

Применение полимеразной цепной реакции для увеличения достоверности лабораторной диагностики ранних форм сифилиса

А.Е. ГУШИН¹, Н.В. ФРИГО², Л.А. ДУДАРЕВА³, К.О. МИРОНОВ¹, Л.М. ТОПОРОВСКИЙ³, Г.А. ШИПУЛИН¹

¹ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора; ²ФГУН ЦНИКВИ Росздравнадзора; ³ГКБ № 14 им. В.Г. Короленко Департамента здравоохранения Москвы

Use of polymerase chain reaction for enhancement of reliability of laboratory diagnose of syphilis

A.E. GUSHCHIN¹, N.V. FRIGO², L.A. DUDAREVA³, K.O. MIRONOV¹, L.M. TOPOROVSKY³, G.A. SHIPULIN¹

¹Federal State Institution of Science (FSIS) Central Research Institute of Epidemiology of Rosпотребнадzor, ²FSIS Central Research Skin-Venereologic Institute of Roszdravnadzor, ³V.G. Korolenko City Clinical Hospital of the Department of Health Care of Moscow

Исследование посвящено оценке достоверности лабораторного диагноза сифилиса, установленного с использованием регламентированного метода — темнопольной микроскопии (ТПМ) и метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Обоиими методами были протестированы образцы серозного отделяемого (райц-серума) сифилидов у 19 больных первичным и 82 больных вторичным сифилисом. Двум пациентам диагноз первичного сифилиса был поставлен на основании данных клинической картины и обнаружения бледной трепонемы при ТПМ, результаты серологических тестов и ПЦР у них были отрицательными. Детальный молекулярно-генетический анализ позволил выявить у этих пациентов наличие ДНК сапрофитных трепонем — *Treponema refringens* и отсутствие ДНК *T. pallidum*. Кроме того, у этих пациентов в исследованном материале была обнаружена ДНК вируса простого герпеса 2-го типа. Таким образом, была установлена ошибочность поставленного диагноза сифилиса. Сапрофитные трепонемы *T. refringens* и *T. putidum* при микроскопии были также ошибочно приняты за *T. pallidum* у 3 больных с вторичным сифилисом. В то же время только у 13 из 17 (76%) больных первичным и у 42 из 82 (51%) вторичным сифилисом *T. pallidum* обнаруживалась при ТПМ, в то время как методом ПЦР возбудитель определялся у 17 из 17 (100%) пациентов с первичным сифилисом и у 66 из 82 (80%) при вторичном. Полученные результаты позволяют считать метод ПЦР более чувствительным и специфичным по сравнению с ТПМ, что обеспечивает большую точность лабораторного диагноза при ранних формах сифилиса.

Ключевые слова: сифилис, ранние формы, темнопольная микроскопия, полимеразная цепная реакция, диагностика.

The investigation is performed to evaluate reliability of laboratory diagnosis of syphilis, based on limited methods – dark-field microscopy (DFM) and polymerase chain reaction (PCR). Samples of serous discharge (rights-serum) of syphilides of 19 patients with primary syphilis and of 82 patients with secondary syphilis, were tested with the both methods. In two patients the diagnosis of primary syphilis was made on base of clinical data and of detection of *Treponema pallidum* at DFM. Results of their serologic and PCR tests were negative. Comprehensive molecular-genetic analysis revealed DNA of saprophytic treponemas – *T. refringens* and no DNA of *T. pallidum* in these patients. Moreover DNA of type 2 herpes simplex virus was detected in investigated material of these patients. Thus, the made diagnosis of syphilis was found to be mistaken. Over microscopic investigation saprophytes *T. refringens* and *T. putidum* were also misinterpreted as *T. pallidum* in three patients with secondary syphilis. *T. pallidum* was revealed in 13 from 17 (76%) patients with primary syphilis and in 42 from 82 (51%) patients with secondary syphilis only, whereas with PCR the infect was detected in 17 from 17 (100%) patients with primary syphilis and in 66 from 82 (80%) in patients with secondary syphilis. The gained results allow considering PCR method to be more sensitive and more specific in comparison with DFM, proving more exact laboratory diagnosis of early syphilis.

Key words: syphilis, early syphilis, dark-field microscopy, polymerase chain reaction, diagnosis.

