Određivanje prisutnosti bakterije Treponema pallidum u bolesnika s primarnim stadijem ranog sifilisa i u kasnom latentnom sifilisu

Marinović, Branka

Doctoral thesis / Disertacija

2003

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:680463

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Branka Marinović

ODREĐIVANJE PRISUTNOSTI BAKTERIJE *TREPONEMA PALLIDUM* U BOLESNIKA S PRIMARNIM STADIJEM RANOG SIFILISA I U KASNOM LATENTNOM SIFILISU

DOKTORSKA DISERTACIJA

Zagreb, lipanj 2003.

Rad je izrađen u Klinici za kožne i spolne bolesti Kliničkog bolničkog centra i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

i

Zavodu za molekularnu medicinu Instituta "Ruđer Bošković" u Zagrebu

Voditelj rada: prof. dr. sc. Aleksandra Basta-Juzbašić

Redni broj rada:

SADRŽAJ

POPIS KRATICA

POPIS SLIKA

POPIS TABLICA

1. **UVOD** 1

1.1. Povijesne napomene 1

1.2. Epidemiologija sifilisa 4

1.3. *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* 7

1.3.1. Genom *T. pallidum* 9

1.4. Način prijenosa bolesti i kontagioznost 9

1.5. Klinička slika 11

1.5.1. Primarni stadij sifilisa 12

1.5.2. Sekundarni stadij sifilisa 18

1.5.3. Latentni stadij sifilisa 27

1.5.4. Tercijarni stadij sifilisa 28

1.5.5. Kongenitalni sifilis 32

1.5.6. Sifilis i infekcija HIV-om 35

1.6. Dijagnostika sifilisa 35

1.6.1. Direktne metode dokazivanja *T. pallidum* 36

1.6.1.1. Patohistološki nalaz 36

1.6.1.2. Dokazivanje *T. pallidum* tehnikom mikroskopiranja u tamnom polju 36

1.6.1.3. Dokazivanje *T. pallidum* pomoću direktne fluorescentne metode 37

1.6.1.4. Uzgoj *T. pallidum* u životinjama 38

1.6.1.5. Dokazivanje gena *T. pallidum* metodom PCR 39

1.6.2. Indirektne metode 40

1.6.2.1. Netreponemski testovi 41

1.6.2.1.1. Test VDRL 41

1.6.2.1.2. Test RPR 42

1.6.2.2. Treponemski testovi 42

1.6.2.2.1. Test TPHA 42

1.6.2.2.2. Test FTA-ABS 43

1.6.2.2.3. Test 19S-IgM-FTA-ABS 44

1.6.2.2.4. Test ELISA 44

1.6.2.2.5. Test ITP 45

1.7. Dijagnostika sifilisa i stadiji bolesti 46

1.8. Terapija sifilisa 50

1.8.1. Praćenje djelotvornosti terapije 52

1.8.2. Neželjena djelovanja terapije 53

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 55

3. ISPITANICI I METODE 56

3.1. Ispitanici 56

3.2. Metode 56

3.2.1. Anamneza i dermatološki pregled 57

3.2.2. Indirektne metode dokazivanja 57

3.2.2.1. Test TPHA 57

3.2.2.2. Test VDRL 58

3.2.3. Direktne metode dokazivanja 59

3.2.3.1. Uzgoj *T. pallidum* u testisima kunića 59

3.2.3.2. Detekcija DNA *T. pallidum* metodom PCR 59

3.2.3.2.1. Izolacija DNA iz tkiva i seruma 59

3.2.3.2.2. Izolacija DNA iz krvi 60

3.2.3.2.3. Metoda PCR 61

3.2.4. Statističke metode 66

4. REZULTATI 67

4.1. Testovi VDRL i TPHA 67

4.2. Metoda PCR 67

4.3. Analiza ispitanika prema stadiju bolesti 68

4.3.1. Bolesnici s primarnim stadijem ranog sifilisa 68

4.3.1.1. Statistička analiza bolesnika prema spolu i dobi 69

