



**MASARYKOVA UNIVERZITA**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Ústav experimentální biologie**  
**Oddělení genetiky a molekulární**  
**biologie**

---



# **Potenciální cíle pro vývoj vakcíny u patogenních treponem**

**Bakalářská práce**

**Eliška Vrbová**

## Bibliografický záznam

**Autor:** Eliška Vrbová  
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita  
Ústav experimentální biologie

**Název práce:** Potenciální cíle pro vývoj vakcíny u patogenních treponem

**Studijní program:** PřF B-EXB Experimentální biologie

**Studijní obor:** PřF BIMG Molekulární biologie a genetika

**Vedoucí práce:** prof. MUDr. David Šmajš, Ph.D.

**Akademický rok:** 2015/2016

**Počet stran:** 42

**Klíčová slova:** *Treponema pallidum*, syfilis, vakcína, imunizace, povrchové proteiny, antigeny

## Bibliographic Entry

**Author:** Eliška Vrbová  
Faculty of Science, Masaryk University  
Department of Experimental Biology

**Title of Thesis:** Potential targets for vaccine development in pathogenic treponemes

**Degree Programme:** PřF B-EXB Experimental Biology

**Field of Study:** PřF BIMG Molecular Biology and Genetics

**Supervisor:** prof. MUDr. David Šmajš, Ph.D.

**Academic Year:** 2015/2016

**Number of Pages:** 42

**Keywords:** *Treponema pallidum*, syphilis, vaccine, vaccination, surface proteins, antigens

## Abstrakt

V bakalářské práci se věnuji onemocnění syfilis a charakterizuji jejího původce *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* spolu s dalšími patogenními treponemami. Dále se zaměřuji na hledání možných kandidátů pro vývoj vakcíny proti syfilis. Celkem popisují výsledky imunizace prostřednictvím 21 rozdílných struktur. Mezi tyto struktury patří především proteiny s antigenní povahou a povrchovou lokalizací, které tvoří většinou část kandidátů. Dále byly pro účely imunizace testovány i celé bakterie či protilátky a T-lymfocyty. Průběh infekce, resp. účinnost vakcíny je hodnocena podle povahy lézí, rychlosti jejich vzniku a positivity na přítomnost živých motilních treponem. Většinou bylo dosaženo jen částečné protekce, kvůli čemuž hrozí, že infekce bude asymptomatická, zůstane nerozpoznána a vyvine se v pozdější stádia. V ojedinělých případech imunizace spíše zhoršila průběh infekce. Vakcinací se plné protekce dosáhlo jen v jediném případě celobuněčné vakcíny, nicméně vakcinační protokol byl příliš náročný, než aby mohl být zaveden do praxe.

## Abstract

In this thesis I deal with disease syphilis and characterize its causative agent *Treponema pallidum* subs. *pallidum* together with other pathogenic treponemes. I searched also for potential candidates for the development of vaccine against syphilis. In total, this thesis describes the results of immunization with 21 different structures, including antibodies and T-lymphocytes used in passive immunization, whole cells, and proteins with antigenic character and surface localization, which form the majority of candidates. The efficiency of the vaccine is determined by the nature of lesions, time of their appearance and positivity for the presence of live motile treponemes. Only partial protection is usually achieved, which might lead to asymptomatic infection and development of later stages of disease. In several cases, the immunization rather worsened the course of infection. Full protection by vaccination was reached in only one case, using a whole-cell vaccine, but the vaccination protocol was too demanding to be applied in practice.



MASARYKOVA UNIVERZITA  
Přírodovědecká fakulta

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Akademický rok: 2015/2016

**Ústav:** Ústav experimentální biologie  
**Studentka:** Eliška Vrbová  
**Program:** Experimentální biologie  
**Obor:** Molekulární biologie a genetik

Ředitel Ústavu experimentální biologie PFF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje bakalářskou práci s tématem:

**Téma práce:** Potenciální cíle pro vývoj vakcíny u patogenních treponem  
**Téma práce anglicky:** Potential targets for vaccine development in pathogenic treponemes

### Oficiální zadání:

Syfilis patří mezi významné sexuálně přenosné choroby s roční celosvětovou incidencí přesahující 10 milionů nových případů. Jenou z možností kontroly tohoto onemocnění je vakcinace. I přes dosavadní snahy a pokroky ve výzkumu syfilis na poli genomiky a proteomiky se dosud nepodařilo získat účinná vakcína proti původci syfilis. Tato práce by měla shrnout poznatky o vývoji vakcíny proti syfilis a zmapovat potenciální proteinové kandidáty pro její vývoj.

**Jazyk závěrečné práce:** čeština

**Vedoucí práce:** prof. MUDr. David Šmajš, Ph.D.

**Datum zadání práce:** 19. 10. 2015

**V Brně dne:** 11. 11. 2015

Souhlasím se zadáním (podpis, datum):

Eliška Vrbová  
studentka

prof. MUDr. David Šmajš, Ph.D.  
vedoucí práce

prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.  
ředitel Ústavu experimentální  
biologie

# Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Davidu Šmajsovi, Ph.D., a Mgr. Lence Paštěkové, Ph.D. za ochotu a pomoc, které mi věnovali v průběhu psaní bakalářské práce. Práce byla vypracována na Biologickém ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

**Brno 30. dubna 2016**

*Eliška Vrbová*

.....  
Eliška Vrbová

## Obsah:

1	Úvod.....	10
2	Patogenní treponemy.....	11
2.1	Obecná charakteristika.....	11
2.2	<i>Treponema pallidum</i> .....	11
2.2.1	<i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i> (TPA) .....	11
2.2.2	<i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pertenue</i> (TPE), subsp. <i>endemicum</i> (TEN) .....	12
2.2.3	Zkřížená imunita mezi virulentními treponemami .....	13
2.3	<i>Treponema carateum</i> .....	14
2.4	<i>Treponema paraluisleporidarum</i> ecovar <i>Cuniculus</i> .....	14
3	Syfilis .....	14
3.1	Primární syfilis.....	14
3.2	Sekundární syfilis .....	15
3.3	Terciární a latentní fáze .....	16
3.4	Kongenitální syfilis.....	17
3.5	Léčba.....	17
4	Vakcinace .....	17
4.1	Pasivní imunizace .....	19
4.1.1	Pasivní imunizace pomocí T-lymfocytů.....	19
4.2	Aktivní imunizace.....	20
4.2.1	Typy vakcín.....	20
5	Vakcína proti syfilis – kandidáti na vakcínu .....	22
5.1	Použití celých buněk.....	24
5.2	Proteiny vnější membrány (OMP).....	24
5.2.1	Proteiny aktivní při vazbě na eukaryotické buňky .....	25
5.2.2	Tpr genová rodina.....	25



5.2.3	Tp92 (TP0326) .....	26
5.2.4	Glycerolfosfodiester fosfodiesteráza (TP0257).....	27
5.2.5	4D (TP1031).....	28
5.2.6	Tmp proteiny ( <i>T. pallidum</i> membrain protein).....	29
5.2.7	Tromp proteiny ( <i>T. pallidum</i> rare outer protein) .....	29
5.2.8	15 kDa lipoprotein (TP0171).....	29
5.3	Endoflagelum.....	30
5.4	Neproteinoví kandidáti .....	30
6	Závěr.....	31
7	Literatura .....	33

# 1 Úvod

Sexuálně přenosné choroby jsou v dnešní době významným zdravotnickým problémem. Každým rokem přibývají milióny nemocných, a proto je třeba se kromě hledání účinné léčby zaměřit i na prevenci, a to včetně možného očkování.

Ve své bakalářské práci se zabývám hledáním vhodných kandidátních buněčných struktur pro vývoj vakcíny proti bakterii *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, původci syfilis.

Syfilis patří mezi jednu z významných sexuálně přenosných nemocí. Onemocnění probíhá v několika stádiích, přičemž ty pozdější se projevují při neléčení infekce. Za rok 2008 se počet lidí trpících touto chorobou odhaduje na 36,4 miliónů (World Health Organization, 2012a). V České republice pak bylo v roce 2012 zjištěno 696 případů (Ústav zdravotnické informatiky a statistiky ČR, 2012) se dvěma případy vrozené syfilis.

Přestože se jedná o poměrně snadno léčitelnou nemoc, problémem může být její diagnostika například kvůli přítomnosti protilátek z předchozí infekce, stejně jako včasné vyhledání lékaře, když primární vřed, který je nebolestivý, zůstane nepovšimnut. Další významné problémy zahrnují přenos z matky na plod či možnost koinfekce s HIV, jemuž probíhající nemoc usnadňuje vstup do organismu přes porušenou mukózu i vstup do T-lymfocytů díky jejich aktivaci bakteriální infekcí.

Vzhledem k tomu, že člověk je jediným rezervoárem bakterie *T. pallidum* subsp. *pallidum*, byla by tato nemoc vhodná k eradikaci. Vakcína proti syfilis by také mohla účinkovat na další poddruhy této bakterie, protože jsou si geneticky velmi podobné, a pomoci tedy vymýtit například i yaws (frambézii).

## 2 Patogenní treponemy

### 2.1 Obecná charakteristika

Patogenní treponemy jsou gramnegativní nekultivovatelné spirochety. Do rodu *Treponema* patří jak zvířecí, tak i lidské patogeny. Mezi lidské patogeny patří *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, subsp. *pertenue*, subsp. *endemicum* a *T. carateum*.

Obligátně patogenní bakterie mají několik společných vlastností (Šmajš *et al.*, 2012), a to redukovanou velikost genomu a ztrátu schopnosti se množit mimo svého hostitele. Tyto vlastnosti souvisí s adaptací patogena na prostředí poskytnuté hostitelem. S adaptací na toto prostředí jsou spojeny i způsoby úniku před imunitním systémem hostitele a dlouhodobé přežívání bakterií v organismu. U treponem stojí za dlouhodobou perzistencí v organismu pravděpodobně *tpr* (*T. pallidum* repeat) geny, které ale zároveň indukují tvorbu protilátek (Leader *et al.*, 2003). Další vlastností je snížený horizontální přenos genů, obzvláště je-li patogen specializován na jednoho nebo několik málo hostitelů.

Patogenita, tj. schopnost vyvolat onemocnění, je většinou dána ostrovy patogenity. Virulenční faktory však mohou být kódovány i na mobilních genetických elementech (plazmidy, inzerční elementy, transpozony, atd.). U treponem jsou virulenční faktory kódovány na chromozomu a jedná se například o *tpr* geny, geny pro hemolyziny nebo geny pro povrchové proteiny (Weinstock *et al.*, 1998). Genetické rozdíly v různých potenciálních virulenčních faktorech pak mohou ovlivňovat specializaci na hostitele a invazivitu. Příkladem může být *arp* gen (acidic repeat protein), který obsahuje v centrálním regionu repetitivní sekvence o délce 60 bp (Pillay *et al.*, 1998), přičemž jejich počet se liší u jednotlivých druhů treponem. U repetitivních motivů byla navíc objevena korelace mezi jejich sekvenční variabilitou a sexuálním přenosem (Harper *et al.*, 2008).

### 2.2 *Treponema pallidum*

#### 2.2.1 *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* (TPA)

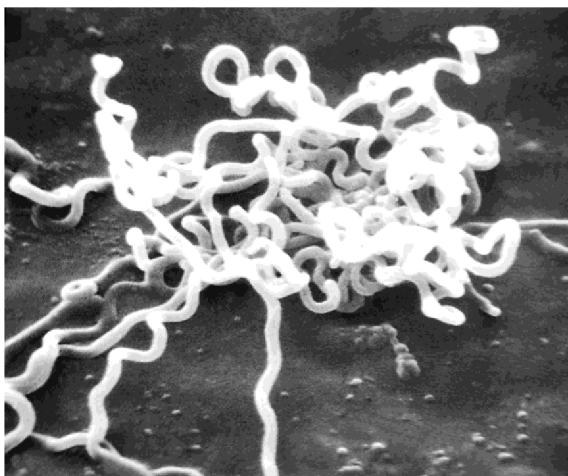
TPA je poddruh (Obr. 1) způsobující onemocnění syfilis. Ve srovnání s ostatními patogenními treponemami je nejinvazivnější a může napadat jakékoliv tkáň. Stejně jako další

patogenní spirochety není kultivovatelná v podmínkách *in vitro*, a proto se používají na její kultivaci jako vhodný model králíci (*in vivo* kultivace).

Prvním osekvenovaným kmenem TPA byl kmen Nichols (Fraser *et al.*, 1998). Velikost genomu, tvořeného jedním kružnicovým chromozomem, byla stanovena na 1 138 006 párů bazí. Ve srovnání s jinými bakteriemi je genom TPA velmi malý. Tato redukce je důsledkem toho, že bakterie získává většinu esenciálních látek z prostředí hostitele, a nemusí si je tedy vyrábět sama. Většina genomu představuje protein-kódující oblasti. Velikosti genomu jiné gramnegativní bakterie, například *Pseudomonas aeruginosa*, je 6 264 404 párů bazí (Stover *et al.*, 2000).

Různé kmeny tohoto poddruhu, které byly identifikovány v klinických vzorcích, se dají rozdělit na dvě skupiny na základě jejich sekvenční podobnosti, a to na skupiny kmenů podobné kmeni SS14 a podobné kmeni Nichols (Nechvátal *et al.*, 2014).

Obrázek 1: *T. pallidum* subsp. *pallidum* na králíčích epitelálních buňkách (<http://phil.cdc.gov/phil/details.asp?pid=1971>)



### 2.2.2 *Treponema pallidum* subsp. *pertenue* (TPE), subsp. *endemicum* (TEN)

TPE je poddruhem *T. pallidum*, jenž způsobuje onemocněním yaws (frambézie). Toto nevenerecké onemocnění, běžné v tropických zemích, se přenáší přímým kontaktem s nakaženým. Postihuje kůži, měkké tkáně, kosti a klouby a je považováno za méně infekční než syfilis. K léčbě se používá penicilin, stejně jako u nemocí způsobených příbuznými druhy.

Na základě celogenomového sekvenování původce syfilis byla stanovena sekvenční podobnost mezi TPE a TPA na 99,8 % (Čejková *et al.*, 2012). Rozdíly budou vzhledem

k rozdílné infekčnosti nejspíše ve virulenčních faktorech. V devadesátých letech byla prevalence této nemoci stanovena na 2,5 miliónu případů ročně. V současné době se předpokládá, že tato nemoc bude do roku 2020 eradikována (World Health Organization, 2012b), díky použití účinné (Mitjà *et al.*, 2015) masivní léčby, představující jednu dávku azitromycinu.

Velmi podobný kmenům způsobujících yaws je izolát Fribourg-Blanc objevený u opic, který je schopný způsobit infekci i u člověka (Smith *et al.*, 1971). Na základě velice malých sekvenčních rozdílů mezi ním a TPE (podobnost 99,97 %) byl Fribourg-Blanc zařazen mezi TPE kmene (Zobaníková *et al.*, 2013). Zvířecí rezervoár TPE by mohl být problémem při eradikaci yaws.

TEN je původce endemické syfilis (též bejel). Jedná se o nevenerické chronické onemocnění kůže a tkání. Obvykle začíná v dětství jako malý puchýřek v dutině ústní. Později se objevují léze na končetinách a na trupu a zánět kostí. Nemoc zasahuje hlavně východní Středomoří, oblast severní Afriky a Arabský poloostrov (Perine *et al.*, 1984).

### **2.2.3 Zkřížená imunita mezi virulentními treponemami**

Znalost zkřížené imunity mezi poddruhy *T. pallidum* je důležitá a je zkoumána kvůli vývoji vakcíny. V případě její existence by stačilo vyvinout jednu obecnou očkovací látku, jež by ochránila před všemi patogenními treponemami. V opačném případě by bylo třeba pro každou nemoc způsobenou jednotlivými poddruhy vyvinout vakcínu specifickou.

Křečci infikováni TPA (kmen Nichols), TEN (kmen Bosnia A) a TPE vykazovali značnou rezistenci k homologní reinfekci (Schell *et al.*, 1982). V případě reinfekce se neobjevily ani v jedné skupině léze a lymfatické uzliny obsahovaly méně treponem než při první infekci. Při infikování křečků jiným poddruhem *T. pallidum* se objevila většinou pouze částečná rezistence. Křečci prvně infikováni TPA se ukázali být rezistentní k TPE (neobjevily se žádné léze). Jedinci s prodělanou nákazou TPE byli odolní vůči kmenu Nichols (TPA) a v menší míře i proti kmeni Bosnia A (TEN), ale už se u nich objevily léze, ovšem méně rozsáhlé v porovnání se skupinou infikovanou TEN a následně infikovanou TPA či TPE. U této skupiny bylo navíc v lymfatických uzlinách měřitelné množství treponem.

Zkřížená imunita mezi TPA a TPE byla zkoumaná i u lidí (Turner, 1936). Pacienti s latentní syfilis vykazovali rezistenci vůči nákaze frambézií. Stejná studie ukázala na možnost sekundární infekce heterologním kmenem TPE po již jednou proběhlé nákaze.

Na druhou stranu jiné studie ukazují na absenci zkřížené imunity mezi virulentními treponemami (Miller, 1973). Zatímco po vakcinaci králíků  $\gamma$ -ozářenými *T. pallidum* kmene Nichols byla pozorována plná protekce proti homologní infekci, při infikování králíků kmenem TPE se objevily léze srovnatelné s lézemi u neimunizovaných králíků.

### **2.3 *Treponema carateum***

*T. carateum* je v porovnání s TPA a TPE neinvazivní druh způsobující onemocnění pinta. Pinta zasahuje hlavně kůži a je endemickou nemocí v Mexiku, Střední a Jižní Americe. Přenáší se kontaktem s infikovanou kůží. Léze se prvně objevují na ruce a nohou, v pozdních fázích nemoci může dojít k hyperpigmentaci a depigmentaci postižených míst na kůži.

### **2.4 *Treponema paraluisleporidarum* ecovar *Cuniculus***

*T. paraluisleporidarum* ec. *Cuniculus* (dříve *Treponema paraluisuniculi*) je sexuálně přenosný králičí patogen projevující se mukokutánními vředy. Infekce může připomínat syfilis, ale tento patogen není pro člověka infekční (Graves *et* Down, 1981), na rozdíl od TPA i TPE, které jsou infekční pro člověka i králíky.

Genomová analýza ukázala, že sekvenční identita mezi *T. paraluisleporidarum* ec. *Cuniculus* a kmeny způsobujícími syfilis je 99,16 % (Šmajš *et al.*, 2011).

## **3 Syfilis**

### **3.1 Primární syfilis**

K nákaze, tedy přenosu bakterií, dochází nejčastěji při pohlavní styku, kdy bakterie vstupují do organismu přes mikroabraze v membránách mukózy či v kůži. K nákaze však může dojít i skrze placentu. Podmínkou přenosu však bývá přímý kontakt s primárním nebo sekundárním vředem. Infekční dávka ID<sub>50</sub> je 57 organismů (Magnuson *et al.*, 1956).

Po vstupu do organismu jednotlivé bakterie adherují na epiteliální buňky a na komponenty extracelulární matrix kůže a mukózy (např. fibronectin, laminin a fibrinogen) pomocí svých povrchových proteinů. Na fibronectin se váží proteiny TP0155, TP0483 (Cameron *et al.*, 2004) či TP0136 (Brinkman *et al.*, 2008). Laminin s fibrinogenem jsou cílem pro TP0751 (Houston *et al.*, 2011).

Inkubační doba je 3–90 dnů, po které se na místě vstupu objeví typický, jasně ohraničený bezbolestný vřed zvaný šankr (Kent *et Romanelli*, 2008). V tomto vředu jsou proliferující bakterie obklopeny buňkami imunitního systému, tj. pomocnými T-lymfocyty, cytotoxickými T-lymfocyty, plazmatickými buňkami a makrofágy, které produkují cytokiny IL-2 a IFN- $\gamma$  (Leader *et al.*, 2007). Dochází také k místnímu zduření mízních uzlin. Během 3 až 8 týdnů se šankr zhojí, protože dojde k místní likvidaci bakterií. Bakterie jsou už touto dobou systémově rozšířeny, a to díky jejich schopnosti prostupovat skrze těsné spoje mezi endoteliálními buňkami, aby se dostaly do perivaskulárního prostoru (Thomas *et al.*, 1988), schopnosti transcytózy (Juanpere-Rodero *et al.*, 2013) a důležitá je i indukce proteinu MMP-1 (Chung *et al.*, 2002). Tento protein degraduje kolagen a usnadňuje průchod do i z krevního řečiště.

### 3.2 Sekundární syfilis

Sekundární stádium nastává 4 až 10 týdnů od začátku infekce a jejím nejtypičtějším projevem je rozsetá makulopapulární vyrážka, která postihuje i dlaně a chodidla (Štork, 2013). Objevují se nespecifické příznaky jako horečka, bolest svalů a kloubů, celková únava a záněty v organismu jako meningitida či hepatitida.

Většina symptomů je dána reakcí imunitního systému na infekci. Na endoteliálních buňkách jsou exprimovány adhezní molekuly ICAM-1, VCAM-1 a E-selektin, na které nasedají buňky imunitního systému, aby poté migrovaly do místa infekce. Expze těchto molekul je vyvolána reakcí na lipoprotein TpN47 (Riley *et al.*, 1992). Lipoproteiny vyvolávají prozánětlivou odpověď a v místech lokálních odpovědí v kůži najdeme monocyty, makrofágy, T-lymfocyty (cytotoxické CD8<sup>+</sup> i pomocné CD4<sup>+</sup>) a dendritické buňky (Stary *et al.*, 2010). Vředy po přechodnou dobu obsahují i polymorfonukleární leukocyty (Bos *et al.*, 1980).

Lipoprotein TpN47 reaguje s TLR-2 receptorem na povrchu makrofágů, čímž je indukována expze interleukinu 12 (Brightbill *et al.*, 1999). Prozánětlivé cytokiny jsou uvolňovány i dendritickými buňkami (např. IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ ) (Shin *et al.*, 2004). Monocyty jsou zase prostřednictvím mini-ferritinu TpF1 stimulovány k produkci IL-10

a TGF- $\beta$ . Tyto cytokiny podporují diferenciaci regulačních T-lymfocytů (Babolin *et al.*, 2011) a zároveň dovolují dlouhodobou perzistenci bakterií.

Humorální odpověď nastává později a protilátky třídy IgG a IgM (Hanff *et al.*, 1982) opsonizují patogena, který je poté zlikvidován prostřednictvím fagocytózy makrofágy. Vysoké hladiny protilátek indukují hlavně lipoproteiny TpN17 a TpN47 (Baker-Zander *et al.*, 1985).

### 3.3 Terciární a latentní fáze

Obě tyto stádia nastávají velmi vzácně, a to při neléčení předchozích stádií. Latentní fáze vzniká kvůli perzistenci bakterií v organismu i přes jejich lokální zničení. Bakterie přetrvávají v mnohých tkáních, aniž by způsobovaly viditelné příznaky. Imunitnímu systému se tyto přežívající bakterie vyhýbají pravděpodobně díky antigenní variaci povrchových proteinů. Genová konverze TprK proteinu umožňuje bakterii vyhnout se opsonizaci a následné fagocytóze. *tprK* gen má 7 variabilních regionů, které se n recipročně rekombinují s oblastí v blízkosti *tprD* genu. Tímto procesem se vytváří nové varianty TprK proteinu (Centurion-Lara *et al.*, 2004).

Po době až několika desetiletí, ale většinou po 3 až 15 letech, může dojít k reaktivaci infekce. Terciární forma může nabývat formy gummatózní, kardiovaskulární či pozdní neurosyphilis. Lidé v terciární fázi už nejsou považováni za infekční (Kent *et Romanelli*, 2008).

Gummatózní forma je takto označována podle granulomatózních zánětlivých ložisek různých velikostí naplněných žlutavou tekutinou připomínající arabskou gumu (Štork, 2013), které se nejčastěji objevují na kůži, ale i na játrech a kostech a mohou zasáhnout jakýkoliv orgán. Žlutavá tekutina po perforaci vyteče a vytvoří se otevřený vřed.

Pro kardiovaskulární formu je typické, že se treponemy usazují v aortě, kde vytváří zánětlivé ložisko. Zánět se může šířit do koronárních tepen a může dojít i k angině pectoris v důsledku nedostatečně okysličovaného srdce.

U neurosyphilis dochází k poškození CNS. Můžeme rozlišit dva hlavní druhy – *neurosyphilis meningovasculosa* (zánět mozkových obalů a cév) a *neurosyphilis parenchymatosa* související se sníženou imunitou. Dalším možným projevem neurosyphilis je i *tabes dorsalis*, který se projevuje šubavou a nejistou chůzí a nekoordinovanými pohyby. Kromě neurologických příznaků se objevují i psychopatologické rysy jako nesoustředěnost, poruchy paměti či v pozdějších stádiích maniodepresivita a halucinace.



### 3.4 Kongenitální syfilis

Syfilis se může také přenášet z matky na dítě skrze placentu. Důsledkem vrozené neboli kongenitální syfilis je pak často předčasný porod či potrat. V případě, že dojde k narození dítěte s kongenitální syfilis, projevuje se tato nemoc ve dvou formách (Štork, 2013). *Syphilis congenita tarda* se objevuje později, někdy až ve školním věku. Postiženy jsou především kosti a projevuje se Hutchinsovou trias (slepotu, hluchota, abnormality kostí). *Syphilis congenita recens (praecox)* se projevuje už u novorozenců příznaky sekundární syfilis.

### 3.5 Léčba

Standardní léčbou všech stádií syfilis je penicilin. Parenterálně podávaný penicilin G se užívá i k léčbě během těhotenství. Alternativní léčbu představují tetracykliny (kontraindikovány v těhotenství), erytromycin, azitromycin, chloramfenikol či cefriaxon, které jsou používány zejména u pacientů s alergií na penicilin. Problémem makrolidových antibiotik je rychle se rozšiřující rezistence způsobená bodovými mutacemi A2058G a A2059G v genu pro 23S rRNA (Stamm *et* Bergen, 2000; Matějková *et al.*, 2009), proto se již na léčbu syfilis nedoporučují.

## 4 Vakcinace

Vakcinace neboli očkování je lékařský zákrok, jehož cílem je navození imunity proti určité nemoci. Toho se dosahuje podáním očkovací látky – vakcíny, díky které bude imunitní systém vystaven patogenu způsobujícímu onemocnění, aniž by se rozvinula infekce. Očkování v moderním slova smyslu zavedl Edward Jenner, který v roce 1798 vyvinul vakcínu proti pravým neštovicím využívající viru kravských neštovic. Proto také vznikl pojem vakcinace, který vychází z latinského *vacca* (kráva). Imunizace se rozděluje na aktivní nebo pasivní. V současnosti existuje účinné očkování proti přibližně 25 nemocem, další vakcíny jsou stále vyvíjeny. Některá očkování jsou přitom povinná (Tab. 1; Domorázková, 1997; Beran *et* Havlík, 2008), jiná očkování jsou pouze doporučená a z toho některé jen při cestách do zahraničí s výskytem dané nemoci (Tab. 2).

Tabulka 1: Přehled současných povinných očkování v ČR (<sup>1</sup>Domorázková, 1997; <sup>2</sup>Beran *et* Havlík, 2008)

Nemoc	Původ	Typ vakcíny	Doba chrany*
Dávivý kašel	bakteriální	inaktivovaná	asi 5 let <sup>1</sup>
		acelulární	10 – 15 let <sup>2</sup>
Dětská přenosná obma	virový	atenuovaná/inaktivovaná	10 a více let <sup>1</sup>
<i>Haemophilus influenzae</i> typu B	bakteriální	konjugovaná	asi 5 let <sup>1</sup>
Hepatitida typu B	virový	pasivní imunizace	6 týdnů až 3 měsíce <sup>1</sup>
		rekombinantní	10 let (snad celoživotní) <sup>1</sup>
Příušnice	virový	atenuovaná	dlouhodobá <sup>1</sup>
Spalničky	virový	atenuovaná	dlouhodobá <sup>1</sup>
Tetanus	bakteriální	pasivní imunizace	6 týdnů až 3 měsíce <sup>1</sup>
		toxoidová	min. 10 let <sup>1</sup>
Zarděnky	virový	atenuovaná	dlouhodobá <sup>1</sup>
Záškrt	bakteriální	toxoidová	10 let <sup>1</sup>

\* Doba ochrany záleží na použité vakcíně (může se lišit i u jednotlivých značek vakcín)

Tabulka 2: Doporučená očkování (<sup>1</sup>Domorázková, 1997; <sup>2</sup>Beran *et* Havlík, 2008; <sup>3</sup>Beran *et al.*, 2005)

Nemoc	Původ	Typ vakcíny	Doba ochrany*
Anthrax (snět slezinná)	bakteriální	atenuovaná	6 měsíců <sup>3</sup>
Břišní tyfus	bakteriální	polysacharidová	3 roky <sup>1</sup>
Cholera	bakteriální	inaktivovaná	2 roky (děti 6 měsíců) <sup>2</sup>
Chřipka	virový	subjednotková	1 rok <sup>1</sup>
Hepatitida typu A	virový	pasivní imunizace	6 týdnů až 3 měsíce <sup>1</sup>
		inaktivovaná	minimálně 10 let/20 let (snad celoživotně) <sup>1</sup>
Japonská B encefalitida	virový	inaktivovaná	2 roky <sup>2</sup>
Klíšťová encefalitida	virový	pasivní imunizace	1 měsíc <sup>1</sup>
		inaktivovaná	3 roky (3 – 5 let) <sup>1</sup>
Mor	bakteriální	inaktivovaná	6 měsíců (poté 1 – 2 roky) <sup>3</sup>
Meningokoková meningitida	bakteriální	konjugovaná	asi 10 let <sup>3</sup>
		polysacharidová	3 roky <sup>1</sup>
Papilomaviry	virový	rekombinantní	doba ochrany není známa (10 – 15 let) <sup>2</sup>
Plané neštovice/pásový opar	virový	pasivní imunizace	1 – 3 měsíce <sup>1</sup>
		atenuovaná	dlouhodobá (asi 20 let) <sup>3</sup>
Pneumokoková pneumonie	bakteriální	polysacharidová	3 – 5 let <sup>1</sup>
		konjugovaná	5 let <sup>3</sup>
Rotavirové onemocnění	virový	atenuovaná	doba ochrany není známa <sup>2</sup>
Tuberkulóza	bakteriální	atenuovaná	v 11. až 12. roce tuberkulinový test <sup>1</sup>
Vzteklina	virový	inaktivovaná	2 – 5 let <sup>1</sup>
		pasivní imunizace	3 týdny až 3 měsíce <sup>1</sup>
Žlutá zimnice	virový	atenuovaná	10 let <sup>1</sup>

\* Doba ochrany záleží na použité vakcíně (může se lišit i u jednotlivých značek vakcín)

## 4.1 Pasivní imunizace

Při pasivní imunizaci se podávají hotové protilátky, proto vyvolává jen dočasný účinek. Tato imunizace slouží většinou k rychlému navození imunity.

Bylo prokázáno, že vakcinace celým imunním sérem poskytuje vyšší ochranu než imunizace vysoce čistými protilátkami IgG (Wicher *et al.*, 1992). Morčatům byly látky pro pasivní imunizaci podány před i po infekci TPA kmenem Nichols. Přestože ochrana byla po podání celého imunního séra vyšší (zvýšila se inkubační doba lézí a snížil se počet treponem), neposkytla kompletní ochranu a nezabránila ani rozšíření patogena do lymfatických uzlin. U IgG se předpokládá významná role v lokální protekci, což bylo pozorováno i na pokusných morčatech. Při intradermální injekci protilátek do stejné nohy, do které byla později vpravena infekce, poskytla injekce protilátek vyšší ochranu než při intravenózním podání. Pokud ovšem byly protilátky vpraveny do opačné nohy, neměla pasivní imunizace žádný efekt.

Částečná protekce je poskytována i monoklonální protilátkou M131 (Blanco *et al.*, 2005), u které bylo opět pozorováno významné posunutí doby vzniku lézí. Tato protilátka se váže na membránový lipid obsahující fosfocholin. K určení, zdali „odklad“ lézí koresponduje se snížením počtu spirochet, byla využita real-time PCR (Champion *et al.*, 2005). Při porovnání M131 a imunního králičího séra, došlo k většímu snížení počtu spirochet v inokulačních místech u M131. Pravděpodobně je to dáno větší treponemocidní aktivitou hned po inokulaci, což vede také k větší prodlevě před objevením lézí.

### 4.1.1 Pasivní imunizace pomocí T-lymfocytů

Kromě protilátkové imunity, kterou se převážně zabývám v této práci, existuje i imunita buněčná. Některé studie se zabývaly právě adaptivním přenosem imunity prostřednictvím buněk imunitního systému.

Příkladem může být studie, kdy byly k vytvoření imunity přeneseny T-lymfocyty purifikované z lymfatických uzlin a sleziny morčat inbredního kmene 2 a kmene C4D, u kterých byla prokázána imunita vůči tvorbě šankrů do syngenních morčat (Wicher *et al.*, 1987). Na rozdíl od kontrol se teprve po několika měsících po infikování *T. pallidum* objevila erytematózní reakce v místě vpichu, a to u dvou z jedenácti příjemců kmene 2 a jednoho z osmi příjemců kmene C4D. Pokud jde o přítomnost živých treponem, byla pozitivní reakce zaznamenána jen u jednoho z příjemců kmene C4D a jedna z reakcí u příjemců kmene 2. Bylo

též zjištěno, že pasivní imunita k infekci je dána počtem přenesených buněk, neboť při použití 10<sup>8</sup> imunních T-lymfocytů z kmene 2 zůstala asymptomatická infekce po dobu tří měsíců, zatímco u příjemců buněk z kmene C4D, kteří obdrželi dvojnásobnou dávku T-lymfocytů, tomu tak nebylo. Tkáně pěti vybraných asymptomatických jedinců byly také zkoumány na infekčnost injikováním do zad zdravých králíků. Tkáně při vyšetřování v temném poli nevykazovaly přítomnost treponem a žádná po aplikaci do králíka nezpůsobila vznik kožních lézí v místě inokulace, avšak sérologické vyšetření 10 týdnů po injekci ukázalo na infekčnost extraktu z kůže a tríselné uzliny z příjemců kmene 2.

## 4.2 Aktivní imunizace

U aktivní imunizace je imunitní systém v kontaktu s patogenem nebo jeho částmi obsaženými ve vakcíně a vytváří si proti nemoci vlastní protilátky. Navíc se vytváří paměťové buňky, které zajistí dlouhodobé trvání imunity.

Bylo by vhodné, aby vakcína proti syfilis zajišťovala plnou ochranu, tedy ochránila před vznikem příznaků i před přetrváváním bakterií v organismu. V první řadě by měla zabránit vývoji šankru u primárního stádia i lézí stádia sekundárního, což by dále bránilo přenosu nemoci. Kromě šíření mezi jedinci by měla inhibovat šíření treponem v rámci organismu. Za druhé je potřeba, aby vyvolávala Th1 odpověď a s tím spjatou tvorbu opsonizujících protilátek.

### 4.2.1 Typy vakcín

Vakcíny dělíme dle způsobu, jakým zabraňují propuknutí plné infekce (Tab. 3). Vakcíny obsahující celé buňky dělíme podle stavu patogena na atenuované (oslabené) a inaktivované vakcíny, přičemž v atenuovaných jsou patogeny živé, ale bez schopnosti způsobit onemocnění (toho se dosáhne například dlouhodobým pasážováním infekčních kultur, dokud neztratí svou infekčnost). Nevýhodou atenuovaných vakcín je, že patogeny v nich obsažené jsou stále živé, pořád se u nich vyskytuje jistá reziduální patogenita nebo mohou zmutovat a znovu nabýt virulence. Výhodou je, že stačí většinou jediná dávka k navození kvalitní a dlouhodobé odpovědi (Beran *et* Havlík, 2008). Oslabené vakcíny je snadnější vytvořit pro virová onemocnění než pro bakteriální.

Inaktivované vakcíny pak obsahují patogeny usmrcené se zachovanými antigeny, které rozpoznává imunitní systém. Někdy se označují jako celobuněčné vakcíny. Patogeny se mohou usmrcovat zářením, teplem či chemicky. Oproti atenuovaným jsou bezpečnější a stabilnější, avšak zajišťují slabší ochranu, proto je nutné aplikovat alespoň 3–4 dávky. Přestože jsou bezpečnější, mohou kvůli vysokému počtu přítomných antigenů vyvolat ve zvýšené míře nežádoucí účinky.

Dále existují očkovací látky, které místo celých patogenů obsahují jen jejich určité části nebo jejich produkty. Patří sem toxoidové, subjednotkové, konjugované a rekombinantní očkovací látky (Beran *et* Havlík, 2008).

Toxoidovou vakcínu tvoří bakteriální toxiny stimulující imunitní odpověď. Vytváří se v případech, kdy je hlavní příčinou nemoci toxin, který je pro potřeby vakcíny inaktivován (např. formaldehydem nebo teplem). Takový toxin se pak nazývá toxoid. Toxiny se získávají z filtrátů příslušných bakteriálních kultur. Mohou se používat jako nosiče v konjugovaných vakcínách (např. vakcína proti meningokokům). Většinou se pro navození protektivity aplikují tři dávky vakcíny.

Subjednotková vakcína obsahuje fragmenty separované z usmrcených patogenů, jež vyvolávají protektivní imunitní odpověď, čímž se snižuje počet nežádoucích účinků. Fragmenty se získávají štěpením původců onemocnění nebo rekombinantní technologií. V základním schématu se musí většinou aplikovat ve třech dávkách.

Konjugovaná vakcína se skládá z vlastního polysacharidového antigenu a proteinového nosiče. Proteinový nosič je potřeba kvůli jeho rozpoznání imunitním systémem, protože samotný polysacharid nezralý imunitní systém nerozpozná a neumí na něj reagovat.

Rekombinantní vakcína je podobná subjednotkové. Podjednotky se připravují metodami molekulární biologie, kdy se vloží příslušný gen kódující antigen s imunoprotektivní vlastností do produkčního mikroorganismu. Po jeho vyprodukování je třeba jej ze systému purifikovat. Aplikují se většinou tři dávky.

Tabulka 3: Typy vakcín (Beran *et* Havlík, 2008; upraveno)

Antigen	Typ vakcíny	Příklad onemocnění
polysacharid	polysacharidová	pneumokoková, meningokoková onemocnění
extracelulárně se vyskytující protein	inaktivovaná	hepatitida A, klíšťová meningoencefalitida
	toxoidová	teten, záškrť
	subjednotková	chřipka
	rekombinantní	hepatitida B
intracelulárně se vyskytující protein/komplex	atenuovaná	TBC, spalničky, zarděnky, příušnice

Kromě výše zmíněných a již běžně používaných typů vakcín jsou vyvíjeny další, které by ty stávající mohly nahradit. Mezi tyto vakcíny budoucnosti se řadí DNA vakcíny, rostlinné vakcíny (tzv. jedlé), syntetické, vakcíny z dendritických buněk, z nádorových buněk a na bázi živých rekombinantních virů a bakterií (Beran *et al.*, 2005).

DNA vakcína má donutit buňky očkováného jedince k produkci fragmentů patogenu. Taková vakcína nese geny patogena pro všechny důležité antigeny. Tyto antigeny poté začnou být produkovány buňkami vlastního organismu, který si tím vlastně stvoří vlastní vakcínu. Tyto proteiny mají přirozenou konformaci a způsobují silnou stimulaci buněčné i protilátkové imunity. Výhodami této vakcíny jsou nenákladná příprava, která je v podstatě stejná pro všechny nemoci, a její stabilita. Na druhou stranu má i svá rizika. Může dojít k aktivaci protoonkogenu či inaktivaci antionkogenu, k vyvolání autoimunitních onemocnění a k navození stavu tolerance. Další nevýhodou je pomalý nástup imunity. Tzv. nahá DNA vakcína (bez přidaných adjuvancií) byla testována u lidí např. proti chřipce nebo herpes viru.

K očkovací látce je možné přidávat i pomocné látky, tzv. adjuvancia, která mají navýšit imunitní odpověď. Příkladem takového adjuvans, který indukoval Th1 odpověď a vznik funkčních protilátek, je Ribi adjuvans. Toto adjuvans obsahuje monofosforyl lipid A, trehalózu dicorynomykolát a skelet buněčné stěny. Používalo se v kombinaci s rekombinantními proteiny (Cameron *et al.*, 1998; Centurion-Lara *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 2002a; Sun *et al.*, 2004) a indukoval značnou ochranu proti infekci. Od jeho aplikace se však ustoupilo. Adjuvancia používaná u DNA vakcín jsou různé cytokiny, které jsou koexprimovány stejným vektorem jako antigen.

## **5 Vakcína proti syfilis – kandidáti na vakcínu**

Jako zvířecí model jak pro studium *T. pallidum*, tak pro vývoj vakcín se nejčastěji používají králíci. Jen u několika savců může dojít k infekci a rozvinutí klinických symptomů. U králíků po infikování TPA (která je příbuzná druhu napadajícího králíky) vznikají primární a sekundární léze a latentní infekce může přetrvávat po celý život, podobně jako u lidí. Používaly se však i další zvířecí modely jako křečci (Schell *et al.*, 1982), morčata (Pavia *et al.*, 1985; Wicher *et al.*, 1991), nebo myši, u kterých se ovšem nevyskytují typické primární léze (Blanco *et al.*, 1999).

V tabulce č. 4 je přehled všech kandidátů zmiňovaných v této práci (vč. protilátek použitých při pasivní imunizaci).

Tabulka 4: Přehled kandidátů při vývoji vakcíny

Látka použitá pro vakcinaci	Vliv na léze	Přítomnost bakterií v lézích	Literatura
Imunní sérum	delší inkubační doba	nižší počet	Wicher <i>et al.</i> , 1992
Protilátka M131	delší inkubační doba	nižší počet	Blanco <i>et al.</i> , 2005
VDLR antigen (neproteinová látka)	menší počet menší velikost, delší inkubační doba	neuváděno	Baker-Zander <i>et al.</i> , 1993
T-lymfocyty	reakce pouze u tří z 19 jedinců	živé treponemy nalezeny jen ve dvou případech	Wicher <i>et al.</i> , 1987
<b>Celé buňky</b>			
$\gamma$ -ozářené <i>T. pallidum</i>	bez lézí	žádné treponemy	Miller, 1973
Bakterie kultivované při 4°C	částečná ochrana (závislá na době kultivace a teplotě)		Metzger <i>et al.</i> , 1969
Suspenze usmrcených treponem ošetřených antiforminem	inhibice vzniku primárních vředů	žádné treponemy	Tani <i>et al.</i> , 1951
<b>Proteiny</b>			
TP0155	červené, vyvýšené a ztvrdlé léze (shodné s kontrolou)	přetrvání motilních treponem	Tomson <i>et al.</i> , 2007
TP0483	červené, vyvýšené a ztvrdlé léze (shodné s kontrolou)	přetrvání motilních treponem	Tomson <i>et al.</i> , 2007
TP0956	žádné reakce až lehce zesílená tvorba	přítomnost živých bakterií	Tomson <i>et al.</i> , 2007
Tp92 (TP0326)*	snížení vážnosti dermálních lézí	snížení počtu lézí s živými bakteriemi	Cameron <i>et al.</i> , 2000; Zhao <i>et al.</i> , 2011
	zesílená tvorba lézí	přetrvání motilních treponem	Tomson <i>et al.</i> , 2007
TP0155 + TP0483 + TP0956 + TP0326	červené, vyvýšené a ztvrdlé léze	přetrvání motilních treponem	Tomson <i>et al.</i> , 2007
TprK (TP0897)	oslabení lézí	nízký počet lézí s obsahem živých treponem	Morgan <i>et al.</i> , 2002
Gdp (TP0257)	atypické léze	léze neobsahovaly živé treponemy	Cameron <i>et al.</i> , 1998; Zhao <i>et al.</i> , 2013/2013b
4D (TP1031)	atypické léze, doba nástupu v závislosti na imunizační cestě	redukce počtu treponem	Borenstein <i>et al.</i> , 1988
TmpB (TP0769)	atypické léze, kratší trvání	nepřítomnost/minimální množství živých organismů	Wicher <i>et al.</i> , 1991
Tromp proteiny (TP0163, TP0663)	vyšší treponemocidní aktivita než při užití imunního séra		Blanco <i>et al.</i> , 1999
Endoflagelum (směs flagelárních proteinů)	dřívější objevení lézí	léze bez motilních treponem	Champion <i>et al.</i> , 1990
15 kDa lipoprotein (TP0171)	žádná změna charakteru lézí ani doby jejich vzniku	žádná změna obsahu živých bakterií	Centurion-Lara <i>et al.</i> , 1997

\* všechny zmíněné studie používali TPA kmen Nichols

## 5.1 Použití celých buněk

Vakcíny obsahující celé buňky (usmrčené či oslabené) by byly kvůli nemožnosti kultivace treponem dosti nákladné a jejich průmyslová produkce je nevhodná. Nicméně jediný případ očkování, který vyústil v dlouhotrvající imunitu (kompletní clearance organismů), využil právě celobuněčnou vakcínu.

V daném experimentu s inaktivovanou vakcínou byli králíci očkováni po dobu 37 týdnů dávkou přibližně  $10^9$   $\gamma$ -ozářených bakterií TPA kmene Nichols (Miller, 1973). Poté byli králíci infikováni stejným kmenem, a to jedna skupina po uplynutí 10 dnů a druhá po uplynutí jednoho roku. U žádného se neobjevily léze a jejich tkáně nebyly infekční. Jiné usmrcení bakterií než zmíněným  $\gamma$ -zářením (ať už chemické, či mechanické) zničilo povrchové antigeny (Eagle *et Fleischman*, 1948; Izzat *et al.*, 1970), v důsledku čehož další inaktivované vakcíny nebyly úspěšné v navozování imunity.

V jiné studii, která však byla méně úspěšná než Millerova, byli králíci očkováni intravenózně bakteriemi kultivovanými různou dobu při 4°C (Metzger *et al.*, 1969). Imunizace trvala 7 týdnů a každý jedinec dostal dávku asi 8 miliard bakterií. Imunita byla prokázána u 41 % infikovaných králíků. Zahřátí organismů nebo jejich dlouhodobé skladování nepříznivě ovlivnilo účinky vakcíny.

Suspenze usmrcených treponem ošetřených antiforminem také vykazala při vyšší koncentraci bakterií jistou imunoprotektivitu (Tani *et al.*, 1951). Králíci dostali celkovou dávku 3,6 až 8,4 miliard organismů, což vedlo k 7 – 18krát vyšší inhibici vzniku primárních vředů. Imunita přetrvala po dobu dvou měsíců a účinnost byla stejná jak při použití homologního, tak heterologního kmene (při zachování stejného dávkování a infikování). Zcela asymptomatickým králíků byly odebrány podkolenní lymfatické žlázy, které byly zavedeny zdravým králíků. U těchto králíků se nevyvinuly žádné vředy, což ukazuje na skutečné potlačení nemoci u imunizovaných králíků a nikoli jen na pouhé potlačení symptomů.

## 5.2 Proteiny vnější membrány (OMP)

Proteiny vnější membrány jsou kromě role ve virulenci i hlavním cílem hostitelovy protektivní imunity (Lee *et al.*, 2000). Identifikace jednotlivých proteinů a jejich přesná lokalizace je však problematická, zvláště kvůli křehkosti vnější membrány a odlišnosti



buněčné architektury od jiných gramnegativních bakterií (Cullen *et al.*, 2006). Přesto se podařilo identifikovat 20 slibných antigenů použitelných pro vývoj vakcíny.

### 5.2.1 Proteiny aktivní při vazbě na eukaryotické buňky

Jedním z potenciálních cílů by mohly být proteiny aktivní při vazbě na hostitelské buňky, které se váží na složky extracelulární matrix. Patří sem TP0136 (Brinkman *et al.*, 2008), TP0155, TP0483 (Cameron *et al.*, 2004) a TP0751 (Houston *et al.*, 2011). Vakcína by tedy bránila navázání bakterií na buňky. S tím by souviselo omezení přenosu a rozvinutí nemoci. Příkladem patogenu, u kterého bylo použito antisérum k proteinům vážícím se k fibronektinu (tedy obdobě TP0483 a TP0155), je *Staphylococcus aureus* (Mamo *et al.*, 1994).

TP0155 a TP0483 byly použity k imunizaci králíků jak samostatně, tak v multivalentní vakcíně obsahující 4 proteiny, a to TP0155, TP0483, TP0956 a TP0326 (Tomson *et al.*, 2007). U všech imunizovaných králíků se vyvinuly červené, vyvýšené a ztvrdlé léze ve všech inokulačních místech. Mikroskopie v temném poli prokázala přítomnost motilních spirochet. Protein TP0956, tedy jedna ze složek testované multivalentní vakcíny, byl predikován a později i identifikován jako povrchový protein a antigen. Predikce se zakládala na korelaci mezi imunitou vůči vzniku šankru (tzv. chancre immunity) v infikovaných králících objevující se mezi 60. až 120. dnem a protilátkovou odpovědí na TP0956, která se 30x zvyšuje mezi 56. až 84. dnem, jak ukázaly některé studie (McKevitt *et al.*, 2005). Imunoprotekce nebyla prokázána při samostatné aplikaci tohoto antigenu ani v kombinaci s dalšími proteiny (Tomson *et al.*, 2007), dokonce místy došlo ke zvětšení lézí.

### 5.2.2 Tpr genová rodina

Na povrchu jsou lokalizováni i někteří členové rodiny Tpr proteinů. Členové této genové rodiny vyvolávají odpověď imunitního systému a odpovídají pravděpodobně i za perzistenci nemoci v organismu. Tpr proteiny podléhají antigenní variaci, kvůli čemuž je třeba se zaměřit na invariantní oblasti těchto proteinů, aby měla vakcína žádaný účinek pro více než jednu variantu (Centurion-Lara *et al.*, 1999).

Tpr rodina se dělí na 3 podrodiny na základě jejich sekvěnní podobnosti. Povrchové proteiny se nacházejí v každé z těchto podrodin. Jedná se o TprC, D, F, I (podrodina I), TprE, J (podrodina II) a z podrodiny III TprB (Cox *et al.*, 2010). Pokud jde o protein TprK, patří

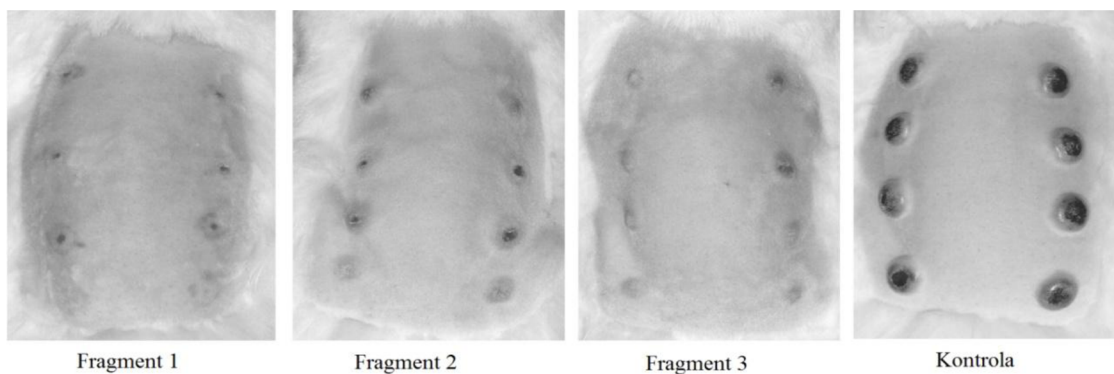
spolu s TprB do podrodiny III, existují studie podporující jeho umístění na povrchu (Centurion-Lara *et al.*, 1999; Giacani *et al.*, 2010), ale i studie, které s jeho povrchovou lokalizací nesouhlasí (Hazlett *et al.*, 2001).

I přes pochybnosti o proteinu TprK, zůstává jako nejčastěji používaný imunogen (Centurion-Lara *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 2002a), který oslabuje vznik syfilitických lézí. Tento protein obsahuje 7 diskretních variabilních regionů, které se navíc liší mezi jednotlivými izoláty (Centurion-Lara *et al.*, 2000).

V proteinu TprK byly navíc identifikovány 3 imunogenní fragmenty (Morgan *et al.*, 2002a), kteréžto byly intradermálně inokulovány do zad králíků. V porovnání s kontrolou všechny fragmenty vykazovaly snížení počtu živých treponem a menší, méně často hnisající vředy, rychleji se hojící (Obr. 2). Nejlépe si vedl fragment 1 (hydrofilní N-konec, aminokyseliny 37 až 273), jehož epitopy jsou v průběhu infekce rozpoznávány T-lymfocyty a protilátkami. T-lymfocyty rozeznávají na TprK vysoce konzervované regiony (Morgan *et al.*, 2002b), zatímco protilátky jsou mířeny proti variabilním regionům.

Nepředpokládá se, že by samotný TprK zajistil plnou protekci, ale v kombinaci s jinými antigeny by mohl být užitečný.

Obrázek 2: Vzhled inokulačních míst po aplikaci jednotlivých fragmentů proteinu TprK (Morgan *et al.*, 2002a; upraveno)



### 5.2.3 Tp92 (TP0326)

Za jednoho z nejlepších kandidátů pro vakcínu je považován protein Tp92 (TP0326), díky jeho vysoké homologii mezi druhy, relativně silné imunogenitě a protektivní kapacitě. Jedná se o 92 kDa velký antigen (Cameron *et al.*, 2000). Gen pro něj je vysoce konzervativní a sekvenční homologie mezi jednotlivými kmeny je 95,5–100 %. V současnosti již bylo

úspěšně užito antisérum k jeho homologům Oma87 (87 kDa) u *Pasteurella multocida* (Ruffolo *et al.*, 1996) a D15 (80 kDa) u *H. influenzae* (Yang *et al.*, 1998).

Ačkoliv některé předchozí studie ukazovaly na jeho imunogenní potenciál a dokazovaly, že protilátky proti Tp92 jsou opsonizující a usnadňují fagocytózu, jiné studie ke stejným závěrům nedospěly (Cameron *et al.*, 2000; Tomson *et al.*, 2007). Zatímco v první studii došlo ke snížení závažnosti dermálních lézí (Cameron *et al.*, 2000), v pozdější studii imunizace rekombinantním proteinem Tp92, ať už samostatně, nebo v kombinaci s dalšími rekombinantními proteiny (TP0956, TP0155, TP0483), nevykazovala žádnou změnu v povaze lézí. Při použití samotných TP0956 a Tp92 byla tvorba lézí dokonce zesílena (Tomson *et al.*, 2007).

Tp92 byl také použit k vytvoření DNA vakcíny, u které fungoval cytokin IL-12 jako adjuvans a plazmid nesoucí tyto složky byl obalen nanočásticemi chitosanu (Zhao *et al.*, 2011). Kombinace adjuvans s chitosanem jako vektoru zvýšila buněčnou imunitní odpověď a snížila množství dávek vakcíny. Celkem proběhly tři imunizace, jedna každé dva týdny. Intramuskulární injekce indukovala silnou humorální i buněčnou odpověď. IL-12 indukoval vyšší hladinu protilátek a chitosan (přírodní polysacharid odvozený od deacetylovaného chitinu) zajistil, aby vakcína účinkovala za kratší dobu.

#### **5.2.4 Glycerolfosfodiester fosfodiesteráza (TP0257)**

Glycerolfosfodiester fosfodiesteráza (Gpd) je asi 41 kDa velký lipoprotein (Stebeck *et al.*, 1997). Aminokyselinová sekvence Gpd je vysoce konzervovaná mezi zkoumanými 12 patogenními treponemálními kmeny (Cameron *et al.*, 1999), což by mohlo přispět k vyvinutí univerzální vakcíny. Nesyfilitické kmeny však obsahují jednu tichou mutaci (substituci v pozici 579). Homology Gpd, též vysoce konzervované a lipoproteinové povahy, byly identifikovány i u dalších bakterií jako *H. influenzae* (Munson *et al.*, 1993) či *Borrelia hermsii* (Shang *et al.*, 1997). Jedná se o další potenciální imunoprotektivní antigen.

Imunizace rekombinantním enzymem (inkluzními tělísky purifikovanými z *E. coli*) vyústila v nekompletní ochranu, neboť zůstaly přítomny živé bakterie, avšak vývoj atypických lézí naznačuje alespoň částečnou ochranu (Cameron *et al.*, 1998). V místě intradermální infekce se objevily malé, světlé, ploché, mírně tvrdé, nehnisající reakce. Tyto reakce vymizely dříve, než se objevily typické léze u kontrolních králíků.

V jiné studii využili DNA vakcínu pro Gpd s IL-2 jako adjuvans a chitosanem jako vektorem (Zhao *et al.*, 2013a), což vedlo k navýšení protekce (kožní léze obsahující

treponemy byly pozorovány jen v 8,33 % a hnisající léze jen ve 4,17 %). Léze byly malé, nejméně tvrdé (ve srovnání s kontrolou a použitím pouze jednoho z adjuvans nebo vektoru) a nejrychleji se léčily. Erytém se objevil ve všech místech vpichu v rozmezí dvou až tří dnů. U kontrol to trvalo průměrně 6 až 9 dní.

Jako možný adjuvans pro DNA vakcínu s Gpd byl zkoumán také slizniční adjuvans CpG ODN (syntetický nemetylovaný CpG oligodeoxynukleotid) (Zhao *et al.*, 2013b). Pro efektivní ochranu je totiž potřeba silná systémová i slizniční imunitní odpověď, ale většina vakcín se zaměřuje pouze na tu systémovou. Slizniční imunitní systém je schopen produkovat antigen-specifické sIgA i ve vzdálených sliznicích, proto by nebylo třeba imunizovat přímo genitální sliznici, skrze kterou nejčastěji probíhá infekce.

Ukázalo se, že CpG ODN výrazně zvyšuje hladiny sérum-specifické IgG protilátky indukované DNA vakcínou spolu se sekrečními hladinami cytokinů IFN- $\gamma$  a IL-2 (Zhao *et al.*, 2013b). Primárně byli králíci imunizováni intramuskulárně pomocí Gpd s IL-2, poté byla nasálně podána směs Gpd-IL-2 + CpG ODN. Intranasální imunizace snížila dobu hojení a průměr lézí oproti kontrolám. Redukce počtu pozitivních (obsahujících živé bakterie) a ulcerujících lézí byla do jisté míry nezávislá na přítomnosti CpG ODN a projevila se u všech imunizovaných skupin. Ovšem u skupiny imunizované výše uvedeným způsobem byla tato redukce nejvyšší.

### 5.2.5 4D (TP1031)

4D antigen je 190 kDa velký, proteáza-rezistentní antigen s povrchovou lokalizací (Radolf *et al.*, 1986). Vyvolává vznik komplement-dependentních *T. pallidum* imobilizujících protilátek (Fehniger *et al.*, 1984). Jeho využití při imunizaci dokázalo navodit částečnou ochranu proti infekci *T. pallidum* (Borenstein *et al.*, 1988; Fehniger *et al.*, 1984).

Kromě účinnosti samotného antigenu byla zkoumána i účinnost imunizačních cest (Borenstein *et al.*, 1988). Jak se ukázalo, po pouhé intramuskulární imunizaci byly léze, pokud jde o jejich morfologii, srovnatelné s kontrolou. Na druhou stranu byl ale vývoj lézí oproti kontrole urychlený. Při kombinaci intramuskulární a intravenózní cesty se léze objevily ve stejnou dobu jako u kontroly, avšak s atypickou morfologií. Atypické léze byly malé, ploché, difúzní a měkké. Čistě intravenózní imunizace vedla k rychlejšímu nástupu atypických lézí, které se postupně vyvinuly v léze typické. Vzorky z atypických lézí, vyšetřované v temném poli, neobsahovaly živé bakterie u žádné z imunizačních cest.

### 5.2.6 Tmp proteiny (*T. pallidum* membrain protein)

Na morčatech kmene C4D byla testována imunizace prostřednictvím TmpA (TP0768), TmpB (TP0769) a TmpC (TP0319) a imunizace jejich kombinací. Současně byl také použit adjuvans Ribi pro vylepšení účinků vakcíny. Přes vysoké titry antitreponemálních protilátek, které byly zaznamenány u všech látek, prokázal imunizační účinky pouze TmpB antigen (Wicher *et al.*, 1991). Ochranný účinek se prokázal buď rozvojem významně menších, atypických lézí, anebo výrazně kratším trváním lézí a nepřítomností či přítomností pouze minimálního množství živých organismů.

### 5.2.7 Tromp proteiny (*T. pallidum* rare outer protein)

Proteiny skupiny Tromp představují základní cíle protektivní humorální imunity a jsou potenciálními nosiči virulence. Tromp1 (TP0163) je 31 kDa velký protein s porinovou aktivitou (Blanco *et al.*, 1995); antisérum proti rekombinantnímu Tromp1 není opsonizující (Akins *et al.*, 1997). Tromp2 (TP0663) je 28 kDa velký povrchový protein (Champion *et al.*, 1997). Jak Tromp1, tak Tromp2 (TP0663) mají antigenní charakter, ale jsou slabými imunogeny v porovnání s lipoproteiny (Blanco *et al.*, 1999).

Purifikované vnější membrány obohacené o Tromp proteiny byly využity k imunizaci myši za účelem umělého generování vysokého titru komplement-dependentních treponemocidních protilátek (Blanco *et al.*, 1999). Kvůli velmi omezenému množství purifikované vnější membrány (nanogramy), dostaly myši dvě navyšující injekce do sleziny. Myší sérum poté při testech poskytovalo ve své schopnosti zničit 100 % treponemální suspenze 32x vyšší komplement-dependentní treponomicidní aktivitu než imunní králíčí sérum.

### 5.2.8 15 kDa lipoprotein (TP0171)

15 kDa lipoprotein je hlavním imunogenem během infekce syfilis. Bylo dokázáno, že kódující sekvence je vysoce konzervovaná u všech kmenů a poddruhů *T. pallidum* i dalších druhů treponem (Centurion-Lara *et al.*, 1997) a protein má roli v protektivní imunitě.

Jeho role v ochraně proti homologní infekci byla zkoumána na králících, kteří byli očkováni purifikovaným rekombinantním 15 kDa fúzním proteinem. Poté byli intradermálně infikováni  $10^3$  bakterií do 4 nebo 8 míst na zádech. Při porovnání s kontrolou se vzniknuvší léze nelišily svým charakterem ani dobou vzniku (žádné zpoždění či urychlení vzniku).

Ani sérum v podmínkách *in vitro* nevykazovalo podporu fagocytózy. Tato fakta spolu s vysokou konzervovaností genu ukazují, že TP0171 v protekci nehraje důležitou roli. Zároveň však jeho sekvenční konzervovanost ukazuje na jinou významnou funkci.

### 5.3 Endoflagelum

Ve studii Blanco *et al.* (1988) prokázali, že proteiny endoflagelárních filament mají na svém povrchu specifické epitopy. Králíci imunizovaní 32 týdnů celkovou dávkou 450 µg purifikovaného endoflagela vykazovali vyšší hladinu antiendoflagelárních protilátek než pacienti, popř. králíci se sekundární syfilis (Champion *et al.*, 1990). Po intradermální injekci se u nich sice léze objevily, ale u poloviny lézí se tak stalo o 6 až 8 dnů dříve oproti kontrole, navíc léze obsahovaly jen velmi malé množství živých bakterií. Urychlený vznik lézí, který byl pozorován i u imunizace pomocí 4D antigenu (Borenstein *et al.*, 1988), by mohl ukazovat na specifickou buněčnou imunitní odpověď. Atypická povaha lézí zároveň reprezentuje protilátkovou imunitu. Díky kombinovanému efektu buněčné a protilátkové imunity by se tyto epitopy daly využít jako sekundární cíl v případě kombinované vakcíny.

Purifikovaný bičík byl využit i při pokusu navození zkřížené imunity (Hinderson *et al.*, 1985). K očkování se použilo 50 µg bičíku z druhu *Treponema phagedenis* biotypu Reiter. Nicméně po intradermální inokulaci *T. pallidum* nebyl prokázán významný rozdíl v době vzniku nebo závažnosti lézí oproti kontrole.

### 5.4 Nепroteinoví kandidáti

*T. pallidum* na svém povrchu neobsahuje lipopolysacharidy ani lipooligosacharidy, takže jejich použití pro vakcínu je vyloučeno (Cullen *et al.*, 2006). Možností zůstává využití glykosylovaných částí proteinů, které však tlumí antigenicitu epitopů (Garrity *et al.*, 1997).

Na povrchu najdeme kromě několika málo proteinů i membránové lipidy, proti kterým vznikají antilipoidální protilátky. Jedna taková popsána a testovaná monoklonální protilátka (M131) se vážala k fosforylcholinovému epitopu (Blanco *et al.*, 2005).

Byla zkoumána i imunizace pomocí VDRL antigenu (Baker-Zander *et al.*, 1993). VDRL antigen obsahuje komplex lecitinu, kardiolipinu a cholesterolu. Oponizující VDRL protilátky se používají v netreponemálních testech na syfilis. Výsledkem byl snížený počet inokulačních lézí, jejich pozdější objevení, menší průměr a snížený počet hnisajících lézí.

## 6 Závěr

Tato práce shrnuje potenciální kandidáty na vývoj vakcíny proti onemocnění syfilis. Vzhledem k neustále probíhajícímu výzkumu na tomto poli jsou stále identifikovány další potenciální proteiny, které mohou být pro své antigenní či imunogenní vlastnosti využity pro sestavení vakcíny (několik příkladů těchto proteinů uvádím v tabulce č. 5).

Tabulka 5: Nově identifikované proteiny s antigenními vlastnostmi (McKevitt *et al.*, 2005; upraveno)

Další identifikované antigeny	Předpokládaná funkce
TP0993	vzácný lipoprotein A
TP0486	antigen, p83/100
TP0821	lipoprotein
TP0509	alkyl hydroperoxid-reduktáza
TP0567	hypotetický konzervovaný protein
TP0327	kationtový protein vnější membrány
TP0368	hypotetický protein
TP0122	fosfoenolpyruvát karboxykináza
TP0622	hypotetický protein

Pro vytvoření vakcíny se mohou použít celé bakterie, proteiny či neproteinové látky. Před masovou produkcí vakcíny obsahující celé buňky, tj. inaktivované nebo atenuované vakcíny, je potřeba vypořádat se s několika významnými problémy. Velmi limitujícím faktorem je nemožnost kultivace treponem v podmínkách *in vitro*. Bakterie jsou ve svém přežití závislé na hostiteli a ve tkáňových kulturách příliš dlouho nepřežijí. Výhodou, pro budoucí klinické testy, resp. pro případ, že by testovaná látka selhala, je relativně snadná léčba nemoci. Na rozdíl od vysokého počtu dávek nutných k navození imunity pomocí usmrcených bakterií, u živé atenuované vakcíny by ke stimulaci imunitního systému stačila dávka jediná. Musel by se ale najít způsob genetického „vypnutí“ faktorů zodpovědných za virulenci a způsob transportu křehkých živých bakterií (Cullen *et al.*, 2006). Alternativou by mohlo být užití příbuzných nepatogenních organismů k navození zkřížené imunity. Celkově se však živé vakcíny nehodí pro imunokompromitované pacienty, tedy i jednu z hlavních cílových skupin pro očkování proti syfilis.

Vakcína by měla zajišťovat plnou protekci, protože částečná ochrana, již bylo dosaženo při většině pokusů, by mohla vést k nerozpoznání infekce a rozvinutí jejích pozdějších fází. Pro zabránění šíření onemocnění je potřeba zabránit vzniku šankru a sekundárních lézí,

přes něž dochází k další nákaze. Účinná vakcína by měla také zabránit diseminaci v organismu a odstranit všechny jednotlivé bakterie *T. pallidum*.

Přestože jsou intenzivně zkoumány DNA vakcíny, jsem přesvědčená, že rekombinantní vakcíny jsou mnohem slibnější. Nicméně při produkci rekombinantních proteinů je důležité, aby byly získány ve svém nativním stavu, a nikoliv například v inkluzních tělískách (pokud se jedná o membránové proteiny), neboť v takovém případě by mohly ztratit nezbytně důležité vlastnosti. Spojení s vhodným adjuvans pro posílení účinku je také velmi významným krokem. Za velice perspektivní kandidáty považuji především proteiny TprK a Gdp, i když samostatně nedokázaly zajistit kompletní ochranu, při společném použití k imunizaci by možná mohly být úspěšnější.

Pokud jde o hlavní cílovou populaci pro očkování, liší se v závislosti na tom, zda se jedná o rozvojovou nebo více industrializovanou zemi. Zatímco v rozvojovém světě dominuje jako cílová skupina heterosexuální populace, v rozvinutých státech se jedná především o MSM skupinu (homosexuální muže) a sexuální pracovníky a pracovnice.



## 7 Literatura

- 1) **Akins D., Robinson E., Shevchenko D., Radolf J., Elkins C., Cox D.** 1997. Tromp1, a putative rare outer membrane protein, is anchored by an uncleaved signal sequence to the *Treponema pallidum* cytoplasmic membrane. *J Bacteriol.* 179 (16): 5076-5086.
- 2) **Babolin C., De Bernard M., Amedei A., D'Elis M., Ozoliņš D., Žileviča A.** 2011. TpF1 from *Treponema pallidum* activates inflammasome and promotes the development of regulatory T cells. *J Immunol.* 187 (3): 1377-1384.
- 3) **Baker-Zander S., Hook E., Bonin P., Handsfield H., Lukehart S.** 1985. Antigens of *Treponema pallidum* Recognized by IgG and IgM Antibodies during Syphilis in Humans. *J Infect Dis.* 2: 264.
- 4) **Baker-Zander S. A., Shaffer J. M., Lukehart S. A.** 1993. VDRL Antibodies Enhance Phagocytosis of *Treponema pallidum* by Macrophages. *J Infect Dis.* 167 (5): 1100-1105.
- 5) **Beran J., Havlík J.** 2008. Lexikon očkování. Praha. Maxdorf.
- 6) **Beran J., Havlík J., Vonka V.** 2005. Očkování: minulost, přítomnost, budoucnost. Praha. Galén.
- 7) **Blanco D., Champion C., Dooley A., Cox D., Whitelegge J., Faull K., Lovett M.** 2005. A monoclonal antibody that conveys in vitro killing and partial protection in experimental syphilis binds a phosphorylcholine surface epitope of *Treponema pallidum*. *Infect Immun.* 73 (5): 3083-3095.
- 8) **Blanco D., Champion C., Exner M., Erdjument-Bromage H., Hancock R., Tempst P., Miller J., Lovett M.** 1995. Porin activity and sequence analysis of a 31-kilodalton *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* rare outer membrane protein (Tromp1). *J Bacteriol.* 177 (12): 3556-3562.
- 9) **Blanco D., Champion C., Miller J., Lovett M.** 1988. Antigenic and structural characterization of *Treponema pallidum* (Nichols strain) endoflagella. *Infect Immun.* 56 (1): 168-175.
- 10) **Blanco D., Champion C., Shang E., Miller J., Lovett M., Lewinski M., Simkins S.** 1999. Immunization with *Treponema pallidum* outer membrane vesicles induces high-titer complement-dependent treponemicidal activity and aggregation of *T. pallidum* rare outer membrane proteins (TROMPs). *J Immunol.* 163 (5): 2741-2746.

- 11) **Borenstein L., Radolf J., Fehniger T., Blanco D., Miller J., Lovett M.** 1988. Immunization of rabbits with recombinant *Treponema pallidum* surface antigen 4D alters the course of experimental syphilis. *J Immunol.* 140 (7): 2415-2421.
- 12) **Bos J., Hamerlinck F., Cormane R.** 1980. T lymphoid cells in primary syphilis. Quantitative studies. *Brit J Vener Dis.* 56 (2): 74-76.
- 13) **Brightbill H., Libraty D., Krutzik S., Yang R., Belisle J., Bleharski J., Maitland M., Norgard M., Plevy S., Smale S., Brennan P., Bloom B., Godowski P., Modlin R.** 1999. Host Defense Mechanisms Triggered by Microbial Lipoproteins Through Toll-Like Receptors. *Science.* 5428: 732.
- 14) **Brinkman M., McGill M., Pettersson J., Rogers A., Matejková P., Smajs D., Weinstock G., Norris S., Palzkill T.** 2008. A novel *Treponema pallidum* antigen, TP0136, is an outer membrane protein that binds human fibronectin. *Infect Immun.* 76 (5): 1848-1857.
- 15) **Cameron C., Brown E., Kuroiwa J., Schnapp L., Brouwer N.** 2004. *Treponema pallidum* Fibronectin-Binding Proteins. *J Bacteriol.* 186 (20): 7019-7022.
- 16) **Cameron C., Castro C., Lukehart S., Van Voorhis W.** 1998. Function and protective capacity of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* Glycerophosphodiester phosphodiesterase. *Infect Immun.* 66 (12): 5763-5770.
- 17) **Cameron C., Castro C., Lukehart S., Van Voorhis W.** 1999. Sequence conservation of glycerophosphodiester phosphodiesterase among *Treponema pallidum* strains. *Infect Immun.* 67 (6): 3168-3170.
- 18) **Cameron C., Lukehart S., Castro C., Molini B., Godornes C., Van Voorhis W.** 2000. Opsonic Potential, Protective Capacity, and Sequence Conservation of the *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* Tp92. *J Infect Dis.* 4: 1401.
- 19) **Centurion-Lara A., Arroll T., Castillo R., Shaffer J., Castro C., Van Voorhis W., Lukehart S.** 1997. Conservation of the 15-kilodalton lipoprotein among *Treponema pallidum* subspecies and strains and other pathogenic treponemes: Genetic and antigenic analyses. *Infect Immun.* 65 (4): 1440-1444.
- 20) **Centurion-Lara A., Castro C., Barrett L., Cameron C., Mostowfi M., Van Voorhis W., Lukehart S.** 1999. *Treponema pallidum* major sheath protein homologue Tpr K is a target of opsonic antibody and the protective immune response. *J Exp Med.* 189 (4): 647-656.

- 21) **Centurion-Lara A., Godornes C., Castro C., Van Voorhis W., Lukehart S.** 2000. The *tprK* gene is heterogeneous among *Treponema pallidum* strains and has multiple alleles. *Infect Immun.* 68 (2): 824-831.
- 22) **Centurion-Lara A., LaFond R., Hevner K., Godornes C., Molini B., Van Voorhis W., Lukehart S.** 2004. Gene conversion: a mechanism for generation of heterogeneity in the *tprK* gene of *Treponema pallidum* during infection. *Mol Microbiol.* 52 (6): 1579-1596.
- 23) **Champion C., Blanco D., Lovett M.** 2005. Quantitative assessment of protection in experimental syphilis. *Infect Immun.* 73 (9): 5923-5927.
- 24) **Champion C., Blanco D., Miller J., Lovett M., Exner M., Hancock R., Erdjument-Bromage H., Tempst P.** 1997. Sequence analysis and recombinant expression of a 28-kilodalton *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* rare outer membrane protein (Tromp2). *J Bacteriol.* 179 (4): 1230-1238.
- 25) **Champion C., Miller J., Borenstein L., Lovett M., Blanco D.** 1990. Immunization with *Treponema pallidum* endoflagella alters the course of experimental rabbit syphilis. *Infect Immun.* 58 (9): 3158-3161.
- 26) **Chung K., Kim K., Lee M., Chang N., Lee J.** 2002. *Treponema pallidum* Induces Up-regulation of Interstitial Collagenase in Human Dermal Fibroblasts. *Acta Derm-Venereol.* 82 (3): 174-178.
- 27) **Cox D., Luthra A., Dunham-Ems S., Desrosiers D., Caimano M., Radolf J., Salazar J.** 2010. Surface immunolabeling and consensus computational framework to identify candidate rare outer membrane proteins of *Treponema pallidum*. *Infect Immun.* 78 (12): 5178-5194.
- 28) **Cullen P., Cameron C.** 2006. Progress towards an effective syphilis vaccine: the past, present and future. *Expert Rev Vaccines.* 5 (1): 67-80.
- 29) **Čejková D., Zobaníková M., Lei C., Pospíšilová P., Strouhal M., Xiang Q., Mikalová L., Norris S. J., Muzny D. M., Gibbs R. A., Fulton L. L., Sodergren E., Weinstock G. M., Šmajš D.** 2012. Whole Genome Sequences of Three *Treponema pallidum* ssp. *pertenue* Strains: Yaws and Syphilis Treponemes Differ in Less than 0.2% of the Genome Sequence. *PLoS Negl Trop Dis.* 6 (1): e1471. [online]. [cit. 9. dubna 2016]. DOI:10.1371/journal.pntd.0001471.
- 30) **Domorázková E.** 1997. Očkování v praxi praktického lékaře. Praha. Grada.
- 31) **Eagle H., Fleischman R.** 1948. The antibody response in rabbits to killed suspensions of pathogenic *T. pallidum*. *J Exp Med.* 87 (5): 369-384.

- 32) **Fehniger T., Walfield A., Cunningham T., Radolf J., Miller J., Lovett M.** 1984. Purification and characterization of a cloned protease-resistant *Treponema pallidum*-specific antigen. *Infect Immun.* 46 (2): 598-607.
- 33) **Fraser C., Norris S., Weinstock G., White O., Sutton G., Dodson R., Gwinn M., Hickey E., Clayton R., Ketchum K., Sodergren E., Hardham J., McLeod M., Salzberg S., Peterson J., Khalak H., Richardson D., Howell J., Chidambaram M., Utterback T., McDonald L., Artiach P., Bowman C., Cotton M., Fujii C., Garland S., Hatch B., Horst K., Roberts K., Sandusky M., Weidman J., Smith H., Venter J.** 1998. Complete Genome Sequence of *Treponema pallidum*, the Syphilis Spirochete. *Science.* 5375: 375.
- 34) **Garrity R., Minassian A., Lin G., Nara P., Tsai W., Rimmelzwaan G., De Jong J., Goudsmit J.** 1997. Refocusing Neutralizing Antibody Response by Targeted Dampening of an Immunodominant Epitope. *J Immunol.* 159 (1): 279-289.
- 35) **Giacani L., Molini B., Kim E., Godornes B., Leader B., Tantaló L., Centurion-Lara A., Lukehart S.** 2010. Antigenic Variation in *Treponema pallidum*: TprK Sequence Diversity Accumulates in Response to Immune Pressure during Experimental Syphilis. *J Immunol.* 184 (7): 3822-3829.
- 36) **Graves S., Downes J.** 1981. Experimental infection of man with rabbit-virulent *Treponema paraluis-cuniculi*. *Brit J Vener Dis.* 57 (1): 7.
- 37) **Hanff P., Fehniger T., Miller J., Lovett M.** 1982. Humoral immune response in human syphilis to polypeptides of *Treponema pallidum*. *J Immunol.* 129 (3): 1287-1291.
- 38) **Harper K., Ocampo P., Steiner B., George R., Pillay A., Silverman M., Bolotin S., Saunders N., Armelagos G.** 2008. On the origin of the treponematoses: A phylogenetic approach. *PLoS Negl Trop Dis.* 2 (1): e148 [online]. [cit. 19. března 2016]. DOI:10.1371/journal.pntd.0000148.
- 39) **Hazlett K. R. O., Sellati T. J., Nguyen T. T., Cox D. L., Clawson M. L., Caimano M. J., Radolf J. D.** 2001. The Tprk Protein of *Treponema pallidum* Is Periplasmic and Is Not a Target of Opsonic Antibody or Protective Immunity. *J Exp Med.* 193 (9): 1015–1026.
- 40) **Hindersson P., Petersen C., Axelsen N.** 1985. Purified flagella from *Treponema phagedenis* biotype Reiter does not induce protective immunity against experimental syphilis in rabbits. *Sex Transm Dis.* 12 (3): 124-127.

- 41) **Houston S., Hof R., Francescutti T., Hawkes A., Boulanger M., Cameron C.** 2011. Bifunctional Role of the *Treponema pallidum* Extracellular Matrix Binding Adhesin Tp0751. *Infect Immun.* 79 (3): 1386-1398.
- 42) **Izzat N., Dacres W., Knox J., Wende R.** 1970. Attempts at immunization against syphilis with avirulent *Treponemella pallidum*. *Brit J Vener Dis.* 46 (6): 451-453.
- 43) **Juanpere-Rodero N., Martin-Ezquerria G., Fernandez-Casado A., Magan-Perea L., Garcia-Alguacil M., Barranco-Sanz C., Serrano-Figueras S., Pujol-Vallverdu R., Lloreta-Trull J.** 2013. Cell and tissue interactions of *Treponema pallidum* in primary and secondary syphilitic skin lesions: an ultrastructural study of serial sections. *Ultrastruct Pathol.* 37 (1): 36-42.
- 44) **Kent M., Romanelli F.** 2008. Reexamining syphilis: An update on epidemiology, clinical manifestations, and management. *Ann Pharmacother.* 42 (2): 226-236.
- 45) **Leader B., Godornes C., VanVoorhis W., Lukehart S.** 2007. CD4+ lymphocytes and gamma interferon predominate in local immune responses in early experimental syphilis. *Infect Immun.* 75 (6): 3021-3026.
- 46) **Leader B., Hevner K., Molini B., Barrett L., Van Voorhis W., Lukehart S.** 2003. Antibody responses elicited against the *Treponema pallidum* repeat proteins differ during infection with different isolates of *Treponema pallidum* subsp *pallidum*. *Infect Immun.* 71 (10): 6054-6057.
- 47) **Lee K., Choi H., Lee M., Lee J.** 2000. 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.* 41 (5): 623-633.
- 48) **Magnuson H., Thomas E., Olansky S., Kaplan B., De Mello L., Cutler J.** 1956. Inoculation syphilis in human volunteers. *Medicine.* 35 (1): 33-82.
- 49) **Mamo W., Jonsson P., Flock J., Lindberg M., Müller H., Wadström T., Nelson L.** 1994. Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis: immunological response of mice vaccinated with fibronectin-binding protein (FnBP-A) to challenge with *S. aureus*. *Vaccine.* 12 (11): 988-992.
- 50) **Matějková P., Šmajš D., Flasarová M., Woznicová V., Zákoucká H., Bořek M., Křemenová S., Arenberger P., Weinstock G.** 2009. Macrolide treatment failure in a case of secondary syphilis: A novel A2059G mutation in the 23S rRNA gene of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*. *J Med Microbiol.* 58 (6): 832-836.

- 51) **McKevitt M., Brinkman M., McLoughlin M., Perez C., Howell J., Weinstock G., Norris S., Palzkill T.** 2005. Genome scale identification of *Treponema pallidum* antigens. *Infect Immun.* 73 (7): 4445-4450.
- 52) **Metzger M., Michalska E., Podwińska J., Smogór W.** 1969. Immunogenic properties of the protein component of *Treponema pallidum*. *Brit J Vener Dis.* 45 (4): 299-304.
- 53) **Miller J.** 1973. Immunity in experimental syphilis. VI. Successful vaccination of rabbits with *Treponema pallidum*, Nichols strain, attenuated by gamma irradiation. *J Immunol.* 110 (5): 1206-1215.
- 54) **Mitjà O., Houinei W., Moses P., Kapa A., Paru R., Hays R., Lukehart S., Godornes C., Bieb S. V., Grice T., Siba P., Mabey D., Sanz S., Alonso P. L., Asiedu K., Bassat Q.** 2015. Mass Treatment with Single-Dose Azithromycin for Yaws. *New Engl J Med.* 372 (8): 703-710.
- 55) **Morgan C., Lukehart S., Van Voorhis W.** 2002a. Immunization with the N-terminal portion of *Treponema pallidum* repeat protein K attenuates syphilitic lesion development in the rabbit model. *Infect Immun.* 70 (12): 6811-6816.
- 56) **Morgan C. A., Molini B. J., Lukehart S. A., Van Voorhis W. C.** 2002b. Segregation of B and T Cell Epitopes of *Treponema pallidum* Repeat Protein K to Variable and Conserved Regions During Experimental Syphilis Infection. *J Immunol.* 169 (2): 952-957.
- 57) **Munson R., Sasaki, K.** 1993. Protein D, a putative immunoglobulin D-binding protein produced by *Haemophilus influenzae*, is glycerophosphodiester phosphodiesterase. *J Bacteriol.* 175 (14): 4569-4571.
- 58) **Nechvátal L., Pětrošová H., Grillová L., Pospíšilová P., Mikalová L., Strnadel R., Kuklová I., Kojanová M., Kreidlová M., Vaňousová D., Procházka P., Zákoucká H., Krchňáková A., Šmajš D.** 2014. Syphilis-causing strains belong to separate SS14-like or Nichols-like groups as defined by multilocus analysis of 19 *Treponema pallidum* strains. *Int J Med Microbiol.* 304: 645-653.
- 59) **Pavia C., Niederbuhl C., Saunders J.** 1985. Antibody-mediated protection of guinea-pigs against infection with *Treponema pallidum*. *Immunology.* 56 (2): 195-202.
- 60) **Perine P. L., Hopkins D. R., John R. K. St., Niemel P. L. A., Causse G., Antal G. M.** 1984. Handbook of endemic treponematoses : yaws, endemic syphilis, and pinta. Geneva. World Health Organization.

- 61) **Pillay A., Liu H., Chen C., Holloway B., Sturm A., Steiner B., Morse S.** 1998. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. Sex Transm Dis. 25 (8): 408-414.
- 62) **Radolf J., Fehniger T., Silverblatt F., Miller J., Lovett M.** 1986. The surface of virulent *Treponema pallidum*: Resistance to antibody binding in the absence of complement and surface association of recombinant antigen 4D. Infect Immun. 52 (2): 579-585.
- 63) **Riley B., Norgard M., Oppenheimer-Marks N., Hansen E., Radolf J.** 1992. Virulent *Treponema pallidum* activates human vascular endothelial cells. J Infect Dis. 165 (3): 484-493.
- 64) **Ruffolo C., Adler B.** 1996. Cloning, sequencing, expression, and protective capacity of the *oma87* gene encoding the *Pasteurella multocida* 87-kilodalton outer membrane antigen. Infect Immun. 64 (8): 3161-3167.
- 65) **Schell R., Azadegan A., Nitskansky S., LeFrock J.** 1982. Acquired resistance of hamsters to challenge with homologous and heterologous virulent treponemes. Infect Immun. 37 (2): 617-621.
- 66) **Shang E., Skare J., Blanco D., Miller J., Lovett M., Erdjument-Bromage H., Tempst P.** 1997. Sequence analysis and characterization of a 40-kilodalton *Borrelia hermsii* glycerophosphodiester phosphodiesterase homolog. J Bacteriol. 179 (7): 2238-2246.
- 67) **Shin J., Chung K., Kang J., Lee T., Lee M.** 2004. The effects of *Treponema pallidum* on human dendritic cells. Yonsei Med J. 45 (3): 515-522.
- 68) **Smith J. L., David N. J., Indgin S., Israel C. W., Levine B. M., Justice J. Jr., McCrary J. A. 3rd, Medina R., Paez P., Santana E., Sarkar M., Schatz N. J., Spitzer M. L., Spitzer W. O., Walter E. K.** 1971. Neuro-ophthalmological study of late yaws and pinta. II. The Caracas project. Br J Vener Dis. 47 (4): 226-251.
- 69) **Stamm L., Bergen H.** 2000. A point mutation associated with bacterial macrolide resistance is present in both 23S rRNA genes of an erythromycin-resistant *Treponema pallidum* clinical isolate. Antimicrob Agents Ch. 44 (3): 806-807.
- 70) **Stary G., Klein I., Brüggem M., Kohlhofer S., Brunner P., Spazierer D., Müllauer L., Petzelbauer P., Stingl G.** 2010. Regular Articles: Host Defense Mechanisms in Secondary Syphilitic Lesions. A Role for IFN- $\gamma$ -/IL-17-Producing CD8+ T Cells?. Am J Pathol. 177: 2421-2432.

- 71) **Stebeck C., Shaffer J., Arroll T., Lukehart S., Van Voorhis W.** 1997. Identification of the *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* glycerophosphodiester phosphodiesterase homologue. FEMS Microbiol Lett. 154 (2): 303-310.
- 72) **Stover C. K., Pham X. Q., Erwin A. L., Mizoguchi S. D., Warren P., Hickey M. J., Brinkman F. S., Hufnagle W. O., Kowalik D. J., Lagrou M., Garber R. L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody L. L., Coulter S. N., Folger K. R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G. K., Wu Z., Paulsen I. T., Reizer J., Saier M. H., Hancock R. E., Lory S., Olson M. V.** 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature. 406 (6799): 959-964.
- 73) **Sun E., Molini B., Barrett L., Centurion-Lara A., Lukehart S., Van Voorhis W.** 2004. Subfamily I *Treponema pallidum* repeat protein family: sequence variation and immunity. Microbes Infect. 6 (8): 725-737.
- 74) **Šmajš D., Norris S., Weinstock G.** 2012. Review: Genetic diversity in *Treponema pallidum*: Implications for pathogenesis, evolution and molecular diagnostics of syphilis and yaws. Infect Genet Evol. 12: 191-20.
- 75) **Šmajš D., Zbaníková M., Strouhal M., Čejková D., Dugan-Rocha S., Pospíšilová P., Norris S., Albert T., Qin X., Hallsworth-Pepin K., Buhay C., Muzny D., Chen L., Gibbs R., Weinstock G.** 2011. Complete genome sequence of *Treponema paraluis-cuniculi*, strain Cuniculi A: the loss of infectivity to humans is associated with genome decay. PLoS One. 6 (5): e20415. [online]. [cit. 20. března 2016]. DOI: 10.1371/journal.pone.0020415.
- 76) **Štork J.** 2013. Pohlavně přenosné infekce a nemoci genitálu. In: Štork J., Arenberger P., Pizinger K., Semrádová V., Vosmík F. 2013. Dermatovenerologie (druhé vydání). Praha. Galén. 429-456.
- 77) **Tani T., Inoue R., Asano O.** 1951. Studies on the preventive inoculation against syphilis. Jpn J Med. 4 (2): 71-86.
- 78) **Thomas D., Navab M., Haake D., Fogelman A., Miller J., Lovett M.** 1988. *Treponema pallidum* Invades Intercellular Junctions of Endothelial Cell Monolayers. P Natl Acad Sci USA. 10: 3608.
- 79) **Tomson F., Conley P., Norgard M., Hagman K.** 2007. Assessment of cell-surface exposure and vaccinogenic potentials of *Treponema pallidum* candidate outer membrane proteins. Microbes Infect. 9: 1267-1275.



- 80) **Turner T. B.** 1936. The resistance of yaws and syphilis patients to reinoculation with yaws spirochetes. *Am J Epidemiol* 23 (3): 431-448.
- 81) **Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR.** 2012. Pohlavní nemoci 2012. Praha. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR.
- 82) **Weinstock G. M., Hardham J. M., McLeod M. P., Sodergren E. J., Norris S. J.** 1998. The genome of *Treponema pallidum*: new light on the agent of syphilis. *FEMS Microbiol Rev.* 22 (4): 323-332.
- 83) **Wicher K., Zabek J., Wicher V.** 1992. Effect of passive immunization with purified specific or cross-reacting immunoglobulin G antibodies against *Treponema pallidum* on the course of infection in guinea pigs. *Infect Immun.* 60 (8): 3217-3223.
- 84) **Wicher K., Schouls L., Wicher V., Van Embden J., Nakeeb S.** 1991. Immunization of guinea pigs with recombinant TmpB antigen induces protection against challenge infection with *Treponema pallidum* Nichols. *Infect Immun.* 59 (12): 4343-4348.
- 85) **Wicher V., Wicher K., Jakubowski A., Nakeeb S.** 1987. Adoptive transfer of immunity to *Treponema pallidum* Nichols infection in inbred strain 2 and C4D guinea pigs. *Infect Immun.* 55 (10): 2502-2508.
- 86) **World Health Organization.** 2012a. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections – 2008. Ženeva. WHO press.
- 87) **World Health Organization.** 2012b. Summary report of a consultation on eradication of yaws. Ženeva. WHO Press.
- 88) **Yang Y., Chong P., Loosmore S., Klein M., Thomas W.** 1998. A 20-kilodalton N-terminal fragment of the D15 protein contains a protective epitope(s) against *Haemophilus influenzae* type a and type b. *Infect Immun.* 66 (7): 3349-3354.
- 89) **Zhao F., Wu Y., Zhang X., Yu J., Gu W., Liu S., Zeng T., Zhang Y., Wang S.** 2011. Enhanced immune response and protective efficacy of a *Treponema pallidum* Tp92 DNA vaccine vectored by chitosan nanoparticles and adjuvanted with IL-2. *Hum Vaccines.* 7 (10): 1083-1089.
- 90) **Zhao F., Zhang X., Liu S., Zeng T., Yu J., Gu W., Zhang Y., Chen X., Wu Y.** 2013a. Assessment of the immune responses to *Treponema pallidum* Gpd DNA vaccine adjuvanted with IL-2 and chitosan nanoparticles before and after *Treponema pallidum* challenge in rabbits. *Sci China Life Sci.* 56 (2): 174-180.
- 91) **Zhao F., Liu S., Zhang X., Yu J., Zeng T., Gu W., Cao X., Chen X., Wu Y.** 2013b. CpG adjuvant enhances the mucosal immunogenicity and efficacy of a *Treponema pallidum* DNA vaccine in rabbits. *Hum Vaccin Immunother.* 9 (4): 753-760.

- 92) **Zobaníková M., Strouhal M., Mikalová L., Čejková D., Ambrožová L., Pospíšilová P., Fulton L. L., Chen L., Sodergren E., Weinstock G. M., Šmajš D.** 2013. Whole genome sequence of the *Treponema* Fribourg-Blanc: unspecified simian isolate is highly similar to the yaws subspecies. PLoS Negl Trop Dis. 7 (4): e2172. [online]. [cit. 9. dubna 2016]. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002172.