaben bezüglich des verwendeten Antibiotikums und der Dosis. Es fehlten auch serologische Kontrolluntersuchungen. Ein positiver TPHA-Test bei Patienten ohne die Klinik einer Syphilis konnte einem Zustand nach Therapie oder einer latenten Syphilis entsprechen. Auf Grund der Anamnese konnte bei den Patienten A12 und A13 eine latente Syphilis im Spätstadium vermutet werden.

Patienten A14 und A15 gaben anamnestisch keine Syphilis an. Patient A15 war HIV-positiv, gab ungeschützte sexuelle Praktiken an, hatte aber einen negativen TPHA-Test. Da bei HIV-positiven Patienten der TPHA-Test falsch-negativ sein kann, konnte hier der Verdacht auf (spät-) latente Syphilis nicht ausgeschlossen werden.

Die Hautveränderungen der Patienten A1 – A8 konnten klinisch auf Grund der Morphologie der Effloreszenzen und des Verteilungsmusters einer Syphilis zugeordnet werden. Zwei Patienten (A1, A2) hatten Genitalerosionen, was den Verdacht auf primäre Syphilis erweckte; sechs Patienten (A3 – A8) hatten einen makulösen oder makulopapulösen Ausschlag mit Rachenentzündung, was den Verdacht auf sekundäre Syphilis mit Angina syphilitica lenkte. Sechs Patienten (A9 – A14) waren klinisch unauffällig, hatten aber einen positiven TPHA-Test, was auf eine latente Syphilis hindeuten konnte und weitere serologische Untersuchungen notwendig machte (**Tabelle 10**).

3.1.1.2 Syphilis-Serologie

Syphilis serology

Alle 15 Patienten der Gruppe A mit klinischem oder serologischem (TPHA-Test) Verdacht auf manifeste oder latente Syphilis wurden mittels quantitativem TPHA-Test und VDRL, sowie semiquantitativem IgG-, IgM- und 19S-IgM-FTA-ABS-Test untersucht.

Der TPHA-Test war bei 14 von 15 Patienten mit einem Titer von 40 bis 81920 positiv. Der VDRL war bei denselben 14 Patienten mit einem Titer von 4 bis 64 positiv. Alle Patienten waren im IgG-FTA-ABS-Test positiv. Der IgM-FTA-ABS-Test war bei vier Patienten positiv, davon waren drei schwach positiv und zwei grenzwertig positiv. Bei zwei Patienten war der IgM-FTA-ABS-Test negativ und bei sieben kompetitiv gehemmt (Prozone-Phänomen). Der 19S-IgM-FTA-ABS-Test war bei 13/15 Patienten positiv, davon bei drei Patienten schwach positiv und bei zwei Patienten grenzwertig positiv (**Tabelle 10**).

Mittels serologischer Tests konnte man bei 13 von 15 Patienten (A1 – A13) die klinische und serologische Verdachtsdiagnose eindeutig bestätigen: Patienten A1 und A2 hatten primäre Syphilis, Patienten A3 – A8 hatten sekundäre Syphilis, Patienten A9 – A13 latente Syphilis (**Tabelle 10**).

Bei den HIV-positiven Patienten A14 und A15 war die Syphilis-Serologie nicht eindeutig. Beim Patienten A14 waren die Suchreaktionen (TPHA-Test und VDRL) positiv, die Bestätigungsreaktionen (IgM- und 19S-IgM-FTA-ABS-Test) waren dagegen negativ. Beim Patienten A15 waren TPHA-Test und VDRL negativ, IgM- und 19S-IgM-FTA-ABS-Test jedoch grenzwertig oder schwach positiv. Diese beiden Patienten werden als „Verdacht auf latente Syphilis“ kategorisiert.

3.1.2 Patienten nach Behandlung einer Syphilis (Gruppe B)

Patients after syphilis treatment (group B)

Die Gruppe B bestand aus 10 Patienten (Alter 25 - 69 Jahre, Durchschnittsalter 40,5 Jahre) mit durchgemachter, vor 1 bis 24 Monaten adäquat behandelter manifester oder latenter Syphilis. Die Patienten hatten keine klinischen Symptome einer Syphilis, aber einen positiven 19S-IgM-FTA-ABS-Test. Die PCR-Untersuchung bei dieser Gruppe sollte zeigen, ob diese Positivität eventuell doch einer *T. pallidum*-Persistenz entsprach und damit ein Therapieversagen bedeutete. In dieser Gruppe sollte die PCR als Kontroll-Test eingesetzt werden (**Tabelle 11**).

Die Patienten dieser Gruppe waren in verschiedenen Syphilis-Stadien behandelt worden: primärer Syphilis bei einem Patient, sekundärer Syphilis bei zwei Patienten, latenter Syphilis bei sieben Patienten. Drei Patienten (B3, B5, B9) hatten eine HIV-Koinfektion in verschiedenen Stadien nach CDC (**Tabelle 11**).

Die Patienten nach vor 1 bis 24 Monaten ausreichend behandelter manifester oder latenter Syphilis hatten eine positive Syphilis-Serologie im TPHA-Test, VDRL, IgG-, IgM- oder 19S-IgM-FTA-ABS-Test. Der Titer des TPHA-Testes war bei einem Patient (B1) eine Monat nach der Therapie der primären Syphilis um das 32-fache gestiegen. Bei anderen Patienten dieser Gruppe blieb der TPHA-Test in gleicher Höhe 2 bis 24 Monaten nach der Therapie positiv. Der VDRL war bei sechs Patienten (B1 – B5, B10) gesunken und bei vier Patienten (B6 – B9) negativ geworden. Der IgM-FTA-ABS-Test war negativ geworden bei einem Patienten (B1) und kompetitiv gehemmt bei einem anderen (B2).

Der 19S-IgM-FTA-ABS-Test blieb bei allen 10 Patienten positiv, davon bei drei Patienten schwach positiv (B4, B6, B7) und fünf grenzwertig positiv (B1, B5, B8 – B10) (**Tabelle 11**).

3.1.3 Patienten nach Behandlung einer Neurosyphilis (Gruppe C)

Patients after treatment of neurosyphilis (group C)

Die Gruppe C bestand aus 12 Patienten, die vor 3 bis 7 Jahren adäquat wegen Neurosyphilis behandelt worden waren (Alter 28 - 65 Jahre, Durchschnittsalter 43,5 Jahre) und keine neurologische Symptomatik aufwiesen, aber eine positive Serologie in Blut und Liquor hatten (**Tabelle 12**). Diese Patienten befanden sich in regelmäßiger serologischer Kontrolle. Die Patienten wurden auf eine *T. pallidum*-Präsenz in Serum und Liquor untersucht, um zu kontrollieren, ob diese Positivität durch persistierende Treponemen verursacht wurde. In

dieser Gruppe sollte die PCR als Kontroll-Test verwendet werden. Die serologischen Untersuchungen des Serums und Liquors wurden im Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der LMU München durchgeführt.

Tabelle 10. Gruppe A: klinische Charakteristik, HIV-Status, Syphilis-Serologie und Syphilis-Diagnose

Patient- Nummer	Klinische Charakteristik	HIV- Stadium (CDC)	Syphilis-Serologie					Syphilis-Diagnose
			TPHA (Titer)	VDRL (Titer)	IgG	IgM	19S-IgM	
A1	Erosion, genital	-	1:320	1:2	+	(+)	(+)	Primär
A2	Erosion, anal	+ (B2)	1:40	1:16	+	(+)	(+)	Primär
A3	makulopapulöses Exanthem	-	1:640	1:32	+	KH	+	Sekundär
A4	makulöses Exanthem	-	1:2560	1:64	+	KH	+	Sekundär
A5	makulöses Exanthem	-	1:10240	1:32	+	KH	+	Sekundär
A6	papulöses Exanthem	+ (A1)	1:5120	1:64	+	KH	+	Sekundär
A7	papulopustulöses Exanthem	+ (B2)	1:10240	1:16	+	(+)	+	Sekundär
A8	papulöses Exanthem, palmoplantar	-	1:81920	1:32	+	-	-	Sekundär
A9	OB	-	1:10240	1:16	+	KH	+	früh latent
A10	OB	-	1:320	1:16	+	+	+	früh latent
A11	OB	-	1:640	1:16	+	KH	+	früh latent
A12	OB	-	1:10240	1:4	+	KH	+/-	spät latent
A13	OB	-	1:1280	1:8	+	+/-	+/-	spät latent*
A14	OB	+ (B2)	1:10240	1:8	+	-	-	(spät) latent*
A15	OB	+ (A1)	-	-	+	+/-	(+)	(spät) latent*

Abkürzungen: OB, ohne Befund; KH, kompetitive Hemmung; -, negativ; +, positiv; (+), schwach positiv; +/-, grenzwertig positiv; *, Verdacht auf latente Syphilis

Tabelle 11. Gruppe B: Syphilis-Stadium vor Therapie, HIV-Status und Syphilis-Serologie vor Therapie und Syphilis-Serologie nach Therapie

Patient- Nummer	Syphilis- Stadium vor Therapie	HIV- Status (CDC)	Syphilis-Serologie								Verlauf nach Therapie Monate	
			vor Therapie					nach Therapie				
			TPHA (Titer)	VDRL (Titer)	IgG [#]	IgM	19S-IgM	TPHA (Titer)	VDRL (Titer)	IgM		19S-IgM
B1	primär	-	1:2560	1:8	+	-	-	1:81920	1:4	-	+/-	1
B2	sekundär	-	1:640	1:128	+	KH	+	1:640	1:16	KH	+	2
B3	sekundär	+(A1)	1:81920	1:256	+	+	+	1:81920	1:4	+	+	6
B4	früh latent	-	1:320	1:32	+	KH	+	1:320	1:8	+/-	(+)	1
B5	früh latent	+(B1)	1:1280	1:4	+	-	-	1:1280	1:2	+/-	+/-	24
B6	früh latent	-	1:5120	1:32	+	+	+	1:5120	-	+/-	(+)	1
B7	früh latent	-	1:640	1:32	+	+/-	(+)	1:640	-	(+)	(+)	22
B8	spät latent	-	1:160	1:16	+	+/-	+/-	1:160	-	+/-	+/-	1
B9	spät latent	+(B2)	-	-	(+)	+/-	+/-	-	-	(+)	+/-	1
B10	spät latent	-	1:320	1:32	+	(+)	(+)	1:320	1:16	+/-	+/-	1

Abkürzungen: +, positiv; (+), schwach positiv; +/-, grenzwertig positiv; -, negativ; KH, kompetitive Hemmung; IgM, IgM-FTA-ABS-Test; 19S-IgM, 19S-IgM-FTA-ABS; IgG, IgG-FTA-ABS-Test; [#], IgG nach der Therapie nicht angegeben, da bei allen Patienten positiv.

Tabelle 12. Gruppe C: Syphilis-Serologie in Serum und Liquor

Patient- Nummer	Syphilis-Serologie				Zeit nach Therapie (Monate)
	Serum/ Liquor		Serum		
	TPHA (Titer)	FTA-ABS	IgM	19S-IgM	
C1	1:2560/ 1:256	(+)/ (+)	nd	nd	82
C2	1:1280/ -	(+)/ (+)	nd	nd	44
C3	1:1024/ 1:64	(+)/ +/-	-	-	48
C4	1:2560/ 1:128	(+)/ (+)	nd	nd	46
C5	1:1024/ 1:128	(+)/ +/-	-	-	42
C6	1:16384/ 1:256	+/ (+)	nd	nd	44
C7	1:2560/ 1:16	(+)/ +/-	nd	nd	43
C8	1:16384/ 1:512	+/ +	nd	nd	41
C9	1:16384/ 1:256	+/ (+)	-	-	47
C10	1:320/ 1:16	(+)/ +/-	nd	nd	34
C11	1:16384/ 1:4096	+/ +	(+)	(+)	32
C12	1:1280/ 1:8	+/ -	nd	nd	36

Abkürzungen: -, negativ; +, positiv; (+), schwach positiv; +/-, grenzwertig positiv; IgM, IgM-FTA-ABS-Test; 19S-IgM, 19S-IgM-FTA-ABS-Test; nd, nicht durchgeführt.

3.2 Molekularbiologische Untersuchungen

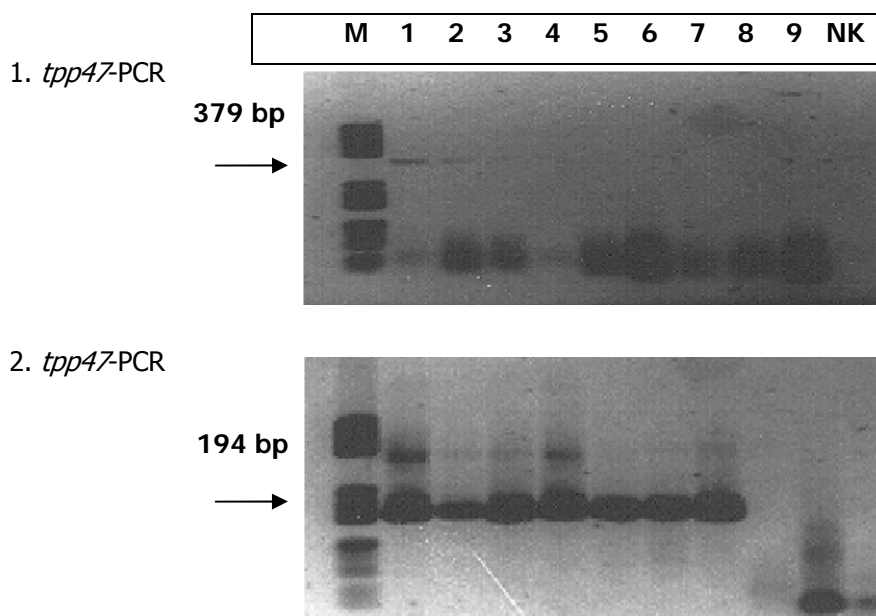
Molecular biologic investigations

3.2.1 PCR-Sensitivität nach *T. pallidum*-Verdünnungsreihe

PCR sensitivity based on limiting dilution of T. pallidum

Für die Feststellung der PCR-Sensitivität wurde eine Verdünnungsreihe einer Treponemen-Suspension (1000 *T. pallidum*/ ml) eingesetzt. Die Nachweisgrenze in der Gel-Elektrophorese der 1. *tpp47*-PCR lag bei 400 *T. pallidum*/ Probe, der 2. *tpp47*-PCR bei 10 *T. pallidum*/ Probe (Abbildung 13).

Abbildung 13. Gel-Elektrophorese der 1. und 2. *tpp47*-PCR mit der *T. pallidum*-Verdünnungsreihe



Bahn	<i>T. pallidum</i> -Konzentration (<i>Tp</i> /μl)	<i>T. pallidum</i> -Menge (<i>Tp</i> /Probe)
1	250	1000
2	100	400
3	50	200
4	25	100
5	10	40
6	5	20
7	2,5	10
8	1	4
9	0,5	2

Abkürzungen: M, DNA-Marker (PhiX174 DNA-Hae III Digest); NK, Negativkontrolle.

3.2.2 *T. pallidum*-PCR, β -Actin-PCR, DNS-Hybridisierung im Patientenkollektiv

T. pallidum PCR, β Actin PCR, DNA hybridization in patients

3.2.2.1 Patienten mit Syphilis (Gruppe A)

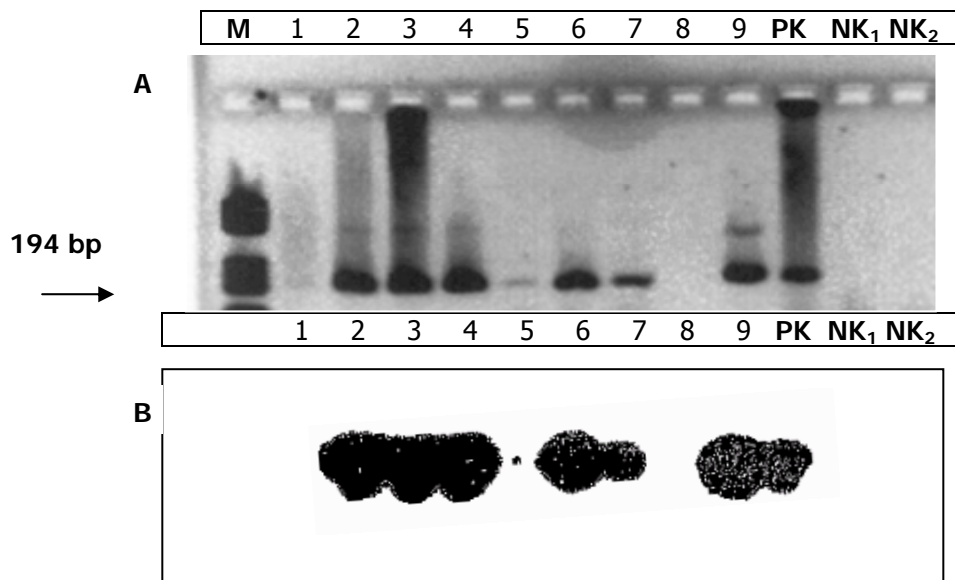
Patients with syphilis (group A)

Nach der Etablierung der PCR sollte nun am Patienten mit Syphilis untersucht werden, ob die *tpp47*-PCR zur Diagnostik einer manifesten oder latenten Syphilis genutzt werden kann. Vor allem sollten hierbei gezeigt werden, welches Probenmaterial am besten für den Nachweis von *T. pallidum* mittels PCR geeignet ist. Daher wurden von Patienten mit gesicherter Syphilis Haut- und Blutproben, Ejakulat und Lymphknotenpunktion gewonnen. Die Blutproben wurden mittels Dichtgradient-Zentrifugation in verschiedenen Fraktionen aufgetrennt: periphere Blutmonozyten (PBMC) und Granulozyten. Mittels Hoch- und Niedriggeschwindigkeit-zentrifugation wurden die PBMC-Fraktion weiter auf Überstand und Sediment getrennt, um den Einfluss von den Zentrifugationsgeschwindigkeiten auf den *T. pallidum*-Präsenz im Überstand oder Sediment mit PCR zu untersuchen.

Nach der Gewinnung der Patientenproben, wurde eine DNS-Isolierung und eine nested-PCR mit spezifischen Primer für das *tpp47*-Gen der *T. pallidum* durchgeführt. Das Amplikon wurde mittels der Gel-Elektrophorese untersucht und anschließend zur Überprüfung der Spezifität des Amplikons mittels Southern Blot auf Membran übertragen, mit radioaktiv markiertem spezifischen Oligonukleotid hybridisiert und autoradiographisch analysiert (**Abbildung 14**).