4.3.1.2. Statistička analiza bolesnika prema nalazu TPHA i spolu 69

4.3.1.3. Statistička analiza bolesnika prema nalazu VDRL i spolu 70

4.3.1.4. Statistička analiza bolesnika prema nalazu PCR i spolu 71

4.3.1.5. Prikaz nalaza PCR s obzirom na nalaze TPHA i VDRL 72

4.3.2. Skupina bolesnika s kasnim latentnim sifilisom 72

4.3.2.1. Statistička analiza bolesnika prema spolu i dobi 73

4.3.2.2. Statistička analiza bolesnika prema nalazu TPHA i spolu 73

4.3.2.3. Statistička analiza bolesnika prema nalazu VDRL i spolu 74

4.3.2.4. Statistička analiza bolesnika prema nalazu PCR i spolu 75

4.3.2.5. Prikaz nalaza PCR s obzirom na nalaze TPHA i VDRL 76

4.3.3. Kontrolna skupina ispitanika 76

5. RASPRAVA 78

6. ZAKLJUČCI 83

7. SAŽETAK 84

8. SUMMARY 85

9. POPIS LITERATURE 86

10. ŽIVOTOPIS 101

POPIS SLIKA

Slika 1. Smještaj mogućih virulentnih faktora na kromosomu *T. pallidum* (str. 10)

Slika 2. *Ulcus durum* na korpusu penisa (str. 13)

Slika 3. *Ulcus durum* – multiple lezije na penisu (str. 14)

Slika 4. *Ulcus durum* na stidnim usnama (str. 15)

Slika 5. *Ulcus durum* na jeziku (str. 17)

Slika 6. *Ulcus mixtum* na korpusu penisa (str. 19)

Slika 7. Makulozni osip na trupu (str. 21)

Slika 8. Makulopapulozni osip na tabanima (str. 22)

Slika 9. *Condylomata lata* u perianalnoj regiji i *ulcus durum* na skrotumu (str. 24)

Slika 10. *Alopecia syphilitica* na vlasištu (str. 25)

Slika 11. Tuberoserpiginozni sifilid u području lakatne jame (str. 30)

Slika 12. Guma na donjoj usnici (str. 31)

Slika 13. Analiza produkata reakcije PCR s početnim oligonukleotidima za DNA polimerazu I *T. pallidum* (str. 65)

Slika 14. Analiza produkata reakcije PCR s početnim oligonukleotidima za 45 kDa antigen *T. pallidum* (str. 65)

POPIS TABLICA

Tablica 1. Sekvence početnih nukleotida korištenih u radu (str. 62)

Tablica 2. Prikaz ispitanika s primarnim stadijem ranog sifilisa prema spolu i dobnim razredima (str. 69)

Tablica 3. Prikaz razdiobe nalaza TPHA u bolesnika s primarnim stadijem ranog sifilisa prema spolu (str. 70)

Tablica 4. Prikaz razdiobe nalaza VDRL u bolesnika s primarnim stadijem ranog sifilisa prema spolu (str. 71)

Tablica 5. Prikaz razdiobe nalaza PCR u bolesnika s primarnim stadijem ranog sifilisa prema spolu (str. 71)

Tablica 6. Usporedni prikaz različitih metoda dokazivanja u primarnom stadiju ranog sifilisa (str. 72)

Tablica 7. Prikaz ispitanika s kasnim latentnim stadijem sifilisa prema spolu i dobnim razredima (str. 73)

Tablica 8. Prikaz razdiobe nalaza TPHA u bolesnika s kasnim latentnim stadijem sifilisa prema spolu (str. 74)

Tablica 9. Prikaz razdiobe nalaza VDRL u bolesnika s kasnim latentnim stadijem sifilisa prema spolu (str. 75)

Tablica 10. Prikaz razdiobe nalaza PCR u bolesnika s kasnim latentnim stadijem sifilisa prema spolu (str. 75)

Tablica 11. Usporedni prikaz različitih metoda dokazivanja u kasnom latentnom stadiju sifilisa (str. 76)

