

Agnieszka Beata Serwin, Bożena Chodynicka

DIAGNOSTYKA BEZPOŚREDNIA KIŁY – WSPÓŁCZESNE STANDARDY I KIERUNKI BADAŃ

Klinika Dermatologii i Wenerologii Akademii Medycznej w Białymstoku
Kierownik: Bożena Chodynicka

W pracy przedstawiono współczesne metody identyfikacji krętka bladego oraz najnowsze kierunki ich rozwoju. Poddano dyskusji próby hodowli krętka bladego na sztucznym podłożu, różne metody amplifikacji jego materiału genetycznego i ich praktyczne zastosowanie.

Słowa kluczowe: kiła, krętek blady, diagnostyka bezpośrednia
Key words: syphilis, Treponema pallidum, direct diagnosis

WSTĘP

Minęło sto lat od zidentyfikowania krętka bladego (*Treponema pallium subspecies pallidum* – *T. pallidum*) jako czynnika etiologicznego kiły (1). Metody diagnostyki laboratoryjnej kiły zaczęły rozwijać się bardzo dynamicznie wkrótce po tym odkryciu. Podstawą rozpoznania choroby, poza danymi ze starannie zebranego wywiadu, ewentualnymi odchyleniami w badaniu przedmiotowym są wyniki badań laboratoryjnych. Na ich dobór wpływa w znacznym stopniu fakt występowania w kile okresów objawowych i bezobjawowych. Jak w każdej chorobie zakaźnej, diagnostyka laboratoryjna powinna dążyć do wykrycia czynnika etiologicznego. Krętek blady jest drobnoustrojem, który sprawia szereg problemów, między innymi jest bardzo wrażliwy na czynniki środowiska zewnętrznego, a największym jest trudność hodowli na sztucznym podłożu. Dlatego w praktyce, poza przypadkami kiły wczesnej objawowej, diagnostyka laboratoryjna tego schorzenia opiera się głównie na wynikach różnych odczynów serologicznych.

Celem pracy jest przedstawienie współczesnych metod bezpośredniej diagnostyki kiły ze szczególnym uwzględnieniem wyników najnowszych badań, zmierzających do udoskonalenia sposobów identyfikacji krętka bladego i prób ich praktycznego zastosowania.

WSPÓŁCZEŚNIE STOSOWANE METODY DIAGNOSTYKI BEZPOŚREDNIEJ

Metodą, która jest najczęściej wykorzystywana w bezpośredniej diagnostyce kiły jest identyfikacja żywych drobnoustrojów na podstawie obserwacji ich morfologii i ruchu

w ciemnym polu widzenia mikroskopu świetlnego (cpw) (2). Materiałem badanym jest wydzielina z sączących zmian kiły pierwszego lub drugiego okresu. Czułość tej metody wynosi około 70-80% (próg czułości - około 10^5 bakterii/ml) i nawet trzykrotnie ujemny wynik nie rozstrzyga o wykluczeniu kiły. Ponadto ze względu na obecność krętków saprofitycznych nie nadaje się do diagnostyki zmian zlokalizowanych w jamie ustnej i okolicy odbytu. Pomimo tych ograniczeń próbę wykrycia krętka bladego metodą cpw należy zawsze wykonać u chorych z podejrzeniem nabytej kiły wczesnej objawowej, kiły płodu i wrodzonej wczesnej.

W laboratoriach, dysponujących odpowiednim sprzętem oraz przeszkolonym personelem, krętek blady można zidentyfikować za pomocą mono- lub poliwalentnych przeciwciał znakowanych izotiocjanianem fluoresceiny (*direct immunofluorescence assay* – DFA). Czułość i swoistość tej metody jest nieco wyższa niż cpw, a jej zasadnicza przewaga polega na możliwości wykrycia drobnoustroju nie tylko w wysięku, ale również w świeżym lub utrwalonym preparacie tkankowym (2).

Inne, szybkie metody bezpośredniej identyfikacji krętka bladego, np. z wykorzystaniem techniki immunoenzymatycznej, nie przewyższają swoistością oraz czułością cpw ani DFA (3).

Próba biologiczna, czyli test zakaźności dla królika (*rabbit infectivity test* – RIT), pozostaje testem referencyjnym, zapewniającym najwyższą czułość i swoistość (zakażenie zwierzęcia 10 krętkami stymuluje powstanie przeciwciał przeciwkrętkowych), ale ze względu na wysoki koszt i skomplikowaną procedurę w polskich ośrodkach nie jest wykonywany dla celów diagnostycznych (2, 3).

HODOWLA KRĘTKA BLADEGO

Krętek blady jest jednym z niewielu drobnoustrojów, którego przez wiele lat nie udało się wyhodować na sztucznym podłożu. Utrzymywanie wirulentnych drobnoustrojów dla celów diagnostycznych wymaga, nawet obecnie, jego pasażowania na zwierzętach doświadczalnych. Dopiero 76 lat po odkryciu krętka bladego po raz pierwszy opracowano podłoże, znane jako *system hodowlany Fieldsteela*, które umożliwiło 100-krotny wzrost bakterii *in vitro*. Jego głównymi składnikami są komórki nabłonka królika (linia komórkowa Sf1Ep), 20% płodowa surowica bydłęca i 0,63 mM ditioneitol. Hodowla przebiega w warunkach ubogotlenowych i temperaturze 33-34°C. W dotychczasowych obserwacjach liczba krętków rosła w sposób wykładniczy do 10-15 dnia, a następnie malała. Podwojenie liczby bakterii uzyskano po 30-50 godzinach. Tak opracowane podłoże odtworzyły inne grupy badawcze i wykorzystywano je do oceny wrażliwości krętków na antybiotyki (4, 5, 6, 7). Dalsze badania wykazały, że w trakcie hodowli ulega zmianie pH, potencjał redoksy, stężenie rozpuszczalnego tlenu, glukozy oraz liczba komórek nabłonka. Udało się również przenieść żywe krętki blade z trzydniowej hodowli na kolejne podłoże, nie tracąc ich właściwości wzrostu ani ruchu. Dłuższy odstęp (6 dni) powodował, że w kolejnej hodowli krętki rosły wolniej, ale zachowywały właściwości ruchu (7). Stabilizacja warunków hodowlanych oraz krótsze przerwy pomiędzy pasażami powinny zapewnić utrzymanie żywotności bakterii w warunkach hodowli *in vitro*. Pomimo obiecujących wyników wstępnych badań, po dziesięciu latach brak jest prac na temat praktycznego zastosowania systemu Fieldsteela do rutynowej diagnostyki kiły.

METODY AMPLIFIKACJI MATERIAŁU GENETYCZNEGO KRĘTKA

Poszukiwanie nowych metod bezpośredniej diagnostyki kiły było stymulowane kilkoma czynnikami. Po pierwsze – niepowodzeniami, a w konsekwencji brakiem możliwości rutynowej hodowli krętka błędnego na sztucznym podłożu dla celów diagnostycznych, nawet w szczególnych, klinicznie trudnych sytuacjach. Po drugie faktem, że dostępne obecnie inne metody diagnostyki bezpośredniej mają wady, które ograniczają ich zastosowanie we wszystkich okresach zakażenia, cechują się ponadto niską czułością (cpw), skomplikowaną procedurą laboratoryjną (DFA, RIT), lub na rozstrzygający wynik trzeba czekać kilka tygodni (RIT). Po trzecie, metody diagnostyki serologicznej, będące obecnie podstawą rozpoznania kiły, nie są w stanie w pełni zastąpić diagnostyki bezpośredniej, a ponadto brakuje wśród nich odczynu zapewniającego jednocześnie wysoką czułość i swoistość, powtarzalność i jednoznaczny wynik po zakończeniu leczenia. Interpretacja wyników odczynów serologicznych może być szczególnie trudna w kile układu nerwowego, kile wrodzonej i przy współistniejącym zakażeniu HIV.

Nowe możliwości diagnostyki bezpośredniej schorzeń zakaźnych otworzyło opracowanie w 1988 r. metody amplifikacji DNA za pomocą termostabilnej polimerazy, dzięki czemu można było powielić sekwencję genetyczną ponad 10^6 razy (8). Metody amplifikacji genetycznej zastosowano wkrótce do diagnostyki zakażeń wywołanych przez różne drobnoustroje, a na początku lat 90. opracowano pierwsze polimerazowe reakcje łańcuchowe (PCR), w których amplifikowano fragmenty genów kodujących białka błonowe krętka błędnego o masie cząsteczkowej 47 kD (*tpp47*) oraz *tmpA* (9, 10). Próg czułości tych metod wynosił od 1 do 10 krętków w badanym materiale (0,01 pg oczyszczonego DNA). Umożliwiały wykrycie materiału genetycznego bakterii w surowicy, płynie mózgowo-rdzeniowym, płynie owodniowym, a także utrwalonym preparacie histologicznym, ale wypadły ujemnie w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z porażeniem postępującym. Przy pomocy tych metod nie udało się odróżnić zakażenia *T. pallidum subspecies pallidum* od zakażenia *T. pallidum subspecies pertenue*. Podjęto próbę rozróżnienia tych podgatunków krętka błędnego na podstawie różnic w budowie nukleotydów homologicznych genów *tpf-1* (*T. pallidum subspecies pallidum*) i *tyf-1* (*T. pallidum subspecies pertenue*). Pomimo, że w większości szczepów krętka zawierającego *tpf-1* w pozycji 123 znajdowała się adenina a *tyf-1* guanina nie umożliwiło to z całkowitą pewnością odróżnienia czynnika etiologicznego kiły od frambezji (11).

Kolejne opracowywane metody amplifikujące materiał genetyczny *T. pallidum subspecies pallidum* nie przewyższały czułością próby biologicznej i służyły do wykrywania genów obecnych w komórce bakterii w pojedynczych kopiach: Tp39, a najczęściej TpN47 (12, 13, 14). W 1997 r. przedstawiono metodę amplifikacji fragmentu genu 16S rRNA (zawierającego 366 par zasad), o którym wiadomo, że obecny jest w komórkach innych bakterii w ponad 1000 kopii, modyfikując jednocześnie metodę amplifikacji (*reverse transcriptase* – RT-PCR) (15). Próg czułości tej metody był 100-1000 razy niższy niż metod istniejących, również po zastosowaniu do badania płynu mózgowo-rdzeniowego. Umożliwiała ona wykrycie materiału genetycznego krętka w obecności inhibitorów PCR, które mogą być we krwi, tkankach oraz płynie mózgowo-rdzeniowym. Autorzy podkreślali możliwość zastosowania tego odczynu do odróżnienia infekcji czynnej od infekcji przebytej i leczonej, ponieważ RNA, jest degradowane znacznie szybciej niż DNA. Pomimo bardzo wysokiej swoistości, za pomocą tej metody nie udało się odróżnić podgatunków krętka błędnego.

W drugiej połowie lat 90. zaczęto wprowadzać metody, które pozwalały na jednoczesne wykrycie w wydzielinie ze zmian skórnych lub śluzówkowych materiału genetycznego drobnoustrojów odpowiedzialnych za najczęstsze owrzodzenia narządów płciowych: *T. pallidum*, *Haemophilus (H.) ducreyi* oraz HSV-1 i HSV-2 (multiplex-PCR – M-PCR) (16). W teście tym amplifikacji podlega fragment genu *T. pallidum* (240 par zasad) kodującego białko 47-kD, glikoproteina B HSV i 16S rRNA *H. ducreyi*. Do potwierdzenia były stosowano metodę PCR (amplifikacją genu kodującego białko TpN39) oraz hodowle (HSV i *H. ducreyi*). Czulość tej metody w wykrywaniu zakażenia krętkiem bladym wynosiła 91%, a swoistość 99%, przewyższając parametry metody cpw, a zgodność z wynikami odczynu VDRL (lub RRP) – 88% (16). W 2005 r. przedstawiono modyfikację tego testu poszerzoną o możliwość wykrycia materiału genetycznego *Chlamydia trachomatis* (gen *omp1/ompb*), umożliwiając jednoczesne wykrycie ziarnicy wenerycznej pachwin (17).

Najnowszą modyfikacją PCR w diagnostyce były jest amplifikacja polimerazy DNA I (polA) (18). Cechą wyróżniającą ten gen w komórkach *T. pallidum subspecies* jest niezmienna struktura, kodowanie białka o dużej zawartości cysteiny w stosunku do polimerazy DNA innych drobnoustrojów (około 20-krotnie) oraz występujące cztery insercje. Wysoka czulość i swoistość testu (porównywalne z próbą biologiczną), uproszczona metodyka oraz dane dotyczące jego zastosowania we krwi, płynie mózgowo-rdzeniowym i owodniowym, zdaniem autorów pozwalają na użycie tego testu do rutynowej diagnostyki (18).

W ciągu ostatnich 15 lat opracowano różne metody amplifikacji materiału genetycznego krętka bladego, wykorzystujące różne primery, będące częścią genów o nie zawsze dobrze poznanej funkcji (tab. 1). Swoistość tych metod nie jest absolutna, część materiału

Tabela 1. Porównanie testów amplifikacji materiału genetycznego krętka

Table 1. Comparison of *Treponema pallidum* nucleic acid amplification methods

Lp.	Wykrywany materiał genetyczny	Czułość (próg czułości)	Swoistość	Badany materiał	Przegląd literatury, rok
1.	TmpA i 4D (<i>tpf-1</i>)	65 bakterii w 0,5 ml	100%	p m-r	(10), 1998
2.	47-kDa (658 par zasad)	100% - p a, 60% - p m-r, 67% - s (1-10 bakterii w 50 µl)	100% (zgodna z RIT)	p a, p m-r, s, p h	(9), 1991
3.	39-kDa (<i>dsmp</i>)	150 bakterii w 1 ml	100%	p m-r	(14), 1991
4.	47-kDa (658 par zasad)	10 bakterii (1 - po zastosowaniu blottingu)	100% (95,5% zgodnych wyników z ISEA)	w	(13), 1995
5.	16S rRNA	1 bakteria (10^2 - 10^6 równoważników rRNA)	100%	p m-r, k, w	(15), 1997
6.	47-kDa (194 par zasad)	30 bakterii	100%	b w c	(13), 2002
7.	Polimeraza DNA I (<i>polA</i>)	95,8% (testetycznie 2 bakterie w teście lub 300 w 1 ml)	95,7%	w	(18), 2001

p m-r – płyn mózgowo-rdzeniowy, p o – płyn owodniowy, s – surowica, b w c – biopłat węzła chłonno-
nego, k – krew pełna, w – wysięk z dna owrzodzeń, p h – preparat histologiczny

genetycznego stosowanego w amplifikacji ma homologi w innych bakteriach, żadna z nich nie pozwala na odróżnienie podgatunków krętka bladego ani krętków patogennych od saprofitycznych. Ich czułość różni się w zależności od badanego materiału i w tkankach zawierających znikomą ilość krętków bladych, np. płynie mózgowo-rdzeniowym, może być niższa niż RIT. Większość tych metod wymaga dodatkowej fazy wzmocnienia sygnału (np. hybrydyzacji DNA, blottingu). Należy także zwrócić uwagę na fakt, że ocenę nowo opracowywanych metod amplifikacji genomu krętka bladego (także ich czułości i swoistości) przeprowadzano, porównując ich wyniki z wynikami różnych innych metod: RIT, DFA, M-PCR, odczynów serologicznych (12, 13, 14, 17), lub wcale nie przedstawiając metod porównawczych (9, 10). Problemy diagnostyczne mogą także wynikać ze zmienności genetycznej krętka bladego (19).

Badań oceniających przydatność metod amplifikacji materiału genetycznego krętka do oceny skuteczności leczenia jest niewiele (14, 20, 21). O ile test zakaźności królika umożliwi stwierdzenie wyłącznie żywych i wirulentnych bakterii, o tyle przy pomocy PCR można wykryć materiał genetyczny zarówno krętków żywych, jak i martwych. Część autorów stwierdziła, że w surowicy oraz płynie mózgowo-rdzeniowym niemowląt leczonych z powodu wrodzonej kiły układu nerwowego zarówno wyniki RIT, jak i PCR, dodatnie przed leczeniem, wypadały ujemnie 2 do 7 miesięcy po zakończeniu kuracji (14). Natomiast inni badacze wykazali, że u 5 spośród 7 chorych z kiłą objawową układu nerwowego po adekwatnym leczeniu wciąż wykrywa się DNA krętka (gen *bmp*, kodujący białko o masie cząsteczkowej 39-kDa), pomimo ustąpienia objawów klinicznych, nawet 21 miesięcy po jego zakończeniu (20). Wynik PCR wypadł również dodatnio, nawet 3 lata po leczeniu, u pięciu z szesnastu pacjentów z bezobjawową kiłą układu nerwowego. U kilku chorych wykrywano materiał genetyczny krętka wyłącznie po leczeniu. Na podstawie tych wyników autorzy sugerowali, że metody amplifikacji DNA krętka bladego w płynie mózgowo-rdzeniowym mają ograniczone zastosowanie do oceny skuteczności leczenia kiły układu nerwowego, ponieważ cząsteczka DNA jest bardzo stabilnym biopolimerem, mogącym przetrwać bardzo długo w tym materiale biologicznym (20). W eksperymentalnej kile królika stwierdzono, że DNA krętków martwych jest niewykrywalne w skórze oraz jądrach odpowiednio 15 i 10 dni po zakażeniu, DNA krętków żywych – 7-30 dni po leczeniu, w zależności od miejsca inokulacji. U królików nieleczonych materiał genetyczny bakterii był wykrywany w różnych tkankach ponad 120 dni po zakażeniu. Wyniki otrzymane metodą PCR były w 100% zgodne z wynikami RIT. Autorzy zasugerowali, że dodatni krętkowy PCR po upływie kilku tygodni po leczeniu wskazuje na niepowodzenie lecznicze (21).

PODSUMOWANIE

W praktyce klinicznej, do badań pacjentów dla celów diagnostycznych stosuje się, jak dotąd, M-PCR (17, 22, 23). Jego wartość wydaje się największa w przypadkach kiły wczesnej, a szczególnie - kiły pierwszego okresu, do badania materiału pobranego ze zmian pierwotnych, w których liczba krętków jest stosunkowo duża ($22 \times 10^3 - 5,7 \times 10^6$). Próg czułości tej metody wynosi 1 pg DNA (około 800 bakterii) i ma ona zadowalające parametry (czułość i swoistość) do badań skryningowych w zakaźnym okresie kiły, umożliwiając wykrycie zakażenia przed serokonwersją (17, 22, 23). Metoda PCR, bez wskazania na jej konkretną odmianę, została polecona do diagnostyki kiły wczesnej objawowej oraz

kiły wrodzonej (w materiale ze zmian skórnych, śluzówkowych, w łożysku) w zalecenia europejskich (24).

Podsumowując, rozwój metod identyfikacji czynnika zakaźnego kiły przebiega powoli, napotykać na trudności. Wydaje się, że duże nadzieje należy wiązać z metodami amplifikacji materiału genetycznego krętka bladego, chociaż poznanie jego pełnego genomu nie wpłynęło, jak dotąd, znacząco na ich rozwój (25). Metody te wymagają standaryzacji, a ich przydatność w trudnych klinicznie sytuacjach, w szczególności do diagnostyki kiły układu nerwowego niewątpliwie wymaga dalszych badań. Poszukuje się wciąż najlepszych, spośród ponad 1000, genów krętka do amplifikacji.

A B Serwin, B Chodynicka

THE DIRECT DIAGNOSIS OF SYPHILIS – MODERN STANDARDS
AND DIRECTIONS OF DEVELOPMENT

SUMMARY

The methods of direct diagnosis of syphilis developed slowly, in contrast to dynamic development of serological diagnosis of the disease. The authors present modern modes of identification of *Treponema pallidum* and directions of their modifications. The cultivation of *Treponema pallidum in vitro*, the different methods of nucleic acids amplifications and their practical application are discussed.

PIŚMIENNICTWO

1. Schaudinn F, Hoffmann E. Vorläufiger Bericht über das Vorkommen von Spirocheten in syphilitischen Krankheitsprodukten und bei Papillomen. Arbeit Kaiser-Klin Gesundheits 1905; 22: 527.
2. Wicher K, Horowitz HW, Wicher V. Laboratory methods of diagnosis of syphilis for the beginning of the third millenium. Microbes Infect 1999; 1: 1035-1049.
3. Cummings MC, Lukehart SA, Marra C, i in. Comparison of methods for the detection of *Treponema pallidum* in lesion of early syphilis. Sex Transm Dis 1996; 23: 366-369.
4. Fieldsteel AH, Cox DL, Moeckli RA. Cultivation of virulent *Treponema pallidum* in tissue culture. Infect Immun 1981; 32: 908-915.
5. Levy JA. Confirmation of the successful cultivation of *Treponema pallidum* in tissue culture. Microbiologica 1984; 7: 367-370.
6. Norris SJ. In vitro cultivation of *Treponema pallidum*: independent confirmation. Infect Immun 1982; 36: 437-439.
7. Norris SJ, Edmondson DG. Factors affecting the multiplication and subculture of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in a tissue culture system. Infect Immun 1986; 53: 534-539.
8. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, i in. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988; 239: 487-491.
9. Burstein JM, Grimprel E, Lukehart SA, Nordgard MV, Radolf JD. Sensitive detection of *Treponema pallidum* by using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991; 29: 62-69.
10. Hay PE, Clarke JR, Strugnell RA, Taylor-Robinson D, Goldmeier D. Use of polymerase chain reaction to detect DNA sequences specific to pathogenic treponemes in cerebrospinal fluid. FEMS Microbiol Lett 1990; 56: 233-238.

11. Noordhoek GT, Wieles B, Van Der Sluis JJ, Embden JDA. Polymerase chain reaction and synthetic DNA probes: a means of distinguishing the causative agents of syphilis and yaws? *Infect Immun* 1990; 58: 2011-2013.
12. Jethwa HS, Schmitz JL, Dallabeta G, i in. Comparison of molecular and microscopic techniques for detection of *Treponema pallidum* in genital ulcers. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 180-183.
13. Kouznetsov AV, Prinz JC. Molecular diagnosis of syphilis: the Schaudinn-Hoffmann lymph-node biopsy. *Lancet* 2002; 360: 388-389.
14. Noordhoek GT, Wolters EC, De Jonge ME, Van Embden JDA. Detection of 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.
15. Centurion-Lara A, Castro C, Shaffer JM, Van Voorhis WC, Marra CM, Lukehart SA. Detection of *Treponema pallidum* by a sensitive reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1348-1352.
16. Orle K, Gates CA, Martin DH, Body B, Weiss J. 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.
17. Liu AY, Jiang MJ, Yin YP, Sun JF. Detection of pathogens causing genital ulcer disease by multiplex polymerase chain reaction. *Chin Med Sci J* 2005; 20: 273-275.
18. 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.
19. Centurion-Lara A, Sun ES, Barrett LK, Castro C, Lukehart SA, Van Vooris WC. Multiples alleles *Treponema pallidum* repeat gene D in *Treponema pallidum* isolates. *J Bacteriol* 2000; 182: 2332-2335.
20. Grimprel E, Sanchez PJ, Wendel GD, i in. 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.
21. Wicher K, Abbruscato F, Wicher V, Collins DN, Auger I, Horowitz HW. Identification of persistent infection in experimental syphilis by PCR. *Infect Immun* 1998; 66: 2509-2513.
22. Morse SA, Tress DL, Hun Y, i in. Comparison of clinical diagnosis and standard laboratory and molecular methods for the diagnosis of genital ulcer disease in Lesotho: association with human immunodeficiency virus infection. *J Inf Dis* 1997; 175: 583-589.
23. 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.
24. Goh BT, van Voorst Vader PC. European guideline for the management of syphilis. *Int J STD AIDS* 2001; 12 (Suppl. 3): 14-26.
25. Frazer CM, Norris SJ, Weinstock GM, i in. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science*, 1998, 281, 375-388.

Otrzymano: 26.06.2006 r.

Adres autorek:

dr n. med. Agnieszka Beata Serwin, prof. dr hab. med. Bożena Chodynicka
Klinika Dermatologii i Wenerologii AMB
Ul. Żurawia 14, 15-540 Białystok
tel. 0-85 7409570, fax 0-85 7409406
e-mail: agabser@amb.edu.pl
e-mail: bozchod@amb.edu.pl