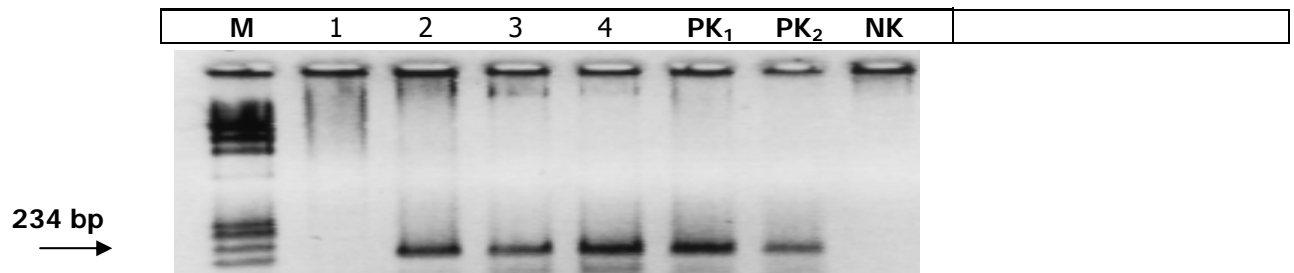
Für die Kontrolle der DNS-Isolation aus den Patientenproben wurde β -Actin-PCR parallel mit der 1. *tpp47*-PCR durchgeführt. Um die Menge der isolierten DNS einschätzen zu können, wurden die Proben unverdünnt und in einer Verdünnung von 1:10 in der β -Actin-PCR amplifiziert und in der Gel-Elektrophorese analysiert (**Abbildung 15**). Alle zellhaltigen Patientenproben (HSC-P, LSC-P, Granulozyten, Ejakulat, Hautbiopsate und Lymphknoten-Punktate) wurden parallel zur *tpp47*-PCR in der β -Actin-PCR getestet. Nur wenn die β -Actin-PCR positiv war, wurden die *T. pallidum*-PCR analysiert. Für DNS-Isolierung aus den zellreichen und den zellarmen Proben (Serum, Abstriche, HSC-S, LSC-S) parallel und gleichzeitig durchgeführt wurde, konnte man die positiven β -Actin-PCR-Ergebnisse der zellreichen Proben benutzen, um die DNS-Isolierung für den zellarmen Proben indirekt zu kontrollieren.

Abbildung 14. Gel-Elektrophorese (A) und Blot-Hybridisierung (B) des 194 bp-Amplikons nach 2. *tpp47*-PCR mit Proben von Patienten mit Syphilis



Bahn	Patienten-Nr.	Syphilis-Stadium	Material	<i>T. pallidum</i> -PCR
1	A1	Primäre	HSC-P	-
2	A2	Primäre	HSC-P	+
3	A3	Primäre	HSC-P	+
4	A1	Primäre	Haut	+
5	A1	Primäre	LSC-P	-
6	A2	Primäre	LSC-P	+
7	A3	Primäre	LSC-P	+
8	A1	Primäre	Serum	-
9	A2	Primäre	Serum	+
PK			<i>T. pallidum</i> (1,25 x 10 ⁴ /μl)	+
NK ₁			Wasser	-
NK ₂			HSC-P	-

Abkürzungen: M, DNS-Marker (PhiX174 DNA-Hae III Digest); PK, Positivkontrolle; NK₁, Negativkontrolle mit Wasser; NK₂, Negativkontrolle mit Proben von Patienten ohne Syphilis und HIV-Infektion; HSC-P (high speed centrifugation pellet), Pellet der PBMC-Fraktion nach der Hochgeschwindigkeit zentrifugation (15000 *g*); LSC-P (low speed centrifugation pellet), Pellet der PBMC-Fraktion nach der Niedriggeschwindigkeit zentrifugation (500 *g*); HSC-S (high speed centrifugation supernatant), Überstand der PBMC-Fraktion nach der Hochgeschwindigkeit zentrifugation; LSC-S (low speed centrifugation supernatant), Überstand der PBMC-Fraktion nach der Niedriggeschwindigkeit zentrifugation

Abbildung 15. Gel-Elektrophorese der β -Actin-PCR mit und ohne 1:10-Verdünnung

Bahn	Patienten-Nr.	Material	β -Actin-PCR
1	A1	HSC-P (1:10)	-
2	A1	HSC-P	+
3	A2	HSC-P (1:10)	+
4	A2	HSC-P	+
PK ₁		PBMC (1:10)	+
PK ₂		PBMC	+
NK		Wasser	-

Abkürzungen: s. Abb. 14

Treponemale DNS wurde nach Amplifikation der zweiten *tpp47*-PCR, anschließender Gel-Elektrophorese und Blot-Hybridisierung bei 14 von 15 Patienten (93,3 %) mit Syphilis aus der Gruppe A nachgewiesen: bei 13/15 (86,6 %) Patienten im Blut, bei 6/6 (100 %) Patienten in Hautläsionen (2/2 Schanker-Abstrichen, 4/4 Hautbiopsien), bei 2/4 (50 %) im Ejakulat, bei 3/4 (75 %) in Lymphknoten-Punktaten, aber nicht im Rachenabstrich (**Tabelle 13**).

Bei manifester Syphilis war *T. pallidum*-DNS bei allen 8 Patienten (100 %) nachweisbar, und bei latenter bei 6/7 Patienten (85,7 %). *T. pallidum*-DNS wurde in allen Blutfraktionen nachgewiesen, wobei die PBMC-Fraktion mit 13/15 (86,7 %) Proben am häufigsten positiv war, gefolgt von den Serumproben mit 10/15 (66,7 %) und den Granulozyten mit 5/15 (33,3 %) (**Tabelle 13**).

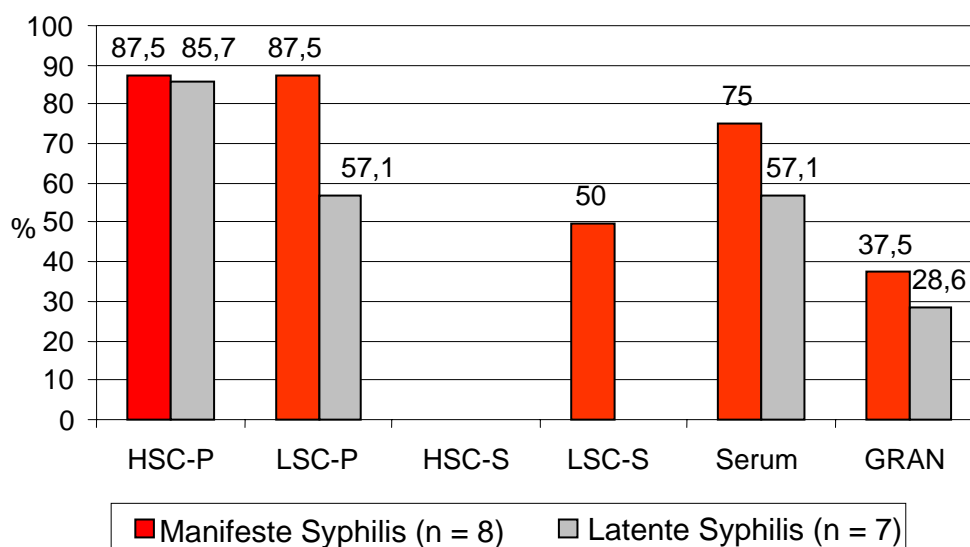
Bei der manifesten Syphilis wurde *T. pallidum*-DNS in 7/8 (87,5 %) der HSC-P-Proben, in 7/8 (87,5 %) der LSC-P-Proben, in 4/8 (50 %) der LSC-S-Proben, aber in keiner der HSC-S-Proben nachgewiesen. Bei Patient A1 mit primärer Syphilis (**Tabelle 13**) wurde *T. pallidum*-DNS nicht im Blut, jedoch im Schanker-Abstrich nachgewiesen.

Bei latenter Syphilis wurde *T. pallidum*-DNS in 6/7 (85,7 %) der HPS-P-Proben und in 4/7 (57,1 %) der LSC-P-Proben nachgewiesen. Die HSC-S und LSC-S waren dagegen bei latenter

Syphilis in der *tpp47*-PCR negativ (**Abbildung 14, Tabelle 13**). Bei Patient A12 mit Spätsyphilis wurde keine *T. pallidum*-DNS in den Blutfraktionen gefunden.

Die diagnostische Sensitivität der *tpp47*-PCR von verschiedenen Proben von Patienten mit manifester und latenter Syphilis ist in **Abbildung 16** dargestellt.

Abbildung 16. Diagnostische Sensitivität (% positiven Proben) der 2. *tpp47*-PCR bei Patienten mit Syphilis (Gruppe A)



Abkürzungen: HSC-P, PBMC-Pellet nach der Hochgeschwindigkeitzentrifugation; LSC-P, PBMC-Pellet nach der Niedriggeschwindigkeitzentrifugation; HSC-S, PBMC-Supernatant nach der Hochgeschwindigkeitzentrifugation; LSC-S, PBMC-Supernatant nach der Niedriggeschwindigkeitzentrifugation; GRAN, Granulozyten

3.2.2.2 Patienten mit behandelter Syphilis und Neurosyphilis (Gruppen C und D)

Patients with treated syphilis & neurosyphilis (groups C & D)

In Serum- und Liquorproben von Patienten aus den Gruppen C und D (nach der Therapie der Syphilis und Neurosyphilis) war keine *T. pallidum*-DNS nachweisbar. Die positive Kontrolle für *T. pallidum* war positiv.

Tabelle 13. Syphilis-Stadium, HIV-Status, Syphilis-Serologie und *tpp47*-PCR, analysiert mittels Gel-Elektrophorese und Blot-Hybridisierung bei Patienten mit Syphilis (Gruppe A)

Patient-Nummer	Syphilis-Stadium	HIV-Status (CDC)	Syphilis-Serologie		PCR										
			VDRL	19S-IgM (Titer)	HSC-P	LSC-P	HSC-S	LSC-S	Serum	GRAN	Haut	Ejakulat	LYMPH	Rachen	
A1	primär	-	1:2	(+)	-	-	-	-	-	-	-	+ ^A	nd	nd	-
A2	primär	+ (B2)	1:16	(+)	+	+	-	+	+	-	+ ^{A#}	+	nd	-	
A3	sekundär	-	1:32	+	+	+	-	+	+	+	+ ^B	nd	nd	-	
A4	sekundär	-	1:64	+	+	+	-	+	+	-	+ ^B	nd	nd	-	
A5	sekundär	-	1:32	+	+	+	-	+ ^{&}	+	-	nd	-	nd	-	
A6	sekundär	+ (A1)	1:64	+	+	+	-	-	+	-	+ ^B	nd	+	-	
A7	sekundär	+ (B2)	1:16	+	+	+	-	-	-	+	+ ^B	+ ^{&}	nd	-	
A8	sekundär	-	1:32	-	+	+	-	-	+	+	nd	nd	+	-	
A9	früh latent	-	1:16	+	+	-	-	-	+	-	nd	nd	nd	-	
A10	früh latent	-	1:16	+	+	+	-	-	+	-	nd	-	nd	-	
A11	früh latent	-	1:16	+	+	+	-	-	-	+	nd	nd	+	-	
A12	spät latent	-	1:4	+/-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	-	
A13	spät latent	-	1:8	+/-	+	+	-	-	-	-	nd	nd	-	-	
A14	(spät) latent*	+ (B2)	1:8	-	+	+	-	-	+	-	nd	nd	nd	-	
A15	(spät) latent*	+ (A1)	-	(+)	+ [§]	-	-	-	+	+	nd	nd	nd	-	

Abkürzungen: +, positiv; (+), schwach positiv; +/-, grenzwertig positiv; -, negativ; 19S-IgM, 19S-IgM-FTA-ABS-Test; ^A, Schanker-Abstrich; ^B, Biopsie; *, Verdacht auf (spät) latente Syphilis; #, Analabstrich; &, positive Probe in DNS-Hybridisierung; nd, nicht durchgeführt; [§], positive PCR in der 3x (379 bp)-Amplikon-PCR; HSC-P, PBMC-Pellet nach der Hochgeschwindigkeit zentrifugation; LSC-P, PBMC-Pellet nach der Niedriggeschwindigkeit zentrifugation; HSC-S, PBMC-Supernatant nach der Hochgeschwindigkeit zentrifugation; LSC-S, PBMC-Supernatant nach der Niedriggeschwindigkeit zentrifugation; GRAN, Granulozyten; LYMPH, Lymphknoten-Punktat; Rachen, Rachenabstrich

3.2.3 Diagnostische Sensitivität der Gel-Elektrophorese vs. DNS-Hybridisierung

Diagnostic sensitivity of gel electrophoresis vs. DNA hybridization

Die DNS-Hybridisierung dient zur Überprüfung der Spezifität des Amplikons bei der Etablierung der PCR. Die Hybridisierung kann auch die diagnostische Sensitivität der Untersuchung dadurch erhöhen, dass bei der Gel-UV-Transilluminierung die schwach sichtbare DNS-Bande nach der spezifischen DNS-Hybridisierung ein verstärktes und gut identifizierbares Signal zeigt. Dank dieser Signal-Verstärkung kann man den Erreger mittels der PCR sensitiver nachweisen.

Es wurde insgesamt von 35 Patienten 586 Proben mittels 1. *tpp47*-PCR und 300 Proben mittels 2. *tpp47*-PCR analysiert (**Tabelle 14**).

Der Unterschied in der Probenzahl lag daran, dass die einfache (1x) und dreifache (3x) Menge des 379 bp-Amplikons in die 2. *tpp47*-PCR untersucht wurde. Nach 2. *tpp47*-PCR wurden 300 Proben elektrophoretisch getrennt und im Southern-Blot hybridisiert.

Tabelle 14. Zahl der Proben von den Patienten der Gruppen A – C in 1. und 2. *tpp47*-PCR

Proben (Probenzahl pro Patient)	Zahl der untersuchten Patienten (untersuchten Proben in 1. <i>tpp47</i> -PCR / 2. <i>tpp47</i> -PCR)			Zahl der untersuchten Proben in 1. <i>tpp47</i> -PCR / 2. <i>tpp47</i> -PCR
	Gruppen			
	A (n = 15)	B (n = 10)	C (n = 12)	
Serum (4)	15 (60 / 30)	10 (40 / 20)	12 (48 / 24)	148 / 74
HSC-P (4)	15 (60 / 30)			60 / 30
LSC-P (4)	15 (60 / 30)			60 / 30
HSC-S (4)	15 (60 / 30)			60 / 30
LSC-S (4)	15 (60 / 30)			60 / 30
Granulozyten (4)	15 (60 / 30)			60 / 30
Rachen-Abstrich (3)	15 (60 / 30)			60 / 30
Schanker-Abstrich (3)	2 (6 / 6)			6 / 6
Lymphknoten (1)	4 (4 / 4)			4 / 4
Ejakulat (3)	4 (16 / 8)			16 / 8
Hautbiopsie (1)	4 (4 / 4)			4 / 4
Liquor (4)			12 (48 / 24)	48 / 24
Gesamt				586 / 300

Abkürzungen: S. Tab. 13

Die Gel-Elektrophorese zeigte 97 % diagnostischer Sensitivität im Vergleich mit der DNS-Hybridisierung insgesamt in allen untersuchten Proben. Eine höhere diagnostische Sensitivität (98,1 %) wurde bei der Gel-Analyse der 2. *tpp47*-PCR bei der Untersuchung der PBMC, gewonnen mittels Hoch- und Niedriggeschwindigkeitszentrifugation (HSC-P, HSC-S, LSC-P, LSC-S), sog. PBMC-Gesamt gezeigt (**Tabelle 15**).

Diese Analyse zeigte, dass die DNS-Hybridisierung unter der gegebenen Bedingungen die diagnostische Sensitivität der Untersuchung nur um 2 - 3 % erhöht.

Tabelle 15. Sensitivität der Gel-Elektrophorese vs. DNS-Hybridisierung nach 2. *tpp47*-PCR

Untersuchte Proben (n)	positive Proben (n)		Sensitivität (%)
	in Gel-Elektrophorese	in DNS-Hybridisierung	
Serum (74)	20	20	100
PBMC-Gesamt* (120)	53	54	98,1
Granulozyten (30)	10	10	100
Rachen-Abstrich (30)	0	0	-
Schanker-Abstrich (4)	4	4	100
Lymphknoten (4)	3	3	100
Ejakulat (8)	2	4	50
Hautbiopsie (4)	4	4	100
Liquor (24)	0	0	-
Gesamt	96	99	97

Abkürzungen: *, gesamte Ergebnisse von HSC-P, LSC-P, HSC-S, LSC-S von einem Patient

3.2.4 Diagnostische Sensitivität der 1x vs. 3x (379 bp-Amplikon)-PCR

Diagnostic sensitivity 1x vs. 3x (379 bp Amplikon) PCR

Für die Untersuchung des Einflusses der Probenmenge auf die diagnostische Sensitivität wurde die einfache (1x) und dreifache (3x) Probenmenge mittels *tpp47*-PCR analysiert. Bei der 1x (379 bp-Amplikon)-PCR wurde das 379 bp-Amplikon nach der 1. *tpp47*-PCR konzentriert und in der 2. *tpp47*-PCR amplifiziert. Bei der 3x (379 bp-Amplikon)-PCR wurden drei identische Proben desselben Patienten gleichzeitig in der 1. *tpp47*-PCR amplifiziert, dann das 379 bp-Amplikon von drei gleichen Proben konzentriert, gepoolt und die dreifache 379 bp-Amplikon-Menge in der 2. *tpp47*-PCR eingesetzt und amplifiziert.

Beim Vergleich der 1x (379 bp-Amplikon)-PCR mit der 3x (379 bp-Amplikon)-PCR war nur bei einer HSC-P-Probe ein Unterschied auffällig. Dabei war die 3x (379 bp-Amplikon)-PCR

positiv bei negativer 1x (379 bp-Amplikon)-PCR. So zeigte die 1x (379 bp-Amplikon)-PCR eine diagnostische Sensitivität von 98 % (48/49) im Vergleich zur 3x (379 bp-Amplikon)-PCR, was diagnostisch nicht relevant ist (**Tabelle 16**).