POPIS KRATICA

DNA – od engl. *deoxyribonucleic acid*

ELISA – od engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*

FITC - fluoresceinizotiocijanat

FTA-ABS – od engl. *fluorescent treponemal antibody-absorption*

HIV- od engl. *human immunodeficiency virus*

IgG – imunoglobulin G

IgM – imunoglobulin M

i.j. – internacionalne jedinice

i.m. - intramuskularno

ITP – imobilizacija *T. pallidum*

i.v. - intravenski

kDa - kilodalton

dNTP – od engl. *deoxynucleotide triphosphate*

pb – parovi baza

PCR – od engl. *polymerase chain reaction*

p.o. – *per os*

RIT – od engl. *rabbit infectivity test*

RPR – od engl. *rapid plasma reagin*

SŽS – središnji živčani sustav

TPHA – od engl. *Treponema pallidum haemagglutination assay*

VDRL – od engl. *Venereal Disease Research Laboratory*

ZAHVALNOST DUGUJEM:

- gospođi prof. dr. sc. Aleksandri Basta-Juzbašić, mojoj mentorici, na pomoći i podršci tijekom izrade ovog rada;
- gospođi dr. sc. Magdaleni Grce, voditeljici Laboratorija za molekularnu virologiju i bakteriologiju Zavoda za molekularnu medicinu Instituta "Ruđer Bošković", koja je zajedno sa svojim suradnicama ing. Jasminkom Golubić, mr. sc. Koraljkom Husnjak, mr. sc. Mihaelom Matovina i dipl. ing. Ninom Milutin Gašperov utkala svoje znanje, iskustvo i vrijeme u rezultate ovog rada;
- gospođi prof. dr. sc. Jasni Lipozenčić, pročelnici Katedre za dermatovenerologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na poticaju nastanka kao i dovršetka ovog rada;
- gospođi prof. dr. sc. Mirni Šitum na stručnoj, a iznad svega prijateljskoj pomoći;
- svim mojim dragim suradnicama iz Laboratorija za kliničku imunologiju, imunofluorescentnu i serološku dijagnostiku na velikoj brizi i pomoći tijekom izrade rada; i
- gospodinu prof. dr. sc. Ivanu Dobriću, predstojniku Klinike za kožne i spolne bolesti na podršci, ali prije svega na temeljima stručnog i znanstvenog rada u dermatovenerologiji.

1. UVOD

Sifilis (ili lues) je kronična zarazna bolest uzrokovana spirohetom *Treponema pallidum* podporodice *pallidum (T. pallidum)*. Bolest se najčešće prenosi spolnim kontaktom, rjeđe transplacentarno od zaražene majke na plod, a danas iznimno rijetko transfuzijom ili slučajnom inokulacijom (1-3). Bolest zahvaća različita tkiva i organske sustave uključujući kožu, krvožilni, koštani i središnji živčani sustav (SŽS) (3).

1.1. Povijesne napomene

O porijeklu sifilisa, tj. o tome je li u Europu donesen iz Amerike ili je postojao u Europi davno prije otkrića Amerike, vodile su se i još se vode brojne rasprave (4,5). Opisi tzv. "venerične lepre", koja prvenstveno upućuje na sifilis, spominju se u zapisima iz starog Rima, Grčke i Kine (1,6). Međutim, činjenica je da je ubrzo po povratku Kolumbovih mornara nakon otkrića Amerike 1492. g. došlo do epidemije sifilisa u Europi, odakle se proširio u Indiju i Kinu (5). Više je pisaca, među kojima i Kolumbov sin Ferdinand, u svojim djelima tvrdilo da su Kolumbovi mornari iz novootkrivenih krajeva donijeli novu bolest, koju prema opisima prepoznajemo kao sifilis (4). Širenju epidemije pridonijeli su brojni ratovi toga doba u kojima su sudjelovali plaćenici iz različitih zemalja (3,4). Kada se govori o uzrocima tako brzog širenja bolesti Europom, uz različite pretpostavke spekulira se i s visokom virulencijom treponema, koja je do današnjih dana oslabila (7). Bolest je u to doba u različitim zemljama imala i različita imena (francuska, talijanska, njemačka, španjolska… bolest), ali uvijek takva da je iz