Основу лабораторной диагностики сифилиса составляют непрямые серологические методы, позволяющие выявлять антитела к возбудителю сифилиса — *Treponema pallidum*. Однако по-прежнему бесспорным доказательством инфекции остается прямое выявление возбудителя. Попытки культивирования патогенной *T. pallidum* в условиях *in vitro* до сих пор не увенчались успехом. Единствен-

ным регламентированным прямым методом диагностики сифилиса на сегодняшний день остается микроскопическое исследование, наиболее распространенным вариантом которого является темнопольная микроскопия (ТПМ). Метод позволяет обнаруживать живые подвижные трепонемы в серозном отделяемом высыпных элементов на коже и слизистых оболочках, а также в пунктах лимфатических узлов. Метод микроскопии обладает несомненными достоинствами — простотой выполнения и возможностью визуального обнаружения возбудителя заболевания. Вместе с тем существуют такие проблемы,

как ограниченный предел детекции и трудности в различиях между патогенными и сапрофитными трепонемами, колонизирующими слизистые оболочки и кожу человека, что снижает диагностическую чувствительность и специфичность метода.

В последние годы для диагностики инфекций начали широко и активно применяться молекулярно-биологические методы, основанные на амплификации специфических для возбудителя фрагментов нуклеиновых кислот. Эти методы обладают высокой аналитической чувствительностью и специфичностью, обеспечивая высокую достоверность лабораторного исследования. Наиболее известной является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Применение ПЦР пока не нашло отражения в существующих нормативных документах, регламентирующих диагностику сифилиса в Российской Федерации. В то же время многие отечественные специалисты указывают на возможные перспективы оптимизации диагностики сифилиса путем использования данного метода [1–3]. Для внедрения метода ПЦР в лабораторную практику необходима оценка его диагностической эффективности по сравнению с общепринятыми методами исследования.

Целью данной работы явилась оценка достоверности лабораторного диагноза, основанного на прямом выявлении возбудителя сифилиса методами ТПМ и ПЦР.

Материал и методы

В исследование были включены больные первичным и вторичным сифилисом, проходившие обследование в кожно-венерологических диспансерах Москвы в 2003–2004 гг. Всего был обследован 101 пациент, в том числе 28 (27,7%) женщин и 73 (72,3%) мужчины. Диагноз первичного сифилиса был установлен у 19 (18,8%) пациентов, вторичного — у 82 (81,2%). Диагноз сифилиса устанавливали на основании данных анамнеза, результатов клинического и лабораторного обследования. Для подтверждения диагноза использовали микроскопические (исследование для обнаружения бледной трепонемы в серозном отделяемом сифилидов) и серологические методы исследования.

Для проведения исследования с целью выявления бледных трепонем в темном поле (ТПМ) клинический материал (серозное отделяемое сифилидов) получали путем разражения поверхности специфических элементов — твердых шанкров, папул, широких кондилом. Полученный материал помещали на предметное стекло, смешивали с каплей стерильного физиологического раствора, накрывали покровным стеклом и исследовали в темном поле зрения с помощью светового микроскопа ЛОМО АУ-12 при увеличении 40. Для окончательного заключения о наличии возбудителя просматривалось не менее 3–5 полей зрения.

Серологические методы включали реакцию микропреципитации (РМП, «Антиген кардиолипиновый для реакции микропреципитации» производства ЗАО «Биолек», Украина); реакцию пассивной гемагглютинации (РПГА, «Люис-РПГА-тест» производства ЗАО НИАРМЕДИК ПЛЮС, Россия); иммуноферментный анализ (ИФА, «РеккомбиБест Антипаллидум IgG», производства ЗАО «Вектор-Бест», Россия; «ТрепонемаСкрин» производства ЗАО «Биосервис» и «СИФ-IgG-ДС-стрип» производства ЗАО «Медико-Биологический Союз», Россия).

У всех пациентов, обследованных методом ТПМ, одновременно брали клинический материал для ПЦР-исследования с целью выявления ДНК бледной трепонемы и вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типов (ВПГ-1 и ВПГ-2). Материал для ПЦР получали тем же способом и с тех же элементов на коже и слизистых оболочках, что и для ТПМ. Полученный клинический материал помещали в стерильные пробирки типа Эппендорф емкостью 1,5 мл с 500 мкл физиологического раствора и 0,01% азидом натрия и доставляли в лабораторию ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, где его хранили при температуре -70°C до проведения исследования. ПЦР-исследование клинического материала, полученного у больных первичным и вторичным сифилисом, для выявления ДНК *T. pallidum* осуществляли ретроспективно. Для этих целей использовали коммерческую ПЦР-тест-систему Амплисенс *Treponema pallidum* производства ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Регистрационное удостоверение Росздравнадзора № ЛС-000916 от 18.11.05). В качестве мишени для амплификации в данном диагностикуме используется фрагмент гена специфического поверхностного антигена бледной трепонемы trp47 (ПЦР-trp47), который отсутствует у других видов микроорганизмов рода *Treponema*. Подробное описание разработки тест-системы и ее аналитические характеристики представлены ранее [4].

В случае несовпадения результатов ПЦР-trp47 и ТПМ по выявлению наличия или отсутствия возбудителя сифилиса в клиническом материале больных проводили дополнительное исследование образцов с целью определения ДНК бледной трепонемы с использованием некоммерческой ПЦР тест-системы, разработанной в ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, с праймерами к 16S-рибосомальному гену трепонем (ПЦР-16S). Входящие в состав тест-системы олигонуклеотидные праймеры позволяли амплифицировать фрагмент ДНК размером 318 пар нуклеотидных оснований, не только *T. pallidum*, но и трепонем других видов.

Для идентификации видовой принадлежности фрагментов ДНК, амплифицированных с помощью ПЦР-16S, определяли их нуклеотидные последовательности методом секвенирования с использованием реагентов и прибора Gene Analyzer ABI Prism 3100, производства Applied Biosystem (США) согласно прилагаемому протоколу. Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения BLAST и международной базы данных генетической информации GeneBank.

Для исключения неспецифической этиологии высыпаний все образцы, полученные из эрозивно-язвенных элементов на гениталиях, были исследованы также для выявления ДНК ВПГ-1 и ВПГ-2 с помощью ПЦР тест-системы Амплисенс HSV1/2 производства ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (Регистрационное удостоверение Росздравнадзора № ЛС-001503 от 14.04.06).

Результаты исследования

Результаты нетрепонемных и трепонемных серологических тестов были положительными у всех больных сифилисом, за исключением двух пациентов с диагнозом первичного сифилиса, у которых результаты этих тестов в период обследования оказались отрицательными, а диагноз первичного сифилиса был установлен на основании клинических данных и ТПМ.

Результаты ПЦР-исследования серозного отделяемого высыпаний, локализованных на коже и слизистых оболочках пациентов, которое проводилось для выявления ВПГ-1 и ВПГ-2, оказались отрицательными у всех больных, за исключением тех же двух пациентов с диагнозом первичного сифилиса. В клиническом материале этих больных методом ПЦР была выявлена ДНК ВПГ-2.

Для удобства сопоставления результатов исследования полученных от больных с диагнозом сифилиса клинических образцов для выявления бледной трепонемы методами ТПМ и ПЦР все больные были разделены на 4 группы — А, В, С, D:

— группа А была представлена больными с первичным и вторичным сифилисом, у которых возбудитель обнаруживался обоими методами — ТПМ и ПЦР-*trp47*;

— в группу В были включены пациенты, у которых ТПМ давала отрицательный результат, но методом ПЦР-*trp47* обнаруживалась ДНК бледной трепонемы;

— группа С была представлена больными, у которых бледная трепонема обнаруживалась методом ТПМ, а результаты исследования клинических образцов методом ПЦР-*trp47* были отрицательными;

— в группу D были объединены больные, у которых возбудитель сифилиса не обнаруживался ни одним из методов — ТПМ или ПЦР-*trp47*.

Суммарные результаты сравнения двух прямых методов обнаружения *T. pallidum* — ТПМ и ПЦР представлены в табл. 1.

Согласно представленным данным, у 55 пациентов (группа А, больные первичным и вторичным сифилисом) возбудитель сифилиса обнаруживался как с помощью ТПМ, так и методом ПЦР-*trp47*. У 13 пациентов группы D с диагнозом вторичный сифилис бледная трепонема не обнаруживалась ни методом ТПМ, ни методом ПЦР-*trp47*. Таким образом, совпадающие результаты обоих методов прямого выявления бледной трепонемы (ТПМ и ПЦР) были получены у 68 (67%) обследованных пациентов. В обеих группах (А и D) результаты трепонемных и нетрепонемных серологических тестов были положительными.

У 28 пациентов (4 больных с первичным и 24 — с диагнозом вторичный сифилис, группа В) в райц-серуме сифилидов методом ПЦР-*trp47* обнаруживалась ДНК бледной трепонемы, а ТПМ давала отрицательный результат. У 5 больных (у 2 с диагнозом первичный и у 3 с диагнозом вторичный сифилис) результат ТПМ был положительный, а ПЦР давала отрицательный результат. Таким образом, несовпадение результатов прямого выявления блед-

ной трепонемы методами ТПМ и ПЦР-*trp47* было констатировано у 33 (33%) пациентов.

Для выяснения причин расхождения результатов между ПЦР-*trp47* и ТПМ и подтверждения обнаружения бледной трепонемы в исследуемом клиническом материале у 33 пациентов (группы В и С) было проведено дополнительное исследование образцов с целью выявления 16S-рибосомального гена трепонем. Кроме того, для видовой идентификации микроорганизма был проведен анализ нуклеотидной последовательности амплифицированных фрагментов 16S-рибосомального гена. Такой анализ в последние годы стал основным в создании современной таксономической классификации микроорганизмов [5]. Полученные данные представлены в табл. 2.

Как следует из приведенных данных, во всех клинических образцах, полученных от 28 больных с диагнозом сифилиса, у которых бледная трепонема не обнаруживалась методом ТПМ, но выявлялась ДНК *T. pallidum* методом ПЦР-*trp47* (группа В), было подтверждено наличие ДНК микроорганизмов рода *Treponema*. Проведенный методом секвенирования анализ нуклеотидных последовательностей ДНК обнаруженного микроорганизма позволил подтвердить его принадлежность к виду *T. pallidum*.

Во всех 5 образцах, взятых у пациентов группы С, у которых метод ТПМ давал положительный результат, а результаты ПЦР-исследования оказались отрицательными, методом ПЦР-16S было подтверждено наличие в клиническом материале трепонем. Вместе с тем филогенетический анализ амплифицированного фрагмента 16S-рибосомального гена позволил отнести эти трепонемы к другим видам: *T. putidum* (у 2 пациентов) и *T. refringens* (у 3 обследованных), что свидетельствовало о возможности ошибок диагностики, допущенных врачами лабораторий при ТПМ. Здесь следует подчеркнуть, что 2 из 3 пациентов с *T. refringens* был поставлен диагноз первичного сифилиса, при этом у них методом ПЦР была обнаружена ДНК ВПГ-2.

Обсуждение

Метод ПЦР в настоящее время не относится к регламентированным методам диагностики сифилиса и носит пока лишь исследовательский статус. Вместе с тем, учитывая его высокую чувствительность и специфичность, следует рассматривать возможность применения данного метода для осуществления диагностики сифилиса, особенно в сложных случаях, когда обычные методы идентификации дают отрицательный результат, а клиничко-анам-

Таблица 1. Результаты сравнительного исследования образцов клинического материала больных первичным и вторичным сифилисом методами ТПМ и ПЦР-*trp47*

Группы	Обнаружение <i>T. pallidum</i> прямыми методами	Число больных с первичным сифилисом	Число больных с вторичным сифилисом	Общее число больных
А	Обнаружена методами ТПМ и ПЦР- <i>trp47</i>	13	42	55
В	Обнаружена только методом ПЦР- <i>trp47</i>	4	24	28
С	Обнаружена только методом ТПМ	2	3	5
Д	Не обнаружена обоими методами	0	13	13
Всего обследовано методами ТПМ и ПЦР- <i>trp47</i>	—	19	82	101

Таблица 2. Результаты секвенирования и филогенетического анализа фрагментов 16S-рибосомальных генов микроорганизмов в клинических образцах 33 больных сифилисом с несовпадающими результатами ТПМ и ПЦР-тpp47

Группа	Число образцов	Положительные результаты		Результаты видовой идентификации
		ПЦР-тpp47	ПЦР-16S	
В	28	28	28	<i>T. pallidum</i>
С	2	0	2	<i>T. putidum</i>
С	3	0	3	<i>T. refringens</i>

нестические данные не позволяют исключить сифилитическую инфекцию. Одним из путей позиционирования метода ПЦР среди других методов диагностики сифилиса является проведение сопоставления его результатов с результатами общепринятых методов исследования, что и было представлено в настоящей работе.

При анализе результатов одновременного исследования методами ПЦР и ТПМ клинических образцов, полученных у больных первичным и вторичным сифилисом, полное совпадение было получено у 67% пациентов, у остальных обследованных установлено расхождение результатов этих исследований. Дополнительное исследование с целью определения ДНК трепонем методом ПЦР-16S с последующим секвенированием и филогенетическим анализом позволило у большинства пациентов с расхождением результатов (28 из группы В с положительными результатами ПЦР и отрицательными — ТПМ) подтвердить наличие в клиническом материале *T. pallidum*. Возможной причиной расхождения результатов при исследовании образцов этих пациентов методами ТПМ и ПЦР-тpp47 следует считать более высокую аналитическую чувствительность метода ПЦР. Данное предположение подтверждается результатами работ зарубежных и отечественных исследователей. Так, в работах К. Orle и Н. Liu было показано, что предел детекции методов на основе ПЦР позволяет обнаруживать возбудитель сифилиса при очень низких концентрациях — менее $2 \cdot 10^2$ клеток/мл, в то время как для ТПМ предел обнаружения составляет примерно 10^3 клеток/мл [6, 7]. Аналитическая чувствительность тест-системы «Амплиценс *T. pallidum*», выпускаемой ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, находится в пределах $4 \cdot 10^2$ клеток/мл [4].

Наибольший интерес при выяснении причин несовпадений результатов ТПМ и ПЦР представляла группа С, поскольку при более низкой аналитической чувствительности ТПМ ее результаты у пациентов были положительными, в то время как результаты более высокочувствительного метода — ПЦР-тpp47 — отрицательными. Указанная группа была представлена 2 пациентами с первичным и 3 с вторичным сифилисом. При этом следует обратить внимание, что именно у этих 2 пациентов с диагнозом первичного сифилиса результаты как трепонемных, так и нетрепонемных серологических тестов в период обследования были отрицательными. Дополнительное молекулярно-генетическое исследование с филогенетическим анализом позволило выявить, что у 2 больных вторичным сифилисом в образцах присутствует ДНК *T. putidum* — недавно охарактеризованный новый вид трепонем, обитающий в ротовой полости и генетически близкий *T. denticola* [8]. У обоих пациентов группы С с первичным и одного пациента с вторичным сифилисом была обнаружена ДНК *T. refringens*. *T. putidum* может обнаруживаться в материале

с зубных налетов, участвуя в развитии острого некротизирующего гингивита и периодонтита, а *T. refringens*, как известно, является сапрофитом, колонизируя наружные половые органы. Протоколы лабораторного исследования свидетельствуют, что у пациентов, у которых вместо *T. pallidum* была обнаружена *T. putidum*, материал был взят как раз со слизистой оболочки полости рта, а у пациентов с выявленной *T. refringens* — с высыпаний в области половых органов. При этом ни у одного из пациентов группы С не было обнаружено фрагментов 16S-рибосомального гена, принадлежащих *T. pallidum*. На основании полученных результатов можно предположить, что в клиническом материале у данных пациентов сапрофитные спирохеты, наблюдаемые при микроскопическом исследовании, были ошибочно приняты за *T. pallidum*. Такой вывод подтверждается данными как зарубежной, так и отечественной литературы. В обзоре S. Larsen, посвященном лабораторным методам диагностики сифилиса, указывается, что даже опытный специалист может испытывать большие трудности при дифференциации *T. pallidum* от сапрофитных трепонем. При этом наиболее часто в ходе микроскопического исследования *T. pallidum* путают с *T. refringens* и *T. denticola* [9]. В отечественных руководствах также указывается на трудности в видовой идентификации спирохет из-за того, что *T. refringens*, *T. phagedenis*, *T. denticola* морфологически сходны с *T. pallidum* [10–12]. Распространенность же сапрофитных трепонем может быть достаточно высокой. Так, по данным Hook, они были обнаружены у 23% клинически здоровых лиц.

Если при подозрении на вторичный сифилис в лабораторном исследовании акцент делается на выявление серологических маркеров, которые к этому периоду инфекции становятся положительными у подавляющего большинства инфицированных, то в первичном периоде сифилиса результаты серологических реакций могут оставаться отрицательными еще в течение 1–4 нед после развития клинических проявлений инфекции. В этом случае прямое обнаружение возбудителя имеет важнейшее значение для установления окончательного диагноза. Данное положение может быть проиллюстрировано результатами обследования 2 пациентов с диагнозом первичного сифилиса. Как уже было отмечено, 2 пациентам группы С, у которых впоследствии с использованием двух методологий — ПЦР и секвенирования — было подтверждено наличие в клинических образцах *T. refringens*, а не *T. pallidum*, диагноз первичного сифилиса был поставлен при отрицательных результатах серологического исследования на основании клинических признаков — высыпаний эрозивно-язвенного характера в области головки полового члена, наличия регионарного лимфаденита и положительных результатов ТПМ. Кроме того, именно у этих 2 пациентов из всех обследованных лиц в серозном материале с высы-

паний на коже была обнаружена ДНК ВПГ-2. Возможно, на фоне клинической картины, характерной для сифилиса, мнение специалиста, проводившего микроскопию, склонилось в пользу *T. pallidum*, в то время как причиной эрозивно-язвенных поражений гениталий, по-видимому, являлся ВПГ-2. Полученные результаты позволяют считать, что этим двум пациентам с эрозивно-язвенными проявлениями, вызванными ВПГ-2 и колонизированными сапрофитными трепонемами, на основе результатов ТПМ диагноз первичного сифилиса был поставлен ошибочно.

Таким образом, данные проведенного исследования свидетельствуют, что результаты метода ПЦР при обследовании лиц с подозрением на сифилис позволяют более объективно по сравнению с микроскопическим методом оценивать наличие возбудителя в исследуемом материале, обеспечивая точность диагноза. Оснащенность современных диагностических лабораторий оборудованием для проведения ПЦР-исследований и наличие зарегистрированных коммерческих тест-систем позволяют ставить вопрос о включении данного метода в алгоритм обследования лиц с подозрением на сифилис.

ЛИТЕРАТУРА

1. Скрипкин Ю.К., Шаропова Г.Я., Селицкий Г.Д. Инфекции, передаваемые половым путем. М: МЕДпресс-информ 2001; 368.
2. Дмитриев Г.А., Фриго Н.В. Сифилис. Дифференциальный клинико-лабораторный диагноз. М: Медкнига 2004; 364.
3. Молочков В.А., Иванов О.Л., Аверина В.И. и др. Инфекции, передаваемые половым путем. Клиника, диагностика, лечение. М: Медицина 2006; 632.
4. Родионова Е.Н., Гушин А.Е., Шипулин Г.А. и др. Выявление ДНК и РНК *Treponema pallidum* в клиническом материале у пациентов с различными формами сифилиса. Журн микробиол 2003; 3: 43—50.
5. Clarridge J.E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Clin Microbiol Rev 2004; 17: 840—862.
6. Orle K.A., Gates C.A., Martin D.H. et al. 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.
7. 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.
8. Wyss C., Moler A., Choi B.K. et al. *Treponema putidum* sp. nov., a medium-sized proteolytic spirochaete isolated from lesions of human periodontitis and acute necrotizing ulcerative gingivitis. Int J Syst Evol Microbiol 2004; 54: 1117—1122.
9. Larsen S.A., Steiner B.M., Rudolph A.H. Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 1—21.
10. Родионов А.Н. Сифилис. Руководство для врачей. Ст-Петербург: Питер 2000; 288.
11. Савичева А.М., Соколовский Е.В., Домейка М. Краткое руководство по микроскопической диагностике инфекций, передаваемых половым путем. Ст-Петербург: Фолиант 2004; 128.
12. Байчурина А.З., Гильманова Г.Х., Григорьев В.Е. и др. Медицинская микробиология. М: ГЭОТАР 1999; 1200.