Tabelle 16. Diagnostische Sensitivität der 1x vs. 3x (379 bp-Amplikon)-PCR

Proben	Zahl der positiven Proben in 1x / 3x (379 bp-Amplikon)-PCR (%)
Serum	10/10 (100)
HSC-P	12/13 (92,3)
LSC-P	11/11 (100)
HSC-S	0/0
LSC-S	4/4 (100)
Granulozyten	5/5 (100)
Lymphknoten	3/3 (100)
Ejakulat	2/2 (100)
Gesamt	48/49 (98)

Abkürzungen: s. Tab. 13

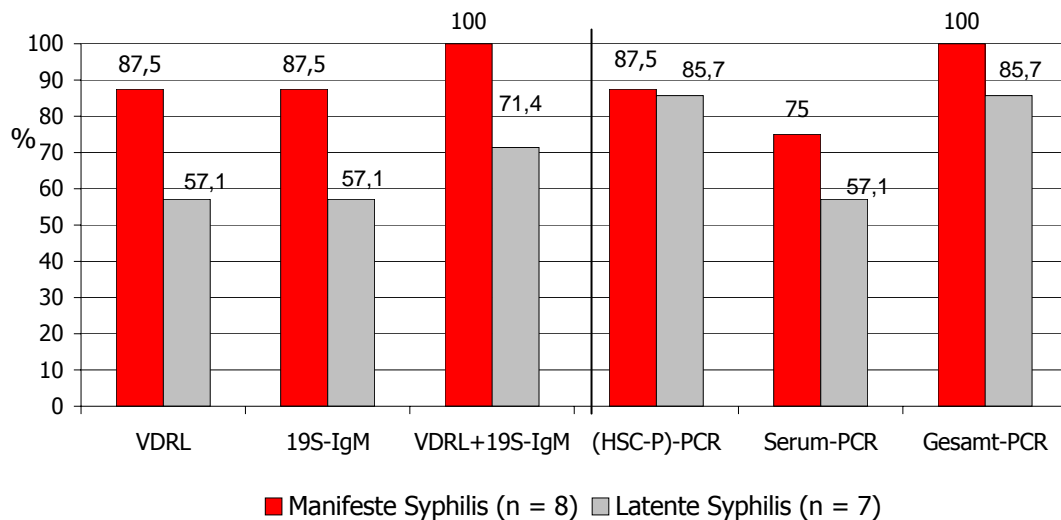
3.2.5 Diagnostische Sensitivität der *T. pallidum*-PCR vs. Serologie

Diagnostic sensitivity of T. pallidum PCR vs. serology

Da HSC-P und Serum in der *tpp47*-PCR die höchste diagnostische Sensitivität zeigten, wurden diesen Proben mit den Ergebnissen von VDRL und 19S-IgM-FTA-ABS-Test von Patienten mit manifester und latenter Syphilis (Gruppen A) verglichen. Der VDRL wurde als „positiv“ bewertet, wenn der VDRL-Titer $\geq 1:8$ war und keine anamnestic Angaben über eine Syphilis-Therapie vorlagen. Um die qualitative PCR mit dem semiquantitativem 19S-IgM-FTA-ABS-Test vergleichen zu können, wurden schwach positive und positive Proben im 19S-IgM-FTA-ABS-Test als „positiv“ bezeichnet und für die Analyse benutzt. Der grenzwertig positive 19S-IgM-FTA-ABS-Test wurde nicht in die Analyse einbezogen, da mit grenzwertig positivem Befund keine Syphilis bestätigt oder ausgeschlossen werden kann. Im getrennten Vergleich von VDRL und 19S-IgM-FTA-ABS-Test zeigte die (HSC-P)-PCR bei manifester Syphilis eine gleichwertige Sensitivität (87,5 %), aber eine weit höhere Sensitivität bei latenter Syphilis (87,7 %) im Vergleich zum VDRL und 19S-IgM-FTA-ABS-Test (57,1 %). Wenn man die positiven Ergebnisse aus VDRL und 19S-IgM-FTA-ABS-Test summiert, dann ist die diagnostische Sensitivität von VDRL+19S-IgM-FTA-ABS-Test bei manifester Syphilis höher als die der (HSC-P)-PCR (100 % vs. 87,5 %), aber bei latenter Syphilis

niedriger als die der PCR (71,4 % vs. 85,7 %). Die Sensitivität der Serum-PCR bei manifester Syphilis ist niedriger als die von VDRL oder 19S-IgM-FTA-ABS-Test, 75 % zu 87,5 %. Bei latenter Syphilis lag die Sensitivität der PCR auf dem gleichen Niveau wie die Serologie, 57,1 % (**Abbildung 17**).

Abbildung 17. Diagnostische Sensitivität (% positiven Proben) der Syphilis-Serologie und der 2. *tp47*-PCR bei Patienten mit Syphilis (Gruppe A)



Syphilis-Form	positive Serologie			positive PCR		
	VDRL	19S-IgM	VDRL+19S	HSC-P	Serum	Gesamt
Manifeste (n = 8)	7	7	8	7	6	8
Latente (n = 7)	4	4	5	6	4	6

Abkürzungen: 19S-IgM, 19S-IgM-FTA-ABS-Test; HSC-P, PBMC-Pellet, gewonnen durch Hochgeschwindigkeit zentrifugation; Gesamt-PCR, Gesamtzahl der in PCR positiven Proben von einem Patienten

Bei allen untersuchten Patienten zeigte die (HSC-P)-PCR eine höhere Sensitivität als die PCR aus anderen Blutfraktionen. Bei einem Patient mit Primärsyphilis (A1, **Tabelle 13**) waren alle Blutfraktionen in der PCR negativ, der läsionale Abstrich jedoch positiv. Um die Nachweisbarkeit von *T. pallidum*-DNS mittels PCR in Patientenproben zu prüfen und mit der Serologie vergleichen zu können, wurden für jeden Patient alle in der PCR positiven Proben summiert und mit VDRL+19S-IgM-FTA-ABS-Test verglichen. Diese „Gesamt“-PCR ist im Vergleich mit VDRL+19S-IgM-FTA-ABS-Test bei manifester Syphilis gleich sensitiv (100 %), aber bei latenter Syphilis ist die „Gesamt“-PCR etwas sensitiver: 85,7 % vs. 71,4 % bei VDRL+19S-IgM-FTA-ABS-Test. Das spricht dafür, dass beim Verdacht auf Primärsyphilis

nicht nur HSC-P-Proben, sondern unbedingt die läsionalen Hautabstriche mittels PCR untersucht werden sollten.

3.2.6 PCR-Diagnostik der Syphilis bei einigen ausgewählten Patienten

PCR diagnosis of syphilis in some selected patients

3.2.6.1 Nachweis der *T. pallidum*-DNS im Schanker *Detection of T. pallidum DNA in chancre*

Bei einem 31-jährigen Patienten (A1, **Tabellen 10** und **13**) war binnen 10 Tagen auf der Glans penis zunächst ein Erythem, gefolgt von einer schmerzlosen Erosion (erosiver Schanker) aufgetreten (**Abbildung 18**). Die Syphilis-Serologie zeigte: TPHA-Test 1:320, VDRL 1:2, IgG-FTA-ABS-Test positiv, IgM-FTA-ABS-Test positiv, 19S-IgM-FTA-ABS-Test schwach positiv. Der HIV-Status war negativ. Im Reizserum wurde *T. pallidum*-DNS nachgewiesen. Die Dunkelfeldmikroskopie im Reizserum war ebenfalls positiv. Die PCR aus Blutproben und Rachenabstrichen war negativ.

Abbildung 18. Erosion an der Glans: im Reizserum wurde *T. pallidum*-DNS nachgewiesen

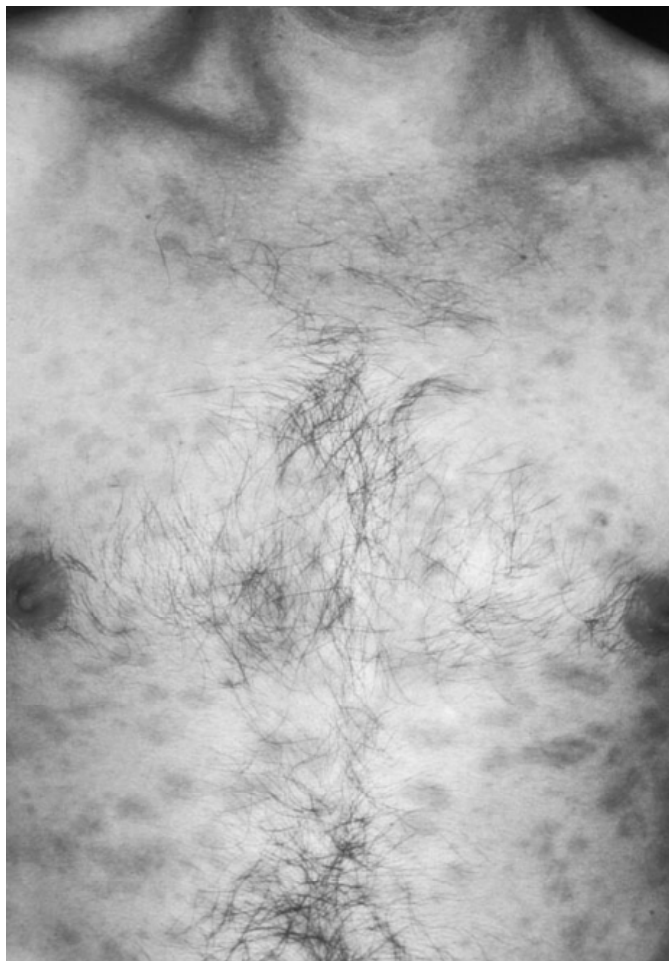


3.2.6.2 Nachweis der *T. pallidum*-DNS im makulösen Syphilid

Detection of T.pallidum DNA in macular syphilid

Bei einem 28jährigen Patient (A4, **Tabellen 10** und **13**) entwickelte sich binnen etwa 2 Wochen ein Exanthem am gesamten Integument ohne subjektive Symptomatik (**Abbildung 19**). Die Syphilis-Serologie zeigte: TPHA-Test 1:2560, VDRL 1:64, IgG-FTA-ABS-Test positiv, IgM-FTA-ABS-Test positiv, 19S-IgM-FTA-ABS-Test positiv. Die HIV-Serologie war negativ. Der Patient erinnerte keine Schleimhautdefekte im Genitalbereich. Sowohl im Hautbiopsat aus einer Makula, als auch aus Blutproben gelang der Nachweis von *T. pallidum*-DNS. Die Silber-Färbung für *T. pallidum* war negativ.

Abbildung 19. Makulöses Exanthem bei sekundärer Syphilis: im Hautbiopsat aus einer Makula wurde *T. pallidum*-DNS nachgewiesen



3.2.6.3 Latente oder sekundäre Syphilis bei HIV-Koinfektion? Diagnose mittels PCR

Latent or secondary syphilis in HIV co-infection? Diagnosis made by PCR

Bei einem 37jährigen Patienten (A7, **Tabellen 10** und **13**) mit seit sechs Jahren bekannter HIV-Infektion (CDC-Stadium B2) entwickelten sich binnen weniger Wochen zunehmend symptomlose Erytheme an Stirn, Extremitäten und Stamm mit nachfolgender Umwandlung in kleine Papeln, Pusteln und verkrustete Erosionen (**Abbildung 20**). Die Syphilis-Serologie war positiv: TPHA-Test 1:10240, VDRL 1:16, IgG-FTA-ABS-Test positiv, IgM-FTA-ABS-Test schwach positiv, 19S-IgM-FTA-ABS-Test positiv. Die HIV-Serologie war positiv: HIV-ELISA, HIV-Westernblot und p24-HIV-Antigen. Die Zellzahl betrug: CD4-T-Lymphozyten 215/ μ l (Norm > 500/ μ l), CD8-T-Lymphozyten 795/ μ l (Norm 200 – 800/ μ l), CD4/CD8-Verhältnis 0,27 (Norm 0,7 - 2,8). Die HIV-Viruslast im Plasma betrug 3574 HIV-1 RNA-Kopien/ml.

Abbildung 20. Papulopustulöses Exanthem bei sekundärer Syphilis bei einem HIV-positiven Patienten: im Biopsat einer Papel wurde *T. pallidum*-DNS nachgewiesen (Kouznetsov & Prinz, 2002 [81]); differenzialdiagnostisch kamen eine bakterielle Follikulitis, eine *Pityrosporum ovale*-Follikulitis, eine eosinophile Follikulitis bei HIV-Infektion und eine Akne vulgaris in Frage

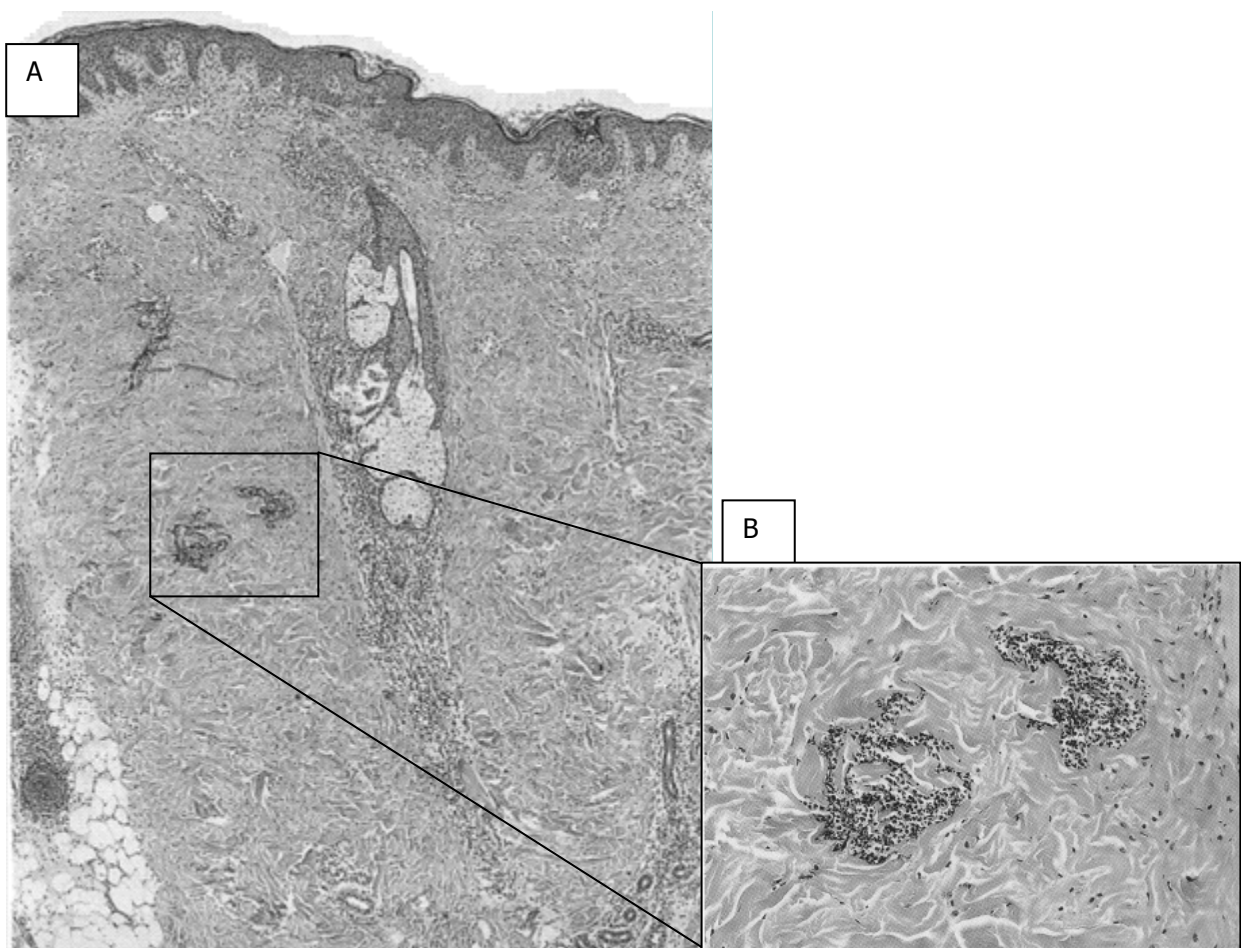


Da das klinische Bild des Exanthems nicht eindeutig für Syphilis (Polymorphie der Effloreszenzen, Asymmetrie der Verteilung) sprach, wurde zunächst der Verdacht auf eine latente Syphilis gestellt und die Hautveränderungen als bakterielle Follikulitis klassifiziert. Differenzialdiagnostisch erwogen wurden eine eosinophile Follikulitis bei HIV-Infektion, eine *Pityrosporum*-Follikulitis oder Akne vulgaris.

Die Histologie einer Papel vom Oberarm zeigte perifollikulär ein lymphozytäres Infiltrat, im Korium neutrophile Granulozyten, aber keine Plasmazellen (**Abbildung 21**). Die Silber-Färbung war negativ. Die Abwesenheit von Plasmazellen und die negative Silber-Färbung ließen die Diagnose einer manifesten Syphilis nicht eindeutig zu.

Durch PCR gelang der Nachweis von *tpp47* in läsionaler Haut, PBMC und Granulozyten-Fraktion, aber nicht in gesunder Haut, was für eine sekundäre Syphilis sprach.

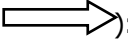

Abbildung 21. Histologie der biopsierten Papel: perifollikuläres lymphohistiozytäres Infiltrat (A), neutrophile Granulozyten im Korium (B), keine Plasmazellen (Haematoxilin-Eosin-Färbung) (Kouznetsov & Prinz, 2002 [81])

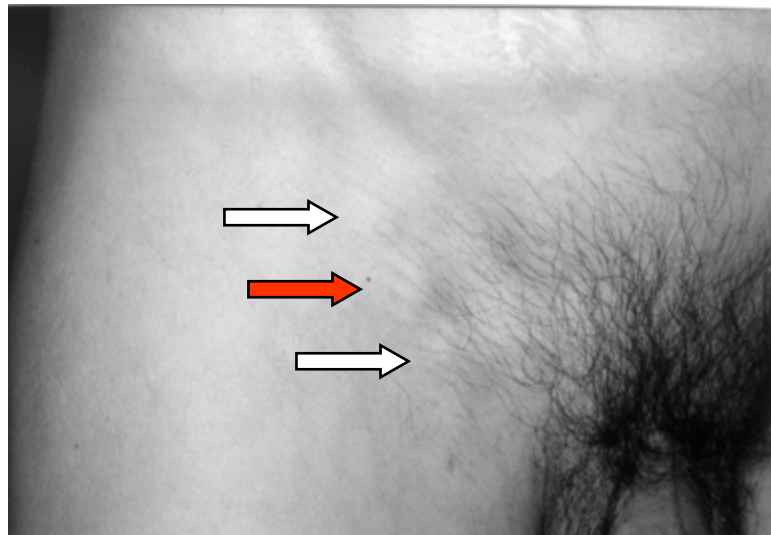


3.2.6.4 Lymphadenopathie bei latenter Syphilis: Nachweis von *T. pallidum*-DNS

Lymphadenopathy in latent syphilis: detection of T. pallidum DNA

Bei einem 26jährigen Patienten (A11, **Tabellen 10** und **13**) ohne Hautveränderungen wurde eine positive Serologie festgestellt: TPHA-Test 1:640, VDRL 1:16, IgG-FTA-ABS-Test positiv, IgM-FTA-ABS-Test kompetitiv gehemmt, 19S-IgM-FTA-ABS-Test positiv. Eine Polylymphadenopathie wurde klinisch und sonographisch festgestellt. Aus einem vergrößerten inguinalen Lymphknoten (**Abbildung 22**) und aus Blutfraktionen (HSC-P, LSC-P, Granulozyten) wurde *T. pallidum*-DNS nachgewiesen.

Abbildung 22. Inguinale Lymphadenitis im Rahmen der Polylymphadenopathie (): im Lymphknoten-Punktat aus der Leiste wurde *T. pallidum*-DNS () nachgewiesen (Kouznetsov & Prinz, 2002 [80])



IV. DISKUSSION

DISCUSSION

Die Diagnostik der Syphilis basiert heute wesentlich auf serologischen Untersuchungen. Die Ergebnisse sind jedoch nicht in allen Fällen eindeutig. Besonders bei HIV-Koinfektion oder Autoimmunerkrankungen wie die Lupus erythematoses kann die Diagnose bzw. der Ausschluß einer Syphilis auf zusätzlicher Untersuchung angewiesen sein. In dieser Arbeit wurde in Patientengut mit Syphilis oder Syphilisverdacht klinisch, serologisch und mittels *tpp47*-PCR charakterisiert.

Nur durch die Kombination von klinischen und serologischen Daten waren die Syphilis-Stadien bei den Patienten der Gruppe A klassifizierbar. Klinischen Verdacht auf Syphilis konnte man bei den Patienten A1 bis A8 (**Tabelle 10**) mit einer primären oder sekundären Syphilis entsprechenden Hautveränderungen äußern. Bei den Patienten A9 bis A15 ohne Hautbefunde konnte man eine Syphilis nur auf Grund der Kombination von mehreren serologischen Nachweismethoden feststellen, da einzelne Tests nicht immer aussagekräftig waren. So war etwa der TPHA-Test bei 2/15 Patienten (A2 und A15) und der VDRL bei drei Patienten (Patienten A1, A12, A15) negativ. Da der IgG-FTA-ABS-Test keine Aussage zur vorhandenen Infektion machen kann, wurden IgM- und 19S-IgM-FTA-ABS-Test analysiert. Der IgM-FTA-ABS-Test zeigte eine kompetitive Hemmung bei 7/15 Patienten und war grenzwertig positiv oder negativ bei weiteren 4/15 Patienten und damit zur Diagnosesicherung nicht brauchbar. Der 19S-IgM-FTA-ABS-Test zeigte auch bei 4/15 Patienten grenzwertig positive oder negative Werte. So war die serologische Diagnose aus der Kombination der Tests möglich und erzielte für manifeste Syphilis, z.B. bei Kombination von VDRL und 19S-IgM-FTA-ABS-Test 100 %-tige Positivität, bei latenter Syphilis dagegen nur 71 %-tige (**Abbildung 16**).

Die Patienten nach Therapie einer Syphilis oder Neurosyphilis (Gruppen B und C) zeigten positive IgM-Serologie ohne klinische Symptomatik. Da die Patienten behandelt worden waren, spiegelt die serologische Positivität die Seronarbe (persistierende Antikörperbildung) nach einer Syphilis-Infektion wieder. Auf Grund der Abnahme des VDRL-Titers oder der VDRL-Negativierung kann man zusammenschließen, dass alle Patienten der Gruppe B ausreichend behandelt wurden und keine Syphilis mehr hatten. Andererseits ist bekannt, dass VDRL bei Spätsyphilis negativ oder mit niedrigem Titer (1:2 - 1:4) positiv sein kann.

Unsere Patienten zeigten hier die Grenzen der serologischen Syphilisdiagnostik auf, wie:

- (falsch)-negative TPHA- oder VDRL-Tests bei HIV-Koinfektion oder im Anfangsstadium der Infektion;

- kompetitive Hemmung des IgM-FTA-ABS-Tests durch Hyperproduktion von IgG-Antikörpern,
- falsch negativer 19S-IgM-FTA-ABS-Test bei HIV-Koinfektion.

Diese „serologischen Probleme“ werden besonders bei der Diagnostik der latenten Syphilis-Infektion sichtbar und erfordern die Anwendung anderer diagnostischer Methoden, wie z.B. der PCR-Diagnostik.

Alle Proben wurden bei der Vorbereitung und DNS-Isolierung und bis zum Gel-Elektrophorese und DNS-Hybridisierung nach gängigen Richtlinien für molekularbiologische Untersuchungen gehandhabt (Orrego, 1990 [125]): räumliche Trennung von Rohproben und Amplikons, Benutzung von hochreinen Reagenzien und Materialien für molekularbiologische Untersuchungen, zügige Bearbeitung der frisch gewonnenen Proben und ihre Aufbewahrung bei -20 °C (flüssige Proben) oder bei -80 °C (Hautbiopsate). Dadurch konnte gewährleistet werden, dass die bei den nachfolgenden Untersuchungen gewonnenen Daten nicht durch Kontamination oder DNS-Abbau beeinflusst wurden.

Die Proben aus dem Max-von-Pettenkofer-Institut (Serum, Liquor) wurden nach der Gewinnung und dem Einfrieren mehrfach für interne wissenschaftliche Zwecke des Institutes aufgetaut. Die DNS-Qualität könnte dadurch abgenommen haben. Nach der „Good Laboratory Practice“ für molekularbiologische Untersuchungen sollten die analysierten Proben nur unmittelbar vor der Durchführung der molekularbiologischen Untersuchung aufgetaut werden. Andererseits zeigten Villanueva et al. (1998) [177] in einer Studie, dass dreimaliges Auftauen und Wiedereinfrieren der Liquor-Proben nicht zur Minderung der *T. pallidum*-Nachweisbarkeit mittels PCR führt: die positiven Proben bleiben nach dem wiederholten Auftauen positiv, so dass ein DNS-Abbau durch mehrmaliges Auftauen unwahrscheinlich erscheint.

Bei der Aufarbeitung der Proben wurde auch auf *Taq*-Polymerase hemmende Substanzen nach Innis & Gelfand (1990) [68], wie Heparin, Proteinase K, Nonidet P40, verzichtet. Die Erythrozyten wurden sorgfältig mittels Polymorphprep von den Granulozyten getrennt, um eine Kontamination mit den *Taq*-Polymerase hemmenden Porphyrinen zu vermeiden. Für die DNS-Isolierung wurde ein käufliches Reagenz (DNAzol[®] BD Reagent) benutzt, welches eine schnelle und saubere Isolierung gewährleistet [108]. Andere übliche Extraktionsmethoden, wie Phenol-Chloroform-Extraktion und Proteinase K-Verdau sind aufwändig und können bei

der Analyse von klinischem Untersuchungsmaterial wegen der vielen Zwischenschritte eine Kontaminationsgefahr darstellen.

Bei der Auftrennung des Blutes mittels Ficoll ($\rho = 1,078 \text{ g/ml}$) können sich die Treponemen wegen ihrer Dichte ($\rho = 1,051 \text{ g/ml}$ [56]) in der oberen PBMC-Fraktion anreichern (**Abbildung 7**). Alle anderen Blutfraktionen könnten aber auch durch die frei liegenden Treponemen, Treponema-assoziierte Blutzellen, oder durch die *T. pallidum*-DNS kontaminiert werden. Eine relevante Kontamination ist jedoch nach unseren Ergebnissen nur in Ausnahmefällen denkbar, da die *T. pallidum*-Nachweisbarkeit in den verschiedenen Blut-Fraktionen sehr unterschiedlich war. So war bei manifester Syphilis die *T. pallidum*-DNS in der PBMC-Fraktion, gewonnen durch die Hoch- und Niedriggeschwindigkeitszentrifugation (HSC-P), in 87,5 % der Fälle nachzuweisen, in Granulozyten aber nur in 37,5 % (**Abbildung 16**). Im Falle einer treponemalen Kontamination wären in allen Blut-Fraktionen etwa gleiche Nachweisbarkeitsraten zu erwarten gewesen.

Ein wichtiger Punkt bei der Durchführung der Lymphknoten-Punktionen war das Vermeiden von Kontaminationen durch sorgfältige Spülung des Vakuüm-Aspirators mittels DNase I-Lösung, HCl und mit Wasser, welches am Ende der Spülung in jeder PCR auf die Nachweisbarkeit von *T. pallidum*-DNS mitgetestet wurde. Dadurch wurde gesichert, dass die positive PCR aus dem Lymphknoten-Punktat wirklich die treponemale Infektion des Lymphknotens und nicht eine Kontamination des Aspirators widerspiegelte.

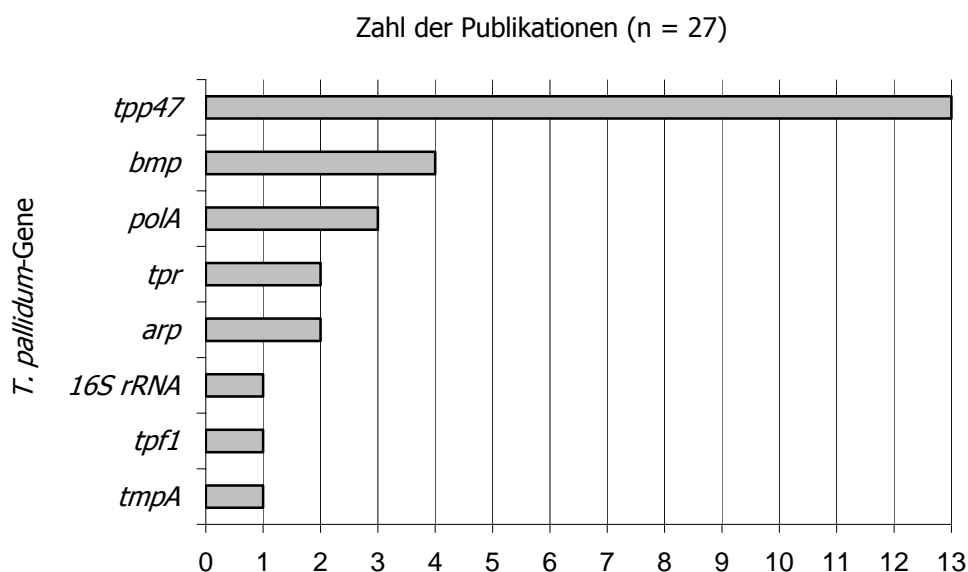
Um eine Kontamination bei der Gewinnung von Ejakulaten zu vermeiden, wurden Patienten mit Effloreszenzen an den Händen oder im Anogenitalbereich von der Ejakulatspende ausgeschlossen.

Hautbiopsien wurden nicht in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet, wie in der Arbeiten von Zoechling et al. (1997) [189], Wenhai et al. (2004) [182] oder Hoang et al. (2004) [62] beschrieben, sondern sofort nach der Entnahme in Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur PCR-Untersuchung aufbewahrt. Dadurch, dass die zusätzlichen Schritte wie Formalinfixierung und Entparaffinierung entfielen, konnte die PCR-Nachweisbarkeit möglicherweise gegenüber den erwähnten Publikationen noch weiter gesteigert werden.

Unser Hauptaugenmerk bei der Auswahl der Methoden für die vorliegende Arbeit war darauf gerichtet, dass diese einerseits maximale Sensitivität und Kontaminationsfreiheit gewährleisten sollten, andererseits jedoch in jedem klinisch-molekularbiologischen Routinelabor durchführbar sein sollten.

Für die Amplifizierung der *T. pallidum*-DNS wurde das *tpp47*-(47 kDa *Treponema pallidum* protein)-Gen ausgewählt, welches ein 47-kDa-Protein der äußeren Membran, das sog. *T. pallidum*-Hauptimmunogen-Protein kodiert. Dieses Gen wurde in den bis jetzt publizierten Studien anderer Arbeitsgruppen zur molekular-biologischen Syphilis-Diagnostik mit Abstand am häufigsten benutzt (48 % der Studien) (**Abbildung 23**).

Abbildung 23. In den publizierten PCR-Studien amplifizierten *T. pallidum*-Gene



In der vorliegenden Arbeit wurde das nested-PCR-Verfahren eingesetzt, um die Spezifität und Sensitivität der Untersuchung zu erhöhen. Kritiker dieses Verfahrens argumentieren, dass die nested-PCR als zweiteiliges PCR-Verfahren wegen des zweiten Schritts zur Kontamination führen könnte, besonders bei der klinischen Diagnostik [113]. Da in beiden PCR-Schritten zwei negative Kontrollen (Wasser und negative Probe) mituntersucht wurden, hätten mögliche Kontaminationen aufgedeckt werden müssen. Außerdem wurden alle Amplikons nach der 2. *tpp47*-PCR mittels DNS-Hybridisierung kontrolliert, was die Spezifität der Untersuchung erhöhte.

Andererseits gewährleistet die nested-PCR gerade durch die zwei Amplifikationen mit zwei unterschiedlichen Oligonukleotidprimer-Paaren eine sehr hohe Spezifität und Sensitivität [113]. Der „Hotstart“-Verfahren, die Zugabe von *Taq*-Polymerase nach der DNS-Denaturierung, sollte auch die Spezifität dadurch erhöhen, dass dieses Verfahren ein Misspriming und dadurch eine falsche Positivität verhindert [113]. Die PCR wurde mit 35 Zyklen durchgeführt. Eine Erhöhung der PCR-Zyklen auf 40 brachte dagegen falsch positive Ergebnisse.

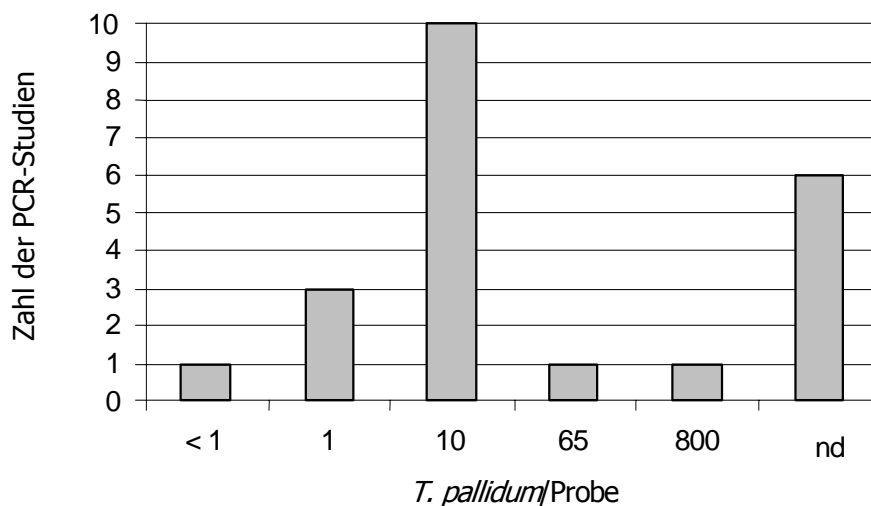
Um zu kontrollieren, ob in allen PCR-Ansätzen die aus Zellen und Geweben isolierte DNS vorhanden war, wurde stets parallel eine Amplifikation eines sog. „house keeping genes“, des β -Actin-Gens, durchgeführt. Die PCR mit einem „house keeping gene“ ist nach Hoorfar et al. (2003) [66] ein Standardverfahren und eine Qualitätssicherung bei dem Nachweis der Infekte. Hoorfar et al. empfehlen die Amplifikation des Untersuchungs-Gens und des Kontroll-Gens („house keeping gene“) gleichzeitig in einem PCR-Röhrchen als sog. Multiplex-PCR. Die amplifizierten Gen-Fragmente des Untersuchungs- und des Kontroll-Gens sollten dabei unterschiedlich groß sein, um bei der Gel-Elektrophorese gut trennbare und differenzierbare Banden zu liefern. In dieser Arbeit wurden die *T. pallidum*- und β -Actin-PCR nicht in einem Röhrchen, sondern parallel mit abgesehen vom Primer gleichem Reagenzienansatz durchgeführt, was sich prinzipiell vom Multiplex-PCR-Verfahren nicht unterscheidet. Obwohl das β -Actin-Gen nur in zellulären Proben vorhanden ist und damit nur für die PCR aus Blutzellen oder Gewebe geeignet ist, wurde in dieser Arbeit die β -Actin-PCR nicht nur direkt als DNS-Isolationskontrolle des zellulären Materials benutzt, sondern auch als indirekte DNS-Isolationskontrolle für das nichtzelluläre Material. Dies lag daran, dass die DNS-Isolation gleichzeitig und parallel, mit der gleichen Charge von DNAzol BD Reagent und unter gleichen Bedingungen aus den zellulären (HSC-P, LSC-P, Granulozyten, Ejakulat, Hautbiopsien) und nichtzellulären Proben (Serum, HSC-S, LSC-S, Abstriche) ablief. Wenn die β -Actin-PCR mit zellulären Proben positiv war, dann bedeutete es, dass die DNS-Isolation aus nichtzellulären Proben auch in Ordnung war. In diesem Fall bedeutete die negative *T. pallidum*-PCR nicht den Mangel und/ oder Qualität des DNS-Templates, sondern die Abwesenheit von *T. pallidum*-DNS in der Probe.

Die PCR-Sensitivität in dieser Arbeit betrug 10 Treponemen/Probe und war im Versuch mit der *T. pallidum*-Verdünnungsreihe mit anderen Studien vergleichbar. So wurde in 10 publizierten PCR-Studien die gleiche Sensitivität von 10 Treponemen/ Probe erreicht [76, 16, 20, 124, 105, 88, 147, 106, 122, 151]. In drei anderen Studien lag die Sensitivität mit 1 Treponema/ Probe [20, 14, 117] höher und nur in eine Studie über Reverse Transcriptase (RT)-PCR-Einsatz in der Diagnostik gelang der Nachweis von 10^{-3} Treponemen/ Probe [20]. Dagegen zeigte die erste publizierte PCR-Studie (Hay et al., 1990) [59] eine PCR-Sensitivität von nur 65 Treponemen/ Probe (**Tabelle 6, Abbildung 24**).

Die RT-PCR nach Centurion-Lara et al. (1997) [20] ist zweifellos die sensitivste PCR-Nachweismethode mit einer diagnostischen Sensitivität von 10^{-3} Treponemen-Äquivalent/Probe [20], die selbst über der Sensitivität des Rabbit Infectivity Test mit 1–5 Treponemen/ Probe [94] liegt. Die RT-PCR erlaubt außerdem den selektiven Nachweis von

lebendigen Bakterien. Im klinischen Alltag in der Routinediagnostik wird diese Methode wegen der sehr großen Kontaminationsgefahr durch die ubiquitär vorhandenen RNAsen extrem aufwändig und unpraktikabel. Bei der Erforschung der Pathogenese der Syphilis ist jedoch die Frage, ob lebende Spirochaeten vorliegen, von großem Interesse und daher der Einsatz der RT-PCR sinnvoll. Die Tatsache, dass bislang nur eine einzige Arbeit diese Technik zur Syphilis-Diagnostik eingesetzt hat, lässt allerdings vermuten, dass es sich um ein schwer reproduzierbares Verfahren handelt.

Abbildung 24. PCR-Sensitivität (Treponemen/ Probe) nach der Gel-Elektrophorese in publizierten PCR-Studien



Abkürzung: nd, nicht vorhanden

Die Sensitivität und Spezifität der PCR kann durch die DNS-Hybridisierung erhöht werden [148]. In dieser Arbeit wurde ein radioaktives Verfahren mit ^{32}P geladenem Oligonukleotid gewählt, da es eine höhere Sensitivität im Vergleich mit nicht radioaktiven Methoden aufweist [148]. Die Hybridisierung als zusätzliche Kontrolle vor allem der Spezifität, und dann auch der Sensitivität, ist besonders im Laufe der PCR-Etablierung wichtig. Danach kann in der klinischen Routine auf die DNS-Hybridisierung verzichtet werden. So zeigte die PCR-Sensitivität in dieser Arbeit in der Gel-Elektrophorese gegenüber der DNA-Hybridisierung fast keinen Unterschied (**Tabelle 15**): 97 % der in der Gel-Elektrophorese positiven Proben (n = 99) waren auch in der Hybridisierung positiv. Die PCR-Spezifität war dabei 100 %, da keine unspezifischen Banden im Gel gesichtet wurden, welche bei der Hybridisierung fehlten. Es ist bekannt, dass eine negative PCR nicht nur durch die PCR hemmende Substanzen oder eine unzulänglich etablierte PCR verursacht werden kann, sondern auch durch eine zu

niedrige DNS-Konzentration (Template) im untersuchten Material. Die diagnostische Sensitivität der PCR kann dabei auch vom Untersuchungsmaterial selbst beeinflusst werden. Wenn die Erreger in dem untersuchten Gewebe nicht vorhanden ist, fehlt die PCR negativ aus, auch wenn der Patient eine Infektion hat. Daher ist es entscheidend, die richtigen biologischen Proben zu wählen: Um für die diagnostische Sensitivität der PCR und damit die Aussagekraft der Untersuchung optimale Voraussetzung zu schaffen, sollte als Proben-Quelle des Gewebe mit einer möglichst hoher Konzentration von Spirochäten verwendet werden.

Um festzustellen, ob die untersuchte Probenmenge auf die diagnostische PCR-Sensitivität einen wesentlichen Einfluss hat, wurde die einfache oder dreifache Menge an Ausgangsmaterial eingesetzt. Die dreifache Menge an eingesetzter Probe kann aber auch die dreifache Menge von Inhibitoren erhalten und damit die PCR beeinträchtigen. Um dies zu vermeiden, wurde nicht die dreifache Menge vom DNS-Isolat eingesetzt, sondern die dreifache Menge an 379 bp-Amplikon nach der 1. PCR und Konzentrierung. Die Konzentrierung des 379 bp-Amplikons nach der DNS-Fällung beeinflusst die PCR-Spezifität nicht, kann aber die Sensitivität erhöhen. Diese Verdreifachung der Menge des 379 bp-Amplikons zeigte in dieser Arbeit keine signifikante Verbesserung der diagnostischen PCR-Sensitivität (**Tabelle 16**). Das bedeutet, dass unter gegebenen Untersuchungsbedingungen die jeweiligen Patientenproben ausreichend Treponemen enthalten, um einen positiven Nachweis zu gewährleisten, und die Sensitivität der PCR wenig von der Menge des untersuchten Materials abhängig ist.

Molekularbiologische Verfahren zum DNS-Nachweis von Mikroorganismen erfordern strenge Kontrollen und Genauigkeit. Die Kontamination von Reagenzien und Proben durch Erreger-DNS stellt für die PCR eine große Gefahr dar, welche die Anwendung der PCR-Technik sehr einschränken kann. Es ist wichtig, dass die untersuchte Probe bei der Vorbereitung nicht mit anderen positiven Proben in Kontakt kommt. Es ist noch wichtiger, dass das Amplikon nicht mit Reagenzien oder zu untersuchenden Proben in Kontakt kommt, weil dadurch alle nachfolgenden Proben falsch positiv werden. Bei der Durchführung der PCR in dieser Arbeit wurden diese Voraussetzungen streng eingehalten, und die Untersuchungen wurden immer durch negative (Wasser, *T. pallidum*-negative Patientenproben) und positive Kontrollen (*T. pallidum*-Suspension, β -Actin-PCR) kontrolliert.

Nach der Etablierung der PCR unter Verwendung von Spirochäten wurde diese am Patientenkollektiv getestet. *T. pallidum*-DNS wurde in 93,3 % (14/15) der Patienten mit

Syphilis gefunden: davon bei manifester Syphilis bei 8/8 (100 %) der Patienten, bei latenter bei 6/7 (85,7 %) der Patienten. Bei der PCR-Untersuchung wurde festgestellt, dass in den verschiedenen Patientenproben und in verschiedenen Syphilis-Stadien treponemale DNS unterschiedlich häufig nachweisbar war. Bei der Auswahl der Proben für *T. pallidum*-PCR muss darauf geachtet werden, welches Ausgangsmaterial in die PCR eingesetzt wird. Die beste Proben-Quelle in dieser Arbeit war die PBMC-Fraktion und hierbei besonders das PBMC-Pellet nach der Hochgeschwindigkeit zentrifugation (HSC-P): bei manifester Syphilis war sie bei 87,5 % der Proben und bei latenter Syphilis bei 85,7 % der Proben positiv. Die Pellet-Proben aus der PBMC-Fraktion nach Niedriggeschwindigkeit zentrifugation (LSC-P) waren bei manifester Syphilis bei 85,7 % der untersuchten Proben positiv. Selten positiv waren die LSC-P-Proben bei latenter Syphilis (57,1 %).

Die zwei unterschiedlichen Zentrifugationsgeschwindigkeiten, 15000 g (HSC) und 500 g (LSC) können die Treponemen von den Blutzellen trennen: bei 15000 g werden sowohl Blutzellen, als auch Bakterien sedimentiert, bei 500 g nur die Blutzellen. Dies wurde auch dadurch bestätigt, dass treponemale DNS nicht im Überstand von PBMC nach Hochgeschwindigkeit zentrifugation (HSC-S) nachgewiesen werden konnte, jedoch bei 4/8 Proben (50 %) des durch die Niedriggeschwindigkeit zentrifugation (LSC-S) gewonnenen PBMC-Überstandes (**Tabelle 13**). Die positiven LSC-S-Proben stammen ausschließlich von den Patienten mit manifester Syphilis, wobei Treponemen im Blut in offensichtlich großer Menge vorhanden waren [149].

Der Nachweis von *T. pallidum* im Überstand nach 500 g-Zentrifugation weist darauf hin, dass diese Treponemen frei im Blut vorliegen. Interessanterweise war auch das Serum bei manifester Syphilis öfter positiv (6/8 Proben, 75 %) als bei latenter Syphilis (4/7 Proben, 57,1 %). Das bestätigt auch die höhere Infektiosität und epidemiologische Bedeutung der manifesten im Vergleich zur latenten Syphilis, wobei Treponemen eher im Gewebe als im Blut vorhanden sind [149].

Die negativen PCR-Proben des Blutes bei Patient A1 mit primärer Syphilis können durch die noch nicht eingetretene Spirochätämie erklärt werden. Die Abstriche vom Primäraffekt waren dagegen bei diesem Patient in der PCR positiv.

Die Granulozyten-Fraktion war nur bei 5/15 (30 %) Patienten in der PCR positiv. Daher war keine Relation zwischen den Syphilis-Stadien und der PCR-Positivität bei der Granulozyten-PCR feststellbar: positive Granulozyten wurden bei manifester Syphilis bei 3 Patienten und bei latenter bei 2 Patienten nachgewiesen. Obwohl Granulozyten wie Lymphozyten

Treponemen enthalten können [87], erscheint diese Fraktion für den routinemäßigen diagnostischen Nachweis von *T. pallidum* daher nicht geeignet. Trotzdem wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal mittels PCR die DNS von *T. pallidum* in Granulozyten nachgewiesen.

Die Rachenabstriche brachten keine positiven Ergebnisse in der PCR. Das kann dadurch erklärt werden, dass bei der Angina specifica die Rachen-Schleimhaut auf der Oberfläche keine Treponemen enthält und die klinisch relevante Schleimhautentzündung des Rachens unter dem Epithel stattfindet.

Durch die Untersuchung von Ejakulat und Lymphknoten-Punktaten wurde mittels molekularbiologischer Untersuchungen bestätigt, dass beide Quellen *T. pallidum* enthalten. Es wurde bereits von Pinard & Hoch (1920) berichtet, dass Ejakulat Treponemen enthält (nach Stokes & Beerman, 1942, [167]). Bei einer Literaturrecherche wurde keine Studie zum direkten Nachweis von *T. pallidum* im Ejakulat gefunden. Die PCR-Analyse in unserer Arbeit liefert somit erstmals den molekularbiologischen Nachweis, dass *T. pallidum* bei Syphilispatienten im Ejakulat enthalten ist.

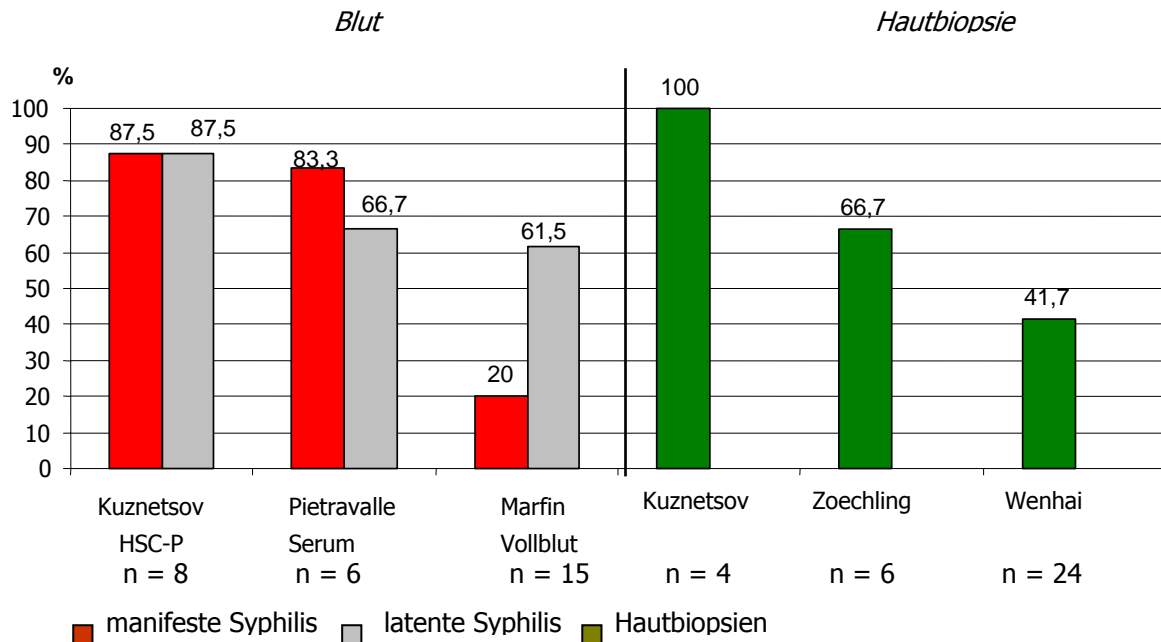
Lymphknoten als ein Reservoir für Treponemen wurden bereits von Friedrich R. Schaudinn und Erich Hoffmann bei der Entdeckung der Treponema (1905) beschrieben [152]. In unserer Arbeit wurde eine Lymphknoten-Punktion nach Schaudinn-Hoffmann mit der PCR verbunden. Im Falle des Patienten B1 (**Tabelle 13**) legt die Bildgebung mit 7,5 MHz-Sonographie die Vermutung nahe, dass das negative Resultat der PCR auf eine unzureichende Punktions-Technik zurückzuführen war.

Bei der weiteren Literaturrecherche über den PCR-Einsatz für die Syphilisdiagnostik konnte man feststellen, dass die Ergebnisse des *T. pallidum*-DNS-Nachweises in der (HSC-P)-PCR bei 87,5 % Patienten mit manifester Syphilis (**Tabelle 13, Abbildung 16**) vergleichbar den Ergebnissen von Pietravallo et al. (1999) [129] sind, welche die Treponemen im Serum bei manifester Syphilis auch bei 83,3 % (5/6) Patienten fanden (**Abbildung 25**). Bei latenter Syphilis sind die PCR-Ergebnisse in unserer Arbeit sensitiver als die von Pietravallo et al.: 87,5 % in der vorliegenden Arbeit gegen 67 % in der Studie von der Pietravallo et al.

Marfin et al. (2001) [96] fanden treponemale DNS im Vollblut bei manifester Syphilis nur in 25 % und bei latenter Syphilis in 61,5 %. So kann die PCR-Untersuchung des Vollblutes einige Vor- und Nachteile haben. Bei der Vollblut-PCR werden Plasma und Blutzellen gemeinsam auf *T. pallidum*-DNS geprüft, was zu einer höheren Sensitivität beitragen kann und eine einfachere Handhabung erlaubt. Andererseits können bei der Vollblut-Analyse die Porphyrine aus den Erythrozyten die Taq-Polymerase hemmen und die Sensitivität wesentlich

reduzieren. Solche PCR-Hemmung ist mögliche Erklärung für die niedrige PCR-Sensitivität in der Arbeit von Marfin et al. (**Abbildung 25**).

Abbildung 25. *T. pallidum*-Nachweisbarkeit im Blut und Haut im Vergleich mit anderen Studien



T. pallidum-DNS wurde in der hier vorgelegten Arbeit in allen Hautbiopsien gefunden, was sich möglicherweise durch das rasche, DNS schönende Schock-Einfrieren der frisch gewonnenen Hautbiopsien ohne Formalin und Paraffin erklären lässt. Die kleine Anzahl an untersuchten Proben (n = 4) ist allerdings nicht sehr aussagekräftig. Es scheint jedoch vorteilhaft zu sein, wenn die PCR mit dem ganzen Biopsat und nicht mit einer begrenzten Zahl von histologischen Schnitten von 5-10 µm Dick durchgeführt wird (**Abbildung 25**).

Die Serumproben von Patienten mit behandelter Syphilis (Gruppe B) und Serum- und Liquorproben von Patienten mit behandelter Neurosyphilis (Gruppe C) waren in der PCR negativ. Die negative PCR kann an der niedrigen PCR-Sensitivität bei der Untersuchung des Serums und des Liquors liegen („falsch“ negative PCR). Mit großer Wahrscheinlichkeit spricht sie aber dafür, dass die nach antibiotischer Therapie keine Treponemen mehr vorhanden waren.

In dieser Arbeit betrug die PCR-Sensitivität bei der Serum-Untersuchung der latenten Syphilis nur 57,1 %. Dies ist zu niedrig, um die Serum-PCR für die Therapie-Kontrolle der Patienten der Gruppen B und C zuverlässig einsetzen zu können. Andererseits muss man bei einer Sensitivität von 57,1 % davon ausgehen, dass etwa die Hälfte der Proben in der PCR hätten positiv sein müssen, wenn sie die Treponemen erhielten. Bei den Patienten der

Gruppen B und C waren alle Serumproben negativ, so dass dieses Ergebnis für eine erfolgreiche Therapie spricht. Blutfraktionen (PBMC, Granulozyten) waren bei den Patienten nach der Therapie der Syphilis und Neurosyphilis (Gruppen B und C) nicht erhältlich, da es sich um kryokonservierten Serumproben von Patienten handelte, die vor 1 bis 24 Monaten (Gruppe B) oder vor 3 bis 7 Jahren (Gruppe C) behandelt worden waren. Die PCR mit dem Material von diesen Patienten war retrospektiv. Bei der retrospektiven PCR-Untersuchungen von Proben, welche nicht explizit für die molekularbiologischen Untersuchungen gesammelt und aufbewahrt worden waren, muss man laut Sanches et al. (1993) davon ausgehen, dass die Erreger-DNS möglicherweise abgebaut worden ist und die PCR hierdurch negativ wurde [151, 117, 84].

Für die negative Liquor-PCR bei den behandelten Patienten mit Neurosyphilis (Gruppe C) gibt es zwei denkbare Gründe: die mehrfach aufgetauten Proben konnten durch DNS-Schädigung/Abbau in der PCR negativ geworden sein. Wahrscheinlich aber war die antisiphilitische Therapie erfolgreich gewesen. Im letzteren Fall wäre der positive 19S-IgM-FTA-ABS-Test im Liquor nicht durch treponemaspezifisches IgM zu erklären, sondern durch den sog. antiidiopathischen IgM-Antikörper gegen IgG [149]. Dass die IgM-positiven Liquorproben keine *T. pallidum*-DNS erhielten, macht auch das Fehlen von klinischen Symptomen einer Neurosyphilis im Follow-up von 3 bis 7 Jahren wahrscheinlich. Die Follow-up-Studie von Noordhoek et al. (1991) [117] über die Persistenz von *T. pallidum*-DNS im Liquor nach ausreichender Therapie einer Neurosyphilis zeigt, dass *T. pallidum*-DNS noch durchschnittlich 12,5 - 16,5 Monate nachweisbar sein kann. Diese Studie war leider nicht mit dem diagnostischen „Goldstandard“, dem Rabbit Infectivity Test (RIT), kontrolliert worden [151]. Auch in unseren Liquorproben sollte die PCR bei Vorhandensein von DNS positiv sein. Die negative PCR in allen Liquor-Proben spricht eher für eine IgM-Seronarbe und nicht für eine fortbestehende Neurosyphilis.

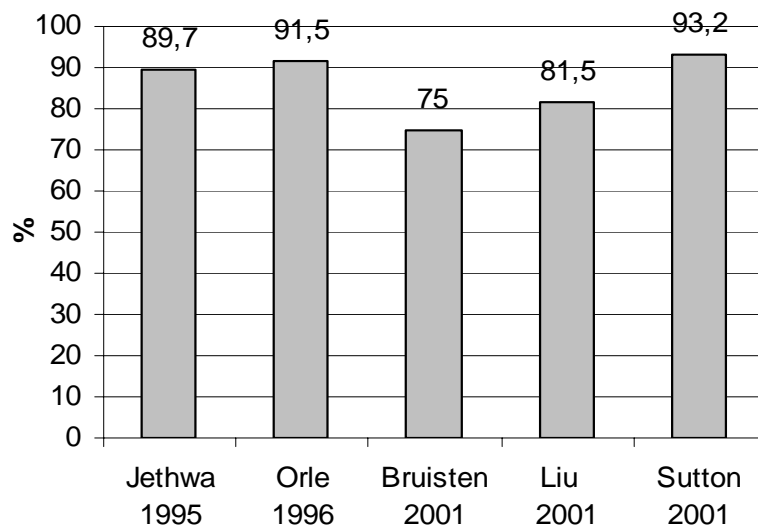
Die PCR zum *T. pallidum*-Nachweis gewinnt besonders dann klinische Relevanz, wenn konventionelle Methoden wie Serologie oder Mikroskopie keine schlüssigen Resultate liefern. So ist etwa die Lymphknoten-Punktion in der Kombination mit der PCR besonders bei den Patienten mit unklarer Syphilis-Serologie und ohne klinischen und histologischen Hinweise auf Syphilis viel versprechend. HIV-positive Patienten weisen ein erhöhtes Risiko für andere Geschlechtskrankheiten, einschließlich Syphilis auf [161, 161]. Sie können in einzelnen klinischen Fällen unklare (falsch positive oder negative) serologische Befunde haben (**Tabelle 4**) [83]. Die HIV-Infektion ist wie die Syphilis von einer Lymphadenopathie begleitet, und der direkte Nachweis von *T. pallidum* ist für die Syphilis-Diagnostik hier sehr hilfreich.

Bei Patienten mit serologischem Verdacht auf Syphilis (Patienten A13, A14, A15, **Tabelle 10**) spielte die PCR eine entscheidende Rolle bei der Diagnosestellung. Bei diesen drei Patienten wurde der treponemale Infekt nur durch den Nachweis von *T. pallidum*-DNS bestätigt. Hätte man beim Patienten A13 mit anamnestisch behandelter Syphilis die Indikation zur Therapie ausschließlich aufgrund der Serologiebefunde (TPHA-Test 1:1280, VDRL 1:8, IgG-FTA-ABS-Test positiv, IgM-FTA-ABS-Test grenzwertig positiv, 19S-IgM-FTA-ABS-Test grenzwertig positiv) getroffen, wäre er mit einer serologischen Restpositivität möglicherweise als „Zustand nach Syphilis“ eingestuft und nicht erneut behandelt worden.

Bei zwei anderen Patienten, A14 und A15 (**Tabelle 10**), war die Aussagekraft der serologischen Tests wegen einer HIV-Koinfektion von vorneherein sehr eingeschränkt. So war bei Patient A14 der 19S-IgM-FTA-ABS-Test falsch negativ, wie es in 10 % der HIV-Infektion bei Syphilis nach Schofer et al. (1996) [157] möglich ist. Bei Patient A15 waren VDRL und TPHA-Test falsch negativ, was auch in einzelnen Fällen beschrieben wurde (Übersicht in Kuznetsov et al. (2005) [83] (**Tabelle 4**)). Die Diagnose einer latenten Syphilis wurde bei diesen Patienten nur durch den Nachweis von Treponema-DNS gestellt. Falls bei Verdacht auf Syphilis eine HIV-Infektion vorliegt und ein serologischer Test positiv ausfällt, aber keine PCR oder RIT zur Verfügung stehen, muss damit gerechnet werden, dass der Patient eine latente Syphilis haben kann und eine antisiphilitische Therapie durchgeführt werden muss.

Die höchste klinische Sensitivität zeigte die PCR in dieser Arbeit wie auch in anderen publizierten PCR-Studien bei der Untersuchung des Reizserums vom Primäraffekt. Alle Schanker-Abstriche in dieser Arbeit waren positiv. In anderen Studien wurde ebenfalls eine hohe Nachweisbarkeit von *T. pallidum* festgestellt (**Abbildung 26**).

In der vorliegenden Arbeit wurde das DNS-PCR-Verfahren für den direkten *T. pallidum*-Nachweis benutzt. Hierbei wirft sich die Frage auf, inwieweit die DNS-Präsenz die Infektion mit pathogenen Bakterien widerspiegelt. Möglicherweise bedeutet der DNS-Nachweis lediglich das Vorhandensein von abgetöteten Bakterien ohne Krankheitswert. Bisher wurde erst in einer Studie am Kaninchen-Modell von Wicher et al. (1992) [183] gezeigt, dass in das Gewebe injizierte und mit Hitze abgetötete Treponemen im Laufe von 30 Tagen mittels DNS-PCR im Gewebe nachweisbar waren. Die Bakterium-/DNS-Persistenz für 30 Tage fand nur im Gewebe statt, nicht aber im Blut. Man kann daher davon ausgehen, dass die DNS abgetöteter Bakterien nur kurze Zeit im Blut persistiert, da der Abbau im flüssigen Milieu schneller voranschreitet.

Abbildung 26. PCR-Sensitivität bei der Untersuchung des Reizserums vom Primäraffekt

Die DNS-PCR kann für die klinische Diagnostik eingesetzt werden, sogar wenn der Patient früher schon behandelt wurde. Der *T. pallidum*-DNS-Nachweis im Blut mehr als 30 Tage nach der Therapie spricht mit hoher Wahrscheinlichkeit für ein Therapieversagen.

Die hier vorgelegte Arbeit hat an einem kleinen Patientenkollektiv die PCR-Analyse von verschiedenen Blut- und Blutzellfraktionen, Hautbiopsaten, Ejakulatproben, Lymphknoten-Punktaten und Abstrichen verglichen. Auch wenn die Zahl der untersuchten Patienten für eine statistische Auswertung zu klein ist, zeigen die Ergebnisse einen klaren Trend auf. Am besten geeignet scheint für den Nachweis von *T. pallidum*-DNS die PBMC-Fraktion, besonders PBMC-Pellet nach der Hochgeschwindigkeitzentrifugation (HSC-P), welches bei manifester und latenter Syphilis mehr als 85 % Positivität ausweist. Serumproben sind nur bei manifester Syphilis mit 75 % sensitiv. Die Hautbiopsaten und Lymphknoten-Punktaten können auch in der PCR-Diagnostik der Syphilis eingesetzt werden. Dies sollte bei weiteren Einsätzen der PCR in der Routinediagnostik der Syphilis berücksichtigt werden.

Die molekular-genetische Analyse des *T. pallidum*-Genoms ist hinsichtlich der Funktion der einzelnen Gene noch weitgehend hypothetisch, und die genauen Mechanismen der Parasit-Wirt-Interaktion sind unbekannt. Die Diagnostik der Syphilis basiert auf dem klinischen Befund im Zusammenhang mit direkter Labordiagnostik – dem Erreger-Nachweis und/oder indirekter Diagnostik – Antikörpernachweis (Serologie). Obwohl die Syphilis-Diagnostik für den klinischen Alltag gut etabliert ist, gibt es einige Situationen, in denen die vorhandenen diagnostischen Verfahren Grenzen haben, z. B.:

- Die erosiven und ulzerativen Läsionen im Anogenitalbereich und im Mund entsprechen nicht immer einer typischen syphilitischen Effloreszenz und sind dann klinisch schwer der Syphilis zuzuordnen. Differenzialdiagnostisch kommen Herpes simplex, weicher Schanker und chronisch ulzerierende Stomatitis im Betracht.
- Die Dunkelfeldmikroskopie (DFM) der syphilitischen Anogenitalläsionen bleibt in 20-30 % Fällen negativ und ist für Mundläsionen nicht einsetzbar wegen der morphologischen Ähnlichkeit der Syphilis-Treponemen mit der saprophytierenden Mund-Treponemen; der direkte Fluoreszenzantikörper-Test (DFA) kann bei der Untersuchung der nässenden Läsionen in bis zu 30 % der Fälle negativ sein.
- Die Diagnose einer latenten Syphilis lässt sich nur dann stellen, wenn die Serologie eindeutig positiv ist.
- Die Histopathologie der syphilitischen Hauterscheinungen erschwert die Diagnose wesentlich, wenn Plasmazellen fehlen (bei ca. 20 % der Fälle [1, 36]). Die Silber-Färbung und der DFA erlauben den Nachweis von Treponemen nur in durchschnittlich 50 - 60 % [74, 128, 206, 62, 207] der Fälle.
- Die serologischen Tests können 12 – 24 Monate nach der Therapie positiv bleiben. Dies erschwert die Therapie-Kontrolle. Die nicht-treponemalen Tests können bei Immunkrankheiten und Infektionskrankheiten wie etwa bei einer HIV-Koinfektionen ausfallen, die treponemalen Test ebenfalls bei HIV-Koinfektion.
- Der Rabbit Infectivity Test als Goldstandard der Diagnostik ist nur in einem mit Vivarium ausgestatten Labor und mit großem Aufwand durchführbar, was einen Routineeinsatz ausschließt.
- Die Reverse Transcriptase-PCR ist extrem sensitiv und weist den lebendigen Erregern nach, aber wegen der hohen Kontaminationsgefahr durch RNAsen bleibt sie für klinische Diagnostik nicht praktikabel.
- Die DNS-PCR ist sensitiv, technisch weniger anspruchsvoll und gut reproduzierbar, weist jedoch auch die DNS von abgetöteten Erregern nach.

Auf Grund dieser Liste von diagnostischen Problemsituationen ist es wichtig, dass weiter standardisierte Studien zur molekularen Syphilis-Diagnostik mit verschiedenen Patientenproben und vor allem mit leicht zu gewinnenden Blutproben durchgeführt werden, um den Einsatz der PCR in der Routinediagnostik der Syphilis zu etablieren. Ein Nachteil des PCR-Verfahrens ist, dass bei negativem Befund die Abwesenheit eines Infektes nicht

auszuschließen ist, wenn z.B. die in der PCR eingesetzte Probe keine Treponemen enthält, obgleich eine Syphilis-Infektion vorliegt.

Weitere Untersuchungen zur diagnostischen Sensitivität des PCR-Verfahrens sind wichtig. Mittels der Elektronenmikroskopie oder *in situ*-PCR kann die genaue Lokalisation der Treponemen in den Blutfraktionen und dem Gewebe nachgewiesen werden. Die Dauer der *T. pallidum*-/ DNS-Persistenz im Blut nach ausreichender Therapie muss weiter untersucht werden, um dann die PCR möglicherweise für die Therapie-Kontrolle einsetzen zu können.

Die wichtigsten Einsatzpunkte der *T. pallidum*-PCR bleiben also zunächst:

1. Frühdiagnostik einer primären Syphilis auf Grund der PCR-Untersuchung der nässenden Effloreszenzen im Genitoanal- und Oralbereich noch bevor die Screening-Serologie positiv wird;
2. Nachweis von Treponemen in der Hautbiopsie, wenn das klinische Bild unspezifisch ist und bei der konventionellen Mikroskopie keine Spirochäten oder Plasmazellen zu finden sind;
3. Diagnostik einer latenten Syphilis, wenn die Serologie nicht eindeutig ist und besonders wenn HIV-Koinfektion vorliegt;
4. Differenzialdiagnostik der syphilitischen Lymphadenopathie bei HIV-Koinfektion durch die Lymphknoten-Punktion, wenn klinisch-serologische Befunde nicht aussagekräftig sind.

Dadurch, dass die PCR einen direkten immununabhängigen diagnostischen Nachweis ermöglicht, ist dieses Verfahren besonders für Untersuchung der Syphilis-Pathogenese und des Syphilisverlaufs wichtig.

Wir wissen noch nicht warum ca. 30 % der Menschen, die sexuellen Kontakt mit Syphilis-Patienten hatten, später keine Syphilis entwickeln. Unklar ist auch, warum die Syphilis bei ca. 30 % der Menschen ohne Therapie nach vielen Jahren keine Symptomatik zeigt und die Menschen gesund erscheinen.

So besteht noch hundert Jahren nach der Entdeckung des Syphilis-Erregers ein sehr großer Bedarf an Forschung über *T. pallidum* und Syphilis. Die PCR kann hierzu einen wesentlichen Beitrag leisten.

LITERATURVERZEICHNIS/*LITERATURE*

1. Abell E, Marks R, Jones EW. Secondary syphilis: a clinico-pathological review. *Br J Dermatol*, 1975; 93: 53-61.
2. Al Attia HM. False positive VDRL (BFP-STs) and systemic lupus erythematosus; new data in clinico-laboratory associations. *Int J Dermatol*, 2002; 41: 858-862.
3. Austin FE, Barbieri JT, Corin RE, Grigas KE, Cox CD. Distribution of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities among *Treponema pallidum* and other spirochaetes. *Infect Immun*, 1981; 33: 372-379.
4. Azar HA, Pham TD, Kurban AK. An electron microscopic study of a syphilitic chancre. *Arch Pathol*, 1970; 90: 143-150.
5. Bangsow T, Huch R, Male D, Müller S. Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In: Schrimpf G (Hrsg) Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 3. Aufl. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford, 2002, S. 147-168.
6. Baseman JB, Hayes EC. Molecular characterization of receptor binding proteins and immunogens of virulent *Treponema pallidum*. *J Exp Med*, 1980; 151: 573-586.
7. Bernard C, de Moerloose P, Tremblet C, Reber G, Didierjean L. Biological true and false serological tests for syphilis: their relationship with anticardiolipin antibodies. *Dermatologica*, 1990; 180: 151-153.
8. Binder T. Feinnadel-Aspirationszytologie: verbesserte Punktionstechnik mit einem neuen Aspirationsgerät. *Tumor Diagn Ther*, 1987; 8: 36-37.
9. Bishop NH, Miller JN. Humoral immune mechanisms in acquired syphilis. In: Schell RF, Muscher DM (eds) Pathogenesis and Immunology of Treponemal Infection. Marcel Dekker Inc, 1983, pp. 241-271.
10. Bohmer U, Schmid-Wendtner MH, Korting HC, Kouznetsov AV. The sonographic image of inflamed inguinal lymph nodes in primary syphilis. *Int J STD AIDS*, 1998; 9: 776-777.
11. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC. *Dermatology*, 2nd ed., 2000, 1853 p.
12. Brockhaus. Nobelpreise: Chronik herausragender Leistungen. Hrsg. von der Lexikonredaktion des Verlags F.A. Brockhaus, Mannheim, 2. Aufl., 2004.
13. Brown WH, Pearce LP. Experimental syphilis in the rabbit. I. Primary infection in the testicle. *J Exp Med*, 1920; 31: 475-498.
14. Bruisten SM, Cairo I, Fennema H, Pijl A, Buimer M, Peerbooms PGH, van Dyck E, Meijer A, Ossewaarde JM, van Doornum GJJ. Diagnosing genital ulcer disease in a clinic for sexually transmitted diseases in Amsterdam, the Nederland. *J Clin Microbiol*, 2001; 39: 601-605.
15. Buchacz K, Patel P, Taylor M, Kerndt PR, Byers RH, Holmberg SD, Klausner JD. Syphilis increases HIV viral load and decreases CD4 cell counts in HIV-infected patients with new syphilis infections. *AIDS*, 2004; 18: 2075-2079.
16. Burstain JM, Grimpel E, Lukehart SA, Norgard MV, Radolf JD. Sensitive detection of *Treponema pallidum* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1991; 29: 62-69.
17. C10 isolation of a monocyte-rich fraction from whole blood or a mononuclear cell fraction. [<http://www.axis-shield.com/optiprep/GGTSPU-hydra3.fw.med.uni-muenchen.de-22012-1701992-DAT/C10.pdf>], Stand 30.07.2005
18. Carl M. 7,5-MZz-Sonographie: Ultraschalluntersuchung der subkutanen Lymphknoten in der dermatologischen Tumornachsorge. In: Korting CH, Sterry W (Hrsg) Diagnostische Verfahren in der Dermatologie, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, Wien, 1997, S. 21-26.
19. Center for Disease Control and Prevention (CDC). Case definitions for infectious conditions under public health surveillance. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 1997; 46: 34-37.

20. Centurion-Lara A, Castro C, Shaffer JM, Van Voorhis WC, Marra CM, Lukehart SA. Detection of *Treponema pallidum* by sensitive reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol*, 1997; 35: 1348-1352.
21. Centurion-Lara A, Castro C, Van Voorhis WC, Lukehart SA. Two 19S-23S ribosomal DNA intergenic regions in different *Treponema pallidum* subspecies contain tRNA genes. *FEMS Microbiol Lett*, 1996; 143: 235-240.
22. Centurion-Lara A, Castro CLB, Cameron C, Mostowfi M, Van Voorhis WC, Lukehart S. *Treponema pallidum* major sheath protein homologue Tpr K is a target of opsonic antibody and the protective immune response. *J Exp Med*, 1999; 189: 647-656.
23. Centurion-Lara A, Godornes C, Castro C, Van Voorhis WC, Lukehart SA. The tprK gene is heterologous among *Treponema pallidum* strains and has multiple alleles. *Infect Immun*, 2000; 68: 824-831.
24. Chevallier J. The pioneers: venereology in France before 1801. In: Wallach D, Tilles G (eds) *Dermatology in France*. Editions Privat, Pierre Fabre Dermo-Cosmetique, 2002, pp. 189-196.
25. Chung K-Y, Lee M-G, Lee JB. Detection of *Treponema pallidum* by polymerase chain reaction in the cerebrospinal fluid of syphilis patients. *Yonsei Med J*, 1994; 35: 190-197.
26. Coles AC. *Spirocheta pallida*: methods of examination and detection, especially by means of the dark-ground illumination. *Br Med J*, 1909; 1: 1117-1120.
27. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W (eds) *Current Protocols in Immunology*. vol. 1, John Wiley & Sons, Inc, 1994.
28. Creighton ET. Darkfield microscopy for the detection and identification of *Treponema pallidum*. In: Larsen SA, Hunter EF, Kraus SJ (eds). *A Manual of Tests for Syphilis*. 8th ed., American Public Health Association, Washington, D.C., 1990, pp. 49-62.
29. Crowson AN, Magro CM, Dumler S, Kao GF, Barnhill RL. The treponemal and rickettsial diseases. In: Barnhill RL, Busam KL, Crowson AN, Granter SR (eds) *Textbook of Dermatopathology*. McGraw-Hill Companies, Inc, 1998, pp. 399-408.
30. Cummings MC, Lukehart SA, Marra C, Smith BL, Shaffer J, Demeo LR, Castro C, McCormack WM. Comparison of methods for the detection of *Treponema pallidum* in lesions of early syphilis. *Sex Transm Dis*, 1996; 23: 366-369.
31. Cutler JC, Bauer TJ, Price EV, Schwimmer BH. Comparison of spinal fluid findings among syphilitic and nonsyphilitic individuals. *Am J Syph Gon Ven Dis*, 1954; 38: 447-458.
32. Dallas WS, Ray PH, Leong J, Benedict CD, Stamm LV, Bassford Jr PJ. Identification and purification of a recombinant *Treponema pallidum* basic membrane protein antigen expressed in *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 1987; 55: 1106-1115.
33. Deacon WE, Falcone VH, Harris A. A fluorescent test for treponemal antibodies. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1957; 96: 477-480.
34. Dettori G, Grillo R, Mora G, Gavalli A, Alinovi A, Chezzi C, Sanna A. Evaluation of Western immunoblotting technique in the serological diagnosis of human syphilitic infection. *Eur J Epidemiol*, 1989; 5: 22-30.
35. Doria A, Ruffatti A, Calligaro A, Del Ross T, Ghirardello A, De Zambiasi P, Gambari P. Antiphospholipid antibodies in mixed connective tissue disease. *Clin Rheumatol*, 1992; 11: 48-50.
36. Dyckman JD, Wende RD, Gantenbein D, Williams RP. Evaluation of Reagin Screen, a new serological test for syphilis. *J Clin Microbiol*, 1976; 4: 145-150.
37. Engelkens HJ, ten Kate FJ, Judanarso J, Vuzevski VD, van Lier JB, Godschalk JC, van der Sluis JJ, Stolz E. The localisation of treponemes and characterisation of the inflammatory infiltrate in skin biopsies from patients with primary or secondary syphilis, or early infectious yaws. *Genitourin Med*, 1993; 69: 102-107. Erratum in: *Genitourin Med*, 1993; 69: 327.

38. Engelkens HJ, ten Kate FJ, Vuzevski VD, van der Sluis JJ, Stolz E. Primary and secondary syphilis: a histopathological study. *Int J STD/AIDS*, 1991; 2: 280-284.
39. Engvall E, Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 1971; 8: 871-874.
40. Fernel J. De luis venereae curatione perfectissima liber, numquam antehac editus. Antverpiae, Christophori Platini, 1579, 127 p.
41. Ferrante A, Thong YH. Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the Hypaque-Ficoll method. *J Immunol Methods*, 1980; 36: 109-117.
42. Fitzgerald TJ, Repesh IA, Oakes SG. Morphological destruction of cultured cells by the attachment of *Treponema pallidum*. *Br J Vener Dis*, 1982; 58: 1-11.
43. Fitzgerald TJ, Repesh LA. Toxic activity of *Treponema pallidum*. In: Schell RF, Muscher DM (eds) Pathogenesis and Immunology of Treponemal Infection. Marcel Dekker Inc, 1983, pp. 173-194.
44. Fitzgerald TJ. Attachment of treponemes to cell surfaces. In: Schell RF, Muscher DM (eds) Pathogenesis and Immunology of Treponemal Infection. Marcel Dekker Inc, 1983, pp. 195-228.
45. Fiumara NJ. Serologic response to treatment of 128 patients with late latent syphilis. *Sex Transm Dis*, 1980, 7: 111-115.
46. Fohn MJ, Wignall S, Baker-Zander SA, Lukehart SA. Specificity of antibodies from patients with pinta for antigens of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. *J Infect Dis*, 1988; 157: 32-37.
47. Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, White O, Sutton GG, Dodson R, Gwinn M, Hickey EK, Clayton R, Ketchum KA, Sodergren E, Hardham JM, McLeod MP, Salzberg S, Peterson J, Khalak H, Richardson D, Howell JK, Chidambaram M, Utterback T, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Cotton MD, Venter JC. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science*, 1998; 281: 375-388.
48. Genest DR, Choi-Hong SR, Tate JE, Qureshi F, Jacques SM, Crum C. Diagnosis of congenital syphilis from placental examination: comparison of histopathology, Steiner stain, and polymerase chain reaction for *Treponema pallidum* DNA. *Hum Pathol*, 1996; 27: 366-372.
49. Gjestland T. The Oslo study of untreated syphilis: an epidemiologic investigation of the natural course of the syphilitic infection based upon a re-study of the Boeck-Bruusgaard material. *Acta Dermatol Venereol*, 1955; 35: 11-368.
50. Grimprel E, Sanchez PJ, Wendel GD, Burstain JM, McCracken Jr GH, Radolf JD, Novgard MV. 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.
51. Grünpeck J. Tractatus de pestilentia scorra. [? Leipzig, Boettiger], 1496.
52. Gschnait F, Schmidt BL, Luger A. Cerebrospinal fluid immunoglobulins in neurosyphilis. *Br J Vener Dis*, 1981; 57: 238-240.
53. Haake DA, Lovett MA. Interjunctional invasion of endothelial monolayers by *Treponema pallidum*. In: Gunsalas IC, Sokatch JR, Nicholas Ornston L (eds) The Bacteria: a Treatise on Structure and Function. vol. XI. Molecular Basis of Bacterial Pathogenesis, Academic Press Inc, 1990, pp. 297-318.
54. Haensell P. Vorläufige Mitteilungen über Versuche von Impfsyphilis der Iris und Cornea des Kaninchenauges. *Arch Ophthalm Berlin*, 1881; 27: 98-100.
55. Haghighi L, Doust JY, Boroomand K. Biological false positive VDRL test in malaria. *Trop Geogr Med*, 1970; 22: 482-5.

56. Hanff PA, Norris SJ, Lovett MA, Miller JN. Purification of *Treponema pallidum*, Nichols Strain, by Percoll density gradient centrifugation. *Sex Trans Dis*, 1984; 4: 275-286.
57. Hansen EB, Pedersen PE, Schouls LM, Severin E, van Embden JD. Genetic characterization and partial sequence determination of a *Treponema pallidum* operon expressing two immunogenic membrane proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1985; 162: 1227-1237.
58. Harris A, Rosenberg AA, Riedel LM. A microfloculation test for syphilis using cardiolipin antigen: preliminary report. *J Vener Dis Inform*, 1946; 27: 159-172.
59. Hay PE, Clarke JR, Strugnell RA, 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; 68: 233-238.
60. Hay PE, Clarke JR, Taylor-Robinson D, Goldmeier D. Detection of treponemal DNA in the CSF of patients with syphilis and HIV infection using polymerase chain reaction. *Genitourin Med*, 1990; 66: 428-432.
61. Herxheimer K. Über eine bei Syphilitischen vorkommende Quecksilberreaktion. *Deutsch Med Wochenschr*, 1902; 28: 895-897.
62. Hoang MP, High WA, Molberg KH. Secondary syphilis: a histological and immunohistochemical evaluation. *J Cutan Pathol*, 2004; 31: 595-599.
63. Hoff C, Mikosch T, Seranski T. Blottingverfahren und Hybridisierungen. In: Schrimpf G (Hrsg) *Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, 3 Aufl., Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, S. 223-247.
64. Hook EW, Roddy RE, Lukehart SA, Hom J, Holmes KK, Tam MR. Detection of *Treponema pallidum* in lesion exudates with a pathogen-specific monoclonal antibody. *J Clin Microbiol*, 1985; 22: 241-244.
65. Hook EWD. Syphilis and HIV infection. *J Infect Dis*, 1989; 160: 530-534.
66. Hoorfar J, Cook N, Malorny B, Wagner M, De Medici D, Abdulmawjood A, Fach P. Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. *J Clin Microbiol*, 2003; 41: 5835.
67. Hsu P-L, Chamberlain NR, Orth K, Moonaw CR, Zhang L-Q, Slaughter CA, Radolf JD, Sell S, Norgard MV. Sequence analysis of the 47-kilodalton major integral membrane immunogen of *Treponema pallidum*. *Infect Immun*, 1989; 57: 196-203.
68. Innis MA, Gelfand DH. Optimization of PCRs. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). *PCR protocols: a guide to methods and application*. Academic Press, Inc; 1990, pp. 3-13.
69. Ionescu AD, Petcovici M, Ionescu-Dorohoi T. Quantitative profile of cardiolipin and group treponemal IgD antibodies in syphilis estimated by single radial immunodiffusion technique (SRID). *Arch Roum Pathol Exp Microbiol*, 1989; 48: 19-31.
70. Ito F, George RW, Hunter EF, Larsen SA, Pope V. Specific immunofluorescent staining of *Treponema pallidum* in smears and tissues. *J Clin Microbiol*, 1992; 30: 831-838.
71. Izzat NN, Knox JM, Werth JA, Dacres WG. Evolution of syphilitic chancres with virulent *Treponema pallidum* in the rabbit. *Br J Vener Dis*, 1970; 47: 67-72.
72. Janier M. Venereal diseases clinicians in Paris 1801-2001. In: Wallach D, Tilles G (eds.) *Dermatology in France*. Editions Privat, Pierre Fabre Dermo-Cosmetique, 2002, pp.197-225.
73. Jarisch A. Therapeutische Versuche bei Syphilis. *Wien Med Wochenschr*, 1895; 45: 720-721.
74. Jeerapaet P, Ackerman AB. Histological patterns of secondary syphilis. *Arch Dermatol*, 1973; 107: 373-377.
75. Jenkin HM, Sandok PL. In vitro cultivation of *Treponema pallidum*. In: Schell RF, Muscher DM (eds) *Pathogenesis and Immunology of Treponemal Infection*. Marcel Dekker Inc, 1983, pp. 71-98.

76. Jethwa HS, Schmitz JL, Dallabetta G, Behets F, Hoffman I, Hamilton H, Lule G, Cohen M, Folds JD. Comparison of molecular and microscopic techniques for detection of *Treponema pallidum* in genital ulcers. *J Clin Microbiol*, 1995; 33: 180-183.
77. Kellogg DS Jr, Morhershed SM. Immunofluorescent detection of *Treponema pallidum*: a review. *JAMA*, 1990; 107: 938-941.
78. Kingston MA, Higgings SP. Audit of the management of early syphilis at North Manchester General Hospital. *Int J STD AIDS*, 2004; 15: 352-354.
79. Kolle W, Evers E. Experimentelle Studien über Syphilis und Rekurrensspirochätose. IV. Über die Geschwindigkeit des Eindringens der *Spirochaeta pallida* von der Infektionsstelle in die regionalen Lymphdrüsen. *Dtsch Med Wochenschr*, 1926; 52: 1075-1076.
80. Kouznetsov AV, Prinz JC. Molecular diagnosis of syphilis: the Schaudinn-Hoffmann lymph-node biopsy. *Lancet*, 2002; 360: 388-389.
81. Kouznetsov AV, Prinz JC. Papulopustulöse Syphilid bei einem HIV-infiziertem Patient im Stadium B2 (CDC). In: Plewig G, Prinz JC (Hrsg) Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie, Bd. 18. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2002, S. 663-666.
82. Krech U, Wilhelm JA. A solid-phase immunosorbent technique for the rapid detection of rubella IgM by haemagglutination inhibition. *J Gen Virol*, 1979; 44: 281-286.
83. Kuznetsov AV, Burgdorf WH, Prinz JC. Latent syphilis confirmed by polymerase chain reaction in 2 patients with inconclusive serologic test result. *Arch Dermatol*, 2005; 141: 1169-1170.
84. Kwok S, Higuchi R. Avoid false positives with PCR. *Nature*, 1989; 339: 237-238.
85. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of test for syphilis. *Clin Microb Rev*, 1995; 8: 1-21.
86. Lee KH, Choi H-J, Lee M-G, Lee JB. Virulent *Treponema pallidum* 47 kDa antigen regulates the expression of cell adhesion molecules and binding of T lymphocytes to cultured human dermal microvascular endothelial cells. *Yonsei Med J*, 2000; 41: 623-633.
87. Lipschütz B. Bakteriologischer Grundriß and Atlas der Geschlechtskrankheiten. Verlag von Johann Ambrosius Barth, Leipzig, 1913.
88. 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; 39: 1941-1946.
89. Lukehart SA. Immunology and pathogenesis of syphilis. *Adv Host Def Mech*, 1992; 8: 141-163.
90. Lukehart SA, Baker-Zande SA, Lloyd RM, Sell S. Effects of cortisone administration on host-parasite relationship in early experimental syphilis. *J Immunol*, 1981; 127: 1361-1368.
91. MacLean S, Luger A. Finding neurosyphilis without the Venereal Disease Research Laboratory test. *Sex Transm Dis*, 1996; 23: 392-394.
92. Magnarelli LA, Anderson JF, Johnson RC. Cross-reactivity in serological test for Lyme disease and other spirochetal infections. *J Infect Dis*, 1987; 156: 183-188.
93. Magnuson HJ, Eagle H, Fleischman R. The minimal infectious inoculation of *Spirochaeta pallida* (Nichols strain) and a consideration of its rate its rate of multiplication in vivo. *Am J Syph Gonorr Vener Dis*, 1948; 32: 1-18.
94. Magnuson HJ, Eagle H, Fleischman R. The minimal infectious inoculums of *Spirochaeta pallida* (Nichols strain) and a consideration of its rate of multiplication in vivo. *Am J Syph*, 1948; 32: 1-18.
95. Mahoney JF, Arnold RC, Harris AD. Penicillin treatment of early syphilis: a preliminary report. *Vener Dis Inform*, 1943; 24: 355-357.

96. Marfin AA, Liu H, Sutton MY, Steiner B, Pillay A, Markowitch LA. 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.
97. McBroom RL, Styles AR, Chiu MJ, Clegg C, Cockerell CJ, Radolf JD. Secondary syphilis in persons infected with and not infected with HIV-1: a comparative immunohistological study. *Am J Dermatopathol*, 1999; 21: 432-441.
98. Metchnikow II, Roux EPP. Über die experimentelle Syphilis. *Deutsch Med Wochenschr*, 1903; 50: 943.
99. Meyer JC, Eichmann A. Serodiagnostik und Therapie der Syphilis. *Ther Umschau*, 1985; 42: 773-780.
100. Meyer JC. Laboratory diagnosis of syphilis. *Curr Probl Dermatol*. 1996; 24: 1-11.
101. Meyer JC. Serodiagnostik und Therapie der Syphilis. *Ther Umsch*, 1985, 42: 773-780.
102. Michelow IC, Wendel GD, Norgard MV, Zeray F, Leos NK, Alsaadi R, Sanchez PJ. Central nervous system infection in congenital syphilis. *N Engl J Med*, 2002; 346: 1792-1798.
103. Mikosch T. Markierung von Nucleinsäuren. In: Schimpf G (Hrsg) Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor, 3 Aufl., Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, S. 13-19.
104. Milich MV. Evolution of Syphilis, 2nd ed., Medicina, Moscow, 1987, 160 p. [Russian]
105. Morse SA, Trees DL, Htun Y, Radebe F, Orle KA, Dangor Y, Beck-Saque CM, Schmid S, Fehler G, Weiss JB, Ballard RC. Comparison of clinical diagnosis and standard laboratory and molecular methods for the diagnosis of genital ulcer diseases in Lesotho: association with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis*, 1997; 175: 583 - 589.
106. Moskopidid M, Peters S. Comparison of intrathecal synthesis of *Treponema pallidum*-specific IgG antibodies and polymerase chain reaction for the diagnosis of neurosyphilis. *Zbl Bakt*, 1996, 283: 295-305.
107. Muller F. The 19S (IgM)-FTA-ABS test in the serodiagnosis of syphilis. Technique, sources of error and diagnostic information of results (author's transl)]. *Immun Infekt*, 1982; 10: 23-34. [German]
108. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vivo*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 1986; 51: 263-273.
109. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scient Amer*, 1990; 262: 56-65.
110. Musher DM, Knox JM. Syphilis and yaws. In: Schell RF, Muscher DM (eds) Pathogenesis and Immunology of Treponemal Infection. Marcel Dekker Inc, 1983, pp. 101-120.
111. Navarro FA. Venereo, venerable, veneno, venado y otros primos hermanos del vandio. *Panace*, 2001; 2: 42-44.
112. Nelson RA, Jr, Mayer MM. Immobilization of *Treponema pallidum* in vitro by antibody produced in syphilitic infection. *J Exp Med*, 1949; 89: 369-393.
113. Newton CR, Graham A. PCR. 2. Aufl., Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin, Oxford, 1994.
114. Ng SY, Gunning P, Eddy R, Ponte P, Leavitt J, Shows T, Kedes L. Evolution of the functional human beta-actin gene and its multi-pseudogene family: conservation of noncoding regions and chromosomal dispersion of pseudogenes. *Mol Cell Biol*, 1985; 5: 2720-2732.
115. Nichols HJ, Hough WH. Demonstration of *Spirochaeta pallida* in the cerebrospinal fluid. *JAMA*, 1913; 60: 108.

116. Noordhoek GT, Hermans PW, Paul AN, Schouls LM, van der Sluis JJ, van Embden JD. *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* (Nichols) and *Treponema pallidum* subspecies *pertenue* (CDC 2575) differ in at least one nucleotide: comparison of two homologous antigens. *Microb Pathog*, 1989; 6: 29-42.
117. Noordhoek GT, Wolters EC, de Jonge MEJ, van Embden JDA. Detection by polymerase chain reaction of *Treponema pallidum* DNA in cerebrospinal fluid from neurosyphilis patients before and after antibiotic treatment. *J Clin Microbiol*, 1991; 29: 1976-1984.
118. Norris S. In vitro cultivation of *Treponema pallidum*: independent confirmation. *Infect Immun*, 1982; 36: 437-439.
119. Norris SJ, Larsen SA. *Treponema* and other host-associated spirochetes. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover RH (eds) *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed., ASM Press, Washington D.C., 1995, pp.636-651.
120. Norris SJ, Weinstock GM. The genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete: will clinicians benefit? *Curr Opin Infect Dis*, 2000; 13: 29-36.
121. Norris SJ. Polypeptides of *Treponema pallidum*: progress toward understanding their structural, functional, and immunologic roles. *Treponema pallidum* Polypeptide Research Group. *Microbiol Rev*, 1993; 57: 750-779.
122. O'leary PA, Cole HN, Moore JE, Stokes JH, Wile UJ, Parran T, Vonderlehr RA, Usilton LJ. Cooperative clinical studies in the treatment of syphilis: asymptomatic neurosyphilis. *Vener Dis Infect*, 1937; 18: 45-65.
123. O'Mahony C, Rodgers CA, Mendelsohn SS, Sissons G, McKay A, Devine J, Keeping IM. Rapidly progressive syphilis in early HIV infection. *Int J STD AIDS*, 1997; 8: 275-277.
124. Orle KA, Gates CA, Martin DH, Body BA, Weiss JB. Simultaneous PCR detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and herpes simplex virus types-1 and -2 from genital ulcers. *J Clin Microbiol*, 1996; 34: 49-54.
125. Orrego C. Organization a laboratory for PCR work. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). *PCR protocols: a Guide to Methods and Application*. Academic Press, Inc, 1990, pp. 447-454.
126. Palmer HM, Higgins SP, Herring AJ, Kingston MA. Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom. *Sex Transm Inf*, 2003; 79: 479-483.
127. Petzoldt D. Syphilis. In: Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC, Landthaler M (Hrsg) *Dermatologie und Venerologie*. 5. Aufl. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2005, S. 227-245.
128. Phelps RG, Knispel J, Tu ES, Cernainu G, Saruk M. Immunoperoxidase technique for detection spirochetes in tissue sections: comparison with other methods. *Int J Dermatol*, 2000; 39: 609-613.
129. Pietravallo M, Pimpinelli F, Maini A, Capoluongo E, Felici C, D'Auria L, DiCalro A, Ameglio F. Diagnostic relevance of polymerase chain reaction technology for *T. pallidum* in subjects with syphilis in different phases of infection. *Microbiologica*, 1999; 22: 99-104.
130. Pillay A, Liu H, Chen CY, Holloway B, Sturm AW, Steiner B, Morse SA. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. *Sex Transm Dis*, 1998; 25: 408-414.
131. Podwinska J, Lusak M, Zaba R, Bowszyc J. The pattern and level of cytokines secreted by Th1 and Th2 lymphocytes of syphilitic patients correlate to the progression of the disease. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2000; 28: 1-14.
132. Podwinska J, Zaba R, Chomik M, Bawszyc J. The ability of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of syphilitic patients to produce IL-2. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1995; 12: 17-28.

133. Porcella SF, Schwan TG. *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum*: a comparison of functional genomics environmental adaptations, and pathogenic mechanisms. *J Clin Invest*, 2001; 107: 651-656.
134. Portnoy J, Carson W, Smith CA. Rapid plasma reagin test for syphilis. *Public Health Rep*, 1957; 72: 761-766.
135. Powell ML, Cook DC. The myth of syphilis: the natural history of treponematoses in North America. Florida museum of Natural History: Ripley P. Bullen Series, 2005, 544 p.
136. Radolf JD, Robinson EJ, Bourell KW, Akins DR, Porcella SF, Weigel LM, Jones JD, Norgard MV. Characterization of outer membranes isolated from *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Infect Immun*, 1995; 63: 4244-4252.
137. Rathlev T. Haemagglutination tests utilizing antigens from pathogenic and apathogenic *Treponema pallidum*. *WHO/VDT Res*, 1965; 77: 65.
138. Relapsing fever. In: Bacterial diseases caused by spirochetes. The Merck Manual in Diagnosis and Therapy. [<http://www.merck.com/mrkshared/mmanual/section13/chapter157/157f.jsp>]
139. Ricord Ph. Leçons Sur le Chancre. A. Delahaye, Paris, 1858.
140. Ricord Ph. Traité pratique des maladies vénériennes ou recherches critiques et expérimentales sur l'inoculation appliquée à l'étude de ces maladies. Rouvier et Le Bouvier, Paris, 1838.
141. Robert-Koch-Institut. Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten, Berichtsmonat Dezember 2003 (Stand 01.03.2004). *Epidem Bul*, 2004; 10: 85-88.
142. Robert-Koch-Institut. Aktuelle Statistik meldepflichtiger Infektionskrankheiten, Berichtsmonat April 2004 (Stand 01.07.2004). *Epidem Bul*, 2004; 28: 223-226.
143. Rodes B, Liu H, Johnson S, George R, Steiner B. Molecular cloning of a gene (*polA*) coding for an unusual DNA polymerase I from *Treponema pallidum*. *J Med Microbiol*, 2000; 49: 657-667.
144. Romanowski B, Forsey E, Prasad E, Lukehart S, Tam M, Hook EW. Detection of *Treponema pallidum* by fluorescent monoclonal antibody test. *Sex Transm Dis*, 1987; 22: 156-159.
145. Rose M. Origins of syphilis. *Archeol*, 1997, [<http://www.archaeology.org/9701/newsbriefs/syphilis.html>].
146. Rothschild BM, Rothschild C. Treponemal disease revisited: skeletal discriminators for yaws, bejel, and venereal syphilis. *Clin Infect Dis*, 1995; 20: 1402-1408.
147. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science*, 1985; 230: 1350-1354.
148. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
149. Sanchez M, Luger AFH. Syphilis. In: Fitzpatrick TB, Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI (eds) *Dermatology in General Medicine*. Vol. 1, 4th ed., McGraw-Hill, NY, 1993; pp. 2703-2742.
150. Sanchez MR. Syphilis. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI (eds) *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. Vol. 1, 5th ed., McGraw-Hill, NY, 1999; pp. 2551-2581.
151. Sanchez PJ, Wendel Jr GD, Grimpel E, Goldberg M, Hall M, Arencibia-Mireles Grad, Radolf JD, Norgard MV. 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; 167: 148-157.
152. Schaudinn F, Hoffmann E. Vorläufiger Bericht über das Vorkommen von Spirochäten in syphilitischen Krankheitsprodukten und bei Papillomen. *Arb Gesundheitsamt Berlin*, 1904-1905; 22: 527-534.

153. Schell RF. Rabbit and hamster models of treponemal infection. In: Schell RF, Muscher DM (eds) Pathogenesis and Immunology of Treponemal Infection. Marcel Dekker Inc, 1983, pp. 121-135.
154. Schmidt BL, Luger A, Duschet P, Seifert W, Gschnait F. Spezifische IgM-Teste in der Syphilis-Diagnostik. *Hautarzt*, 1994; 45: 1432-1173.
155. Schmidt BL. Solid-phase hemadsorption: a method for rapid detection of *Treponema pallidum*-specific IgM. *Sex Transm Dis*, 1980; 7: 53-58.
156. Schöfer H, Brockmayer NH, Hagedorn H.J, Hamouda O, Handrick W, Krause W, Marcus U, Münstermann D, Petry KU, Prange H, Potthoff A, Gross G. Syphilis – Leitlinien der DSTDG zur Diagnostik und Therapie, 2005 [<http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/059-002.htm>].
157. Schofer H, Imhof M, Thoma-Greber E, Brockmeyer NH, Hartmann M, Gerken G, Pees HW, Rasokat H, Hartmann H, Sadri I, Emminger C, Stellbrink HJ, Baumgarten R, Plettenberg A. Active syphilis in HIV infection: a multicentre retrospective survey. The German AIDS Study Group (GASG). *Genitourin Med*, 1996; 72: 176-181.
158. Schroeder HW Jr, Torres RM. B-cell antigen receptor genes, gene production and coreceptors. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzin BL, Schroeder HW Jr (eds) Clinical Immunology: Principles and Practice. 2nd ed., Mosby, 2001, pp. 4.1-4.18.
159. Sellati TJ, Waldrop SL, Salazar JC, Bergstresser PR, Picker LJ, Radolf JD. The coetaneous response in humans to *Treponema pallidum* lipoprotein analogues involves cellular elements of both innate and adaptive immunity. *J Immunol*, 2001; 166: 4131-4140.
160. Sellati TJ, Wilkinson DA, Sheffield JS, Koup RA, Radolf JD, Norgard MV. Virulent *Treponema pallidum*, lipoprotein, and synthetic lipopeptides induce CCR5 on human monocytes and enhance their susceptibility to infection by human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis*, 2000; 181: 283-293.
161. Singh AE, Romanowski B. Syphilis: review with emphasis on clinical, epidemiologic, and some biologic features. *Clin Microb Rev*, 1999; 12: 187-209.
162. Smibert RM. Genus III: *Treponema* Schaudinn 1905, 1728^{AL}. In: Kreig NR, Holt JG (eds). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984, pp. 49-57.
163. Smikle MF, James OB, Prabhakar P. Biological false positive serological tests for syphilis in the Jamaican population. *Genitourin Med*, 1990; 66: 76-78.
164. Sonmez E, Ozerol IH, Senol M, Kizilkaya N, Sahin K, Ozbilge H. False-positive reaction between syphilis and hepatitis C infection. *Isr J Med Sci*, 1997; 33: 724-727.
165. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 1975; 98: 503-517.
166. Steiner G. Modified silver stain of microorganisms in tissues. *Am J Clin Pathol*, 1950; 20: 489-490.
167. Stokes JH, Beerman H. The fundamental bacteriology, pathology and immunology of syphilis. In: Stokes JH (ed) Modern Clinical Syphilology: Diagnosis, Treatment, Case studies, 2nd ed., W.B. Saunders Comp., Philadelphia, London, 1942, pp. 17-57.
168. Sutton M, Liu H, Steiner B, Pillay A, Mickey T, Finelli L, Morse S, Markowitz LE, Louis ES. 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.
169. Sykes JA, Miller JN, Kalan AJ. *Treponema pallidum* within cells of a primary chancre from a human female. *Br J Vener Dis*, 1974; 50: 40-44.
170. Sykes JA, Miller JN. Intracellular location of *Treponema pallidum* (Nichols strain) in the rabbit testis. *Infect Immun*, 1971; 4: 307-314.

171. Tanaka S, Suzuki T, Shimada K, Nishioka K. Low molecular weight-IgM antibody in syphilis detected by *Treponema pallidum* immune adherents (TPTA) test. *Med Microbiol Immunol*, 1984; 173: 155-165.
172. Taylor GL, Race RR, Prior AM, Ikin EW. Frequency of the iso-agglutinin α_1 in the serum of the subgroups A₂ and A₂B. *J Pathol Bacteriol*, 1942; 54: 514-516.
173. Thomas DD, Navab M, Haake DA, Fogelman AM, Miller JN, Lovett MA. *Treponema pallidum* invades intercellular junctions of endothelial cell monolayers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 3608-3612.
174. Tuffanelli DL. Aging and false-positive reactions for syphilis. *Br J Vener Dis*, 1966; 42: 40-41.
175. Van Voorhis WC, Barkett LK, Nasio JM, Plummer FA, Luckehart SA. Lesions of primary and secondary syphilis contain activated cytolytic T cells. *Infect Immun*, 1996; 64: 1048-1050.
176. Van Voorhis WC, Barrett LK, Koelle DM, Nasio JM, Plummer FA, Lukehart SA. Primary and secondary syphilis lesions contain mRNA for Th1 cytokines. *J Infect Dis*, 1996; 173: 491-495.
177. Villanueva AV, Podzorski RP, Reyes MP. Effect of various handling and storage conditions on stability of *Treponema pallidum* DNA in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*, 1998; 36: 2117-2119.
178. Volkenandt M, Schlüpen E-M, Gizycki-Nienhaus von B. Zytologie. In: Korting HC, Sterry W (Hrsg) Diagnostische Verfahren in der Dermatologie, Blackwell Wissenschaft-Verlag, Berlin, Wien, 1997, S. 133-136.
179. Warthin AS, Starry AC. A more rapid and improved method of demonstrating spirochetes in tissues (Warthin and Starry's Cover-glass Method). *Am J Syph Gon Ven Dis*, 1920; 4: 97.
180. Wasserman A, Neiser A, Bruck C. Eine serodiagnostische Reaktion bei Syphilis. *Dtsch Med Wochenschr*, 1906; 32: 745-746.
181. Weinstock GM, Hardham JM, McLeod MP, Sodergren EJ, Norris SJ. The genome of *Treponema pallidum*: new light on the agent of syphilis. *FEMS Microbiol Rev*, 1998; 22: 323-332.
182. Wenhai L, Jianzhong Z, Cao Y. Detection of *Treponema pallidum* in skin lesions of secondary syphilis and characterisation of the inflammatory infiltrate. *Dermatology*, 2004; 208: 94-97.
183. Wicher K, Abbruscato F, Wicher V, Collins DN, Auger I, Horowitz H. Identification of persistent infection in experimental syphilis by PCR. *Infect Immun*, 1998; 66: 2509-2513.
184. Wicher K, Noordhoek GT, Abbruscato F, Wicher V. Detection of *Treponema pallidum* in early syphilis by DNA amplification. *J Clin Microbiol*, 1992; 30: 497-500.
185. Wicher K, Wicher V. Immunopathology of syphilis. In: Schell RF, Muscher DM (eds) Pathogenesis and Immunology of Treponemal Infection. Marcel Dekker Inc, 1983, pp. 139-160.
186. Wienecke R, Neubert U, Volkenandt M. Molecular detection of *Borrelia burgdorferi* in formalin-fixed, paraffin-embedded lesions of Lyme disease. *J Cutan Pathol*, 1993; 20: 385-388.
187. Wuepper KD, Tuffanelli DL. False-positive reaction to VDRL test with prozone phenomena: association with lymphosarcoma. *JAMA*, 1966; 195: 868-869.
188. Young H, McMillan A. Syphilis and the endemic treponematoses. In: McMillan A, Young H, Ogilvie MM, Scott GR (eds.) Clinical Practice in Sexually Transmitted Infections. Saunders, Elsevier Science Limited, London, 2002, pp.396-456.
189. Zoehling N, Schluepen EM, Soyer HP, Kerl H, Volkenandt M. Molecular detection of *Treponema pallidum* in secondary and tertiary syphilis. *Br J Dermatol*, 1997; 136: 683-688.

DANKSAGUNG

Besonders herzlich danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Christoph Prinz für die Überlassung des Themas, für die wissenschaftliche Betreuung, für wichtige fachliche Anregungen, für sein hohes, unangescränktes persönliches Engagement und für die vielseitige Unterstützung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Gerd Plewig, FRCP, vormaligen Klinikdirektor, danke ich für seine Unterstützung bei der Durchführung dieser Dissertation.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Thomas Ruzicka, Direktor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München, danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Haus Fertigstellen zu dürfen.

Herzlich bedanke ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Dipl.-Biol. Paul Trommler, für die kreative Zusammenarbeit, für die praktische Betreuung bei der Durchführung der Experimente und für den unangescränkten Transfer von methodischen Erfahrungen und Wissen.

Ebenso möchte ich mich bei Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München, Frau Sigrid Vollmer, MTA der Arbeitsgruppe Herrn Univ.-Prof. Dr. med. J.C. Prinz, und Frau Erika Müller-Sander, MTA, für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft im Labor bedanken.

Mein herzlicher Dank richtet sich auch an die Mitarbeiterinnen des Serologie-Labors der Klinik, Frau Susanne Multhaupt, MTA, und Dagmar Nau, MTA, für ihre hohe Hilfsbereitschaft und für die fachliche Betreuung bei den serologischen Untersuchungen.

Frau Prof. Dr. med. Bettina Wilske, Leiterin des Nationales Referenzzentrums für Lyme-Borreliose des Max-von-Pettenkofer-Institutes der LMU München, danke ich herzlich für die freundliche Zuverfügungstellung von Seren und Liquor-Proben von Patienten mit Neurosyphilis.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei wissenschaftlichen Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München, besonders bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Thomas Herzinger und Herrn Dr. med. Peter Weisenseel, als auch bei Frau Dr. med. Theda Schuh, Herrn Dr. rer. hum. biol. Robert Besch und Herrn Prof. emerit. Walter H.C. Burgdorf M.D., für ihre wichtige, fachliche Anregungen und Korrekturen bei der Fertigstellung dieser Dissertation bedanken.

Dem Ministerium für Bildung und Wissenschaft Russlands und dem Deutschen Akademischen Austauschdienst Bonn (DAAD) danke ich für die große Ehre, mit dem Elitestipendium des Präsidenten der Russischen Föderation (1997-1998) und einem DAAD-Forschungsstipendium (2001-2002) ausgezeichnet und unterstützt worden zu sein. Diese Stipendien ermöglichten mir die wissenschaftliche Aus- und Weiterbildung in der Arbeitsgruppe von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. J.C. Prinz und in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München, als auch die Durchführung dieser Doktorarbeit.

ACKNOWLEDGMENT

I would like to especially thank Professor Jörg Christoph Prinz MD, Department of Dermatology & Allergology, Ludwig-Maximilians University, Munich, whose help was essential from the day I selected my topic until the work was completed. He provided scientific advice, expanded my knowledge of dermatology and was always available to me as a friend and mentor.

I would also like to thank for following individuals and groups:

Professor Gerd Plewig MD DSc (Hons mult) FRCP, former Chairmen of the Department of Dermatology & Allergology, Ludwig-Maximilians University, Munich, for his support over the many years required for this dissertation.

Professor Thomas Ruzicka MD DSc (Hons), Chairman of the Department of Dermatology & Allergology, Ludwig-Maximilians University, Munich, for allowing me to finish and submit this work under his aegis.

Dr Paul Trommler PhD, for teaching me so much about the methodological approach to my topic and his practical help in carrying out the experiments.

Ms. Sigrid Vollmer and Mrs. Erika Müller-Sander, both laboratory technicians in the Department of Dermatology, Ludwig-Maximilians University, Munich, helped me with many of the experiments and were always available to provide support. Similarly the help of Mrs. Susanne Multhaupt and Ms. Dagmar Nau, the laboratory technicians in the serology laboratory of the department, was essential for the serological studies.

Professor Bettina Wilske MD, Director of the National Reference Center for Lyme Borreliosis at the Max von Pettenkofer Institute, Ludwig-Maximilians University, Munich, was kind enough to provide serum and cerebrospinal fluid samples from patients with neurosyphilis.

All my colleagues in the Department of Dermatology & Allergology, Ludwig-Maximilians University, Munich, for their support, especially Assistant Professor Thomas Herzinger MD, Peter Weisenseel MD, Theda Schuh MD, Robert Besch PhD, and Walter H.C. Burgdorf MD, both for their help with my work and with the final preparation of this doctoral thesis.

Finally, I deeply thank the Ministry for Education and Science of Russian Federation, and the German Academic Exchange Service (DAAD) for the honors of receiving the Elite Scholarship of the President of Russian Federation (1997-1998) and the DAAD Research Scholarship (2001-2002). These scholarships made possible my scientific education and postgraduate research training in the laboratory of Professor J.C. Prinz MD at the Department of Dermatology & Allergology, Ludwig-Maximilians University, Munich.

PUBLIKATIONEN AUS DER DOKTORARBEIT/ PUBLICATIONS FROM THE DOCTORAL THESIS

Publikationen

Publications

1. **Kouznetsov AV**, Prinz JC (2002) Molecular diagnosis of syphilis: the Schaudinn-Hoffmann lymph-node biopsy. *Lancet*, 360: 388-389.
2. **Kouznetsov AV**, Prinz JC (2003) Papulopustulöse Syphilid bei einem HIV-infiziertem Patient im Stadium B2 (CDC). In: Plewig G, Prinz JC (Hrsg) Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie, Bd. 18. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, S. 663-666.
3. **Kouznetsov AV**, Prinz JC (2003) Syphilis: nouveau test diagnostique. *Rev Franc Labor*, 349: 16.
4. **Kouznetsov AV**, Weisenseel P, Trommler P, Multhaupt S, Prinz JC. (2005) Detection of 47-kDa immunogene gene of *Treponema pallidum* in various tissue sources. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 51; 143-145.
5. **Kouznetsov AV**, Burgdorf WHC, Prinz JC. (2005) Latent syphilis confirmed by polymerase chain reaction in two HIV-infected patients with inconclusive serological testing. *Arch Dermatol*, 141; 1169-1170.

Kongressbeiträge

Congress presentations

1. **Kouznetsov AV**, Trommler P, Prinz JC (2001) Detection of *Treponema pallidum* DNA by PCR. 10th Congress of European Academy of Dermatology and Venereology (EADV): October 10-14th, 2001, Munich, Germany; Poster/ Abstract in *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 15: 258
2. **Kouznetsov AV**, Trommler P, Prinz JC (2002) Tissue sources for molecular diagnosis of *Treponema pallidum* infection. 29th Annual Meeting of German Society of Dermatological Research (ADF). 28.02.-02.03.2002, Berlin, Germany; Poster/ Abstract in *Arch Dermatol Res*, 294: 66 [P129]
3. **Kouznetsov AV**, Prinz JC (2003). Nachweis *Treponema pallidum* mittels PCR. 49. Tagung der Deutschen STD-Gesellschaft (DSTDG), Juli 2003, München, Deutschland (Oral presentation)
4. **Kouznetsov AV**, Prinz JC (2004) Molecular diagnosis of *Treponema pallidum* infection: from research to clinic. 13th Congress of European Academy of Dermatology and Venereology (EADV), November 2004, Florence, Italy; Oral presentation/ Abstract in *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 18: 183 [FC12.13]

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name, Vornahme	Kuznetsov, Alexander Vasilevich
Geburtsdatum, -Ort	20. Januar 1974, Moskau, Russland
Nationalität	russisch
Eltern	Vater: Dipl.-Ing. Vasily A. Kuznetsov, Abteilungsleiter der Russischen Flugzeugbaukorporation „MIG“, Moskau Mutter: Prof. Dr. Tatyana Ya. Kuznetsova, M.A., Leiterin des Lehrstuhls für Bibliothekswesens und Informatik, Fortbildungsakademie für Mitarbeiter der Kunst, Kultur und Tourismus (APRIKT), Kultusministerium Russlands, Moskau

Schulbildung

Sept 1981 – Aug 1989	Mittelschule Nr. 51 mit vertieftem Deutschunterricht, Moskau
Sept 1989 – Aug 1992	Moskauer medizinische Fachschule der Russischen Akademie der medizinischen Wissenschaften, Ausbildung zum medizinischen Laborassistenten; Diplom mit Auszeichnung des medizinischen Laborassistenten, Fachabitur für Labormedizin

Hochschulstudium

Sept 1993 – Sept 1997	Studium der Humanmedizin, I.M. Sechenov Moskauer Medizinische Akademie
Okt 1997 - Aug 1998	Studium der Humanmedizin, Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Elitestipendiat des Präsidenten der Russischen Föderation
Sept 1998 - Juni 2000	Studium der Humanmedizin, I.M. Sechenov Moskauer Medizinische Akademie; Diplom mit Auszeichnung, Qualifikation Arzt der Humanmedizin mit russischer Approbation
Apr 2002 – März 2005	Promotionsstudium (Dr. med.) an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berufstätigkeit

Sept 1992 – März 1993	Medizinischer Laborassistent des Biochemielabors, Forschungsinstitut für Rheumatologie, Russische Akademie der medizinischen Wissenschaften, Moskau
Sept 2000 – Sept 2001	Assistenzarzt der Universitätsklinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten (Direktor Prof. Dr. Oleg L. Ivanov), I.M. Sechenov Moskauer Medizinische Akademie
Okt 2001 – 2008	Forschungsstipendiat der DAAD, SFB 571 LMU, Rene Touraine-Foundation bis Juli 2003; Assistenzarzt in der Facharztausbildung/ wiss. Assistent der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie (Direktoren: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Gerd Plewig bis 30.04.06; Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas Ruzicka), Ludwig-Maximilians-Universität München

*CURRICULUM VITAE***Personal Data**

Surname, First name	Kuznetsov, Alexander Vasilevich
Birth date, place	January 20 th 1974, Moscow, Russia
Nationality	Russian
Parents	Father: Vasily A. Kuznetsov MSc, Head of the Department of the Russian Aircraft Construction Corporation "MIG", Moscow Mother: Prof. Tatyana Ya. Kuznetsova MA PhD, Chair of the Department of Library Science & Informatics, Academy for Postgraduate Training in Art, Culture, and Tourism (APRIKT), Ministry of Culture of Russia, Moscow

School education

Sept 1981 – Aug 1989	Highschool # 51 with advanced study of German, Moscow
Sept 1989 – Aug 1992	Moscow Medical College of Russian Academy of Medical Sciences, Education for Laboratory Assistant, Diploma of Laboratory Assistant with Honors

University Education

Sept 1993 – Sept 1997	Medicine at the I.M. Sechenov Moscow Medical Academy
Oct 1997 - Aug 1998	Medicine at the Ludwig-Maximilians University, Munich, Elite Scholarship of the President of Russian Federation
Sept 1998 - June 2000	Medicine at the I.M. Sechenov Moscow Medical Academy, Diploma with Honors of Medical Doctor, MD (Hons)
Apr 2002 – March 2005	Doctoral research education with preparation of MD dissertation (DMed) at the Medical Faculty of the Ludwig-Maximilians University, Munich

Professional carrier

Sept 1992 – March 1993	Laboratory Assistant, Biochemistry Lab of the Research Institute of Rheumatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow
Sept 2000 – Sept 2001	Resident at the Department of Dermatology & Venereology (Chair Prof. Oleg L. Ivanov MD PhD DSc), I.M. Sechenov Moscow Medical Academy
Oct 2001 – 2008	Research Fellow of DAAD, SFB 571 LMU, Rene Touraine Foundation at the Department of Dermatology & Allergology (Chairs Prof. Gerd Plewig MD DSc (Hons mult) FRCP until 30.04.2006, and Prof. Thomas Ruzicka MD DSc (Hons)), Ludwig-Maximilians University, Munich, until July 2003 Resident at the Department of Dermatology & Allergology, Ludwig-Maximilians University, Munich