imena proizlazilo da je krivac za nastanak infekcije neki drugi narod, te da je od pripadnika tog naroda donesena u domaće krajeve (4,5). Paracelsus 1529. g. prvi put opisuje mogućnost infekcije fetusa, ali ne transplacentarno, već "od oca na sina" (1). U to doba bila je prisutna još jedna netočna teorija po kojoj se smatralo da bolest mogu prenijeti i dojilje na prethodno zdravu djecu povjerenu na dojenje (1). Girolamo Fracastoro 1530. g. u trećoj knjizi poeme "Syphilis sive Morbus Gallicus" opisuje pastira Syphilusa koji je za kaznu zbog neposluha prema bogu Suncu obolio od odbojne bolesti, kojoj detaljno opisuje inkubaciju, simptome, prevenciju i liječenje, a ime pastira postaje sinonim za bolest (8). U istom djelu spominje i "nježne, nevidljive organizme" kao moguće uzročnike (9).

Naziv lues (od latinskog imena za kugu, pokoru) uveo je u upotrebu liječnik Jean Fennel, također u 16. stoljeću, a on u svojim opisima razlikuje primarni i sekundarni stadij sifilisa (1). Lancisi i Boerhave su u 17. i početkom 18. stoljeća opisali sifilis kao mogući uzrok kardiovaskularnih bolesti (5), dok u drugoj polovici 18. stoljeća Morgagni uviđa da aortitis može biti sifilitičnog porijekla (4). Fournier krajem 19. stoljeća iznosi podatak da i progresivna paraliza može biti sifilitičnog porijekla (4). Phillipe Ricord 1837. g. razlikuje sifilis od gonoreje i klasificira primarni, sekundarni i tercijarni stadij (3). John Diday 1854. g. piše priručnik o kongenitalnom sifilisu (1), dok Jonathan Hutchinson 1880. g. opisuje trijadu kongenitalnog sifilisa (5). Zanimljiv je i podatak da su sredinom i krajem 19. stoljeća bolesnici sa sifilisom bili diskriminirani te su zbog moralnih razloga bili nerado hospitalizirani, a ako su već bili hospitalizirani, morali su plaćati liječenje dvostruko više od uobičajenog (10). Metschnikow i Roux su 1903. g. prenijeli sifilis na majmune, što je bio prvi pokušaj povezivanja infekcije s mikrobijelnim uzročnikom (11). Schaudinn i Hoffman su 1905. g. izolirali *T. pallidum,* i za to otkriće

1906. g. dobili Nobelovu nagradu (12). Wasserman, Neisser i Bruck su 1906. g. otkrili netreponemsku reakciju vezivanja komplementa (Wassermanov test) (13). George Still, profesor pedijatrije u Londonu, opisao je 1908. g. kongenitalni sifilis kao nasljednu bolest, koja se može prenijeti od zaražene majke na plod, iako se u većem broju slučajeva prenosi od zaraženog oca, i to spermom. U to se doba smatralo da na taj način zaraženi plod može bolest prenijeti majci (14). Coles je 1909. g. opisao dokazivanje uzročnika u tamnom polju (15), a Nelson i Mayer su 1949. g. razvili test imobilizacije *T. pallidum* (ITP), što je bio prvi specifični, treponemski test (16,17). Grimpel je 1991. g. opisao primjenu lančane reakcije polimerazom (PCR, od engl. *polymerase chain reaction*) u dijagnostici kongenitalnog sifilisa (18), a gotovo istovremeno Noordhoekova je opisala primjenu metode PCR u dijagnostici neurosifilisa (19). Cjelovitu genomsku sekvencu *T. pallidum* 1998. g. objavili su Fraser i sur. (20).

Do početka 20. stoljeća u terapiji sifilisa koristili su se uglavnom preparati žive, i to u obliku obloga i napitaka. Otkriće arsphenamina (salvarsan) 1909. g. omogućilo je standardiziranje i unapređenje terapijskih mjera, a 1914. g. otkriven je i neosalvarsan koji je uz salvarsan imao dominantnu ulogu u terapiji sifilisa. O mogućnosti liječenja neurosifilisa injekcijama krvi bolesnika oboljelih od malarije 1918. g. izvijestio je von Jauregg (9).

Nakon različitih, manje ili više uspješnih pokušaja, veliku prekretnicu u terapiji sifilisa predstavlja otkriće Johna Mahoneya koji je 1943. g. objavio da se sifilis može uspješno liječiti penicilinom (21).

Prvi zapisi o sifilisu u Hrvatskoj potječu sa samog kraja 15. i početka 16. stoljeća, a nalaze se u Državnom arhivu u Dubrovniku. U tim se zapisima navodi podatak o velikom broju oboljelih od sifilisa, kao i podatak o liječniku Antoniusu Hispanusu koji je došao u

Dubrovnik kao "liječnik koji ima veliko iskustvo u liječenju francuske bolesti" (22). Osnutkom dermatovenerooloških klinika krajem 19. i početkom 20. stoljeća i u Hrvatskoj je započelo sustavno liječenje sifilisa tada dostupnim terapijskim metodama (23), a koje se razvijalo sukladno s razvojem terapijskih postupaka u svijetu (24). Istodobno s osnivanjem Dermatovenerološke klinike na Šalati osnovan je Serološki laboratorij u kojem je provođena dijagnostika bolesti u skladu s tadašnjim saznanjima (25,26). Danas se dijagnostika sifilisa provodi u više od 30 laboratorija u Republici Hrvatskoj, no najcjelovitija klinička i laboratorijska dijagnostika provodi se u Klinici za kožne i spolne bolesti Kliničkog bolničkog centra i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te je i ovaj rad doprinos upotpunjivanju dijagnostičkih mogućnosti u bolesnika s različitim stadijima sifilisa.

1.2. Epidemiologija sifilisa

Krajem 19. i početkom 20. stoljeća sifilis je predstavljao jedan od glavnih javnozdravstvenih problema (27), osobito stoga što u to doba nije postojala djelotvorna terapija. Početkom prošlog stoljeća 10% populacije Sjedinjenih Američkih Država (SAD) i Europe bilo je zaraženo sifilisom (1), a 20% hospitaliziranih u mentalnim ustanovama imalo je neurosifilis (27). Iz tog razdoblja potječu i velike dermatovenerološke ustanove s mnogo kreveta jer se nametnula potreba zbrinjavanja velikog broja oboljelih (3). Četrdesetih godina prošlog stoljeća uvođenjem penicilina u terapiju znatno je smanjen broj oboljelih. Tijekom II. svjetskog rata provođene su preventivne mjere koje su uključivale edukaciju javnosti, kontrolu prostitucije, distribuciju kondoma kao i mogućnost terapije bez reperkusija (kazne) (1). Po završetku II. svjetskog rata došlo je do

naglog pada incidencije sifilisa, u prvom redu zahvaljujući otkriću terapije penicilinom (28).

Relativna socioekonomska stabilnost početkom 50-ih godina dvadesetog stoljeća dovela je do daljnjeg pada svih spolno prenosivih bolesti uključujući i sifilis (2). Međutim, osamdesetih godina dvadesetog stoljeća, uslijed porasta promiskuiteta, sve većega broja ovisnika o drogama, infekcije HIV-om (od engl. *human immunodeficiency virus*) (29), te velikih migracija stanovništva broj zaraženih sifilisom opet je u porastu i ponovo predstavlja javnozdravstveni problem kako u Europi tako i u SAD-u (28,30). Osobito zabrinjava visok broj zaraženih žena, što posljedično dovodi do porasta broja slučajeva kongenitalnog sifilisa. Dodatni interes za bolest pobudila je i činjenica o epidemiološkoj povezanosti sifilisa i HIV infekcije ali i podatak da ovoj skupini bolesnika sadašnja terapija vrlo često nije dostatna za liječenje sifilisa (27). Krajem 80. godina broj oboljelih u jednom je dijelu svijeta izrazito nizak, tako da se u SAD-u govori o eliminaciji bolesti te se s tim ciljem stvaraju posebni programi za kontrolu bolesti, dok se u drugim dijelovima svijeta takav ishod ne naslućuje (1). Krajem 80-ih godina prošlog stoljeća u SAD-u je, osim što je registriran općenit pad broja oboljelih (31), zamijećeno "žarišno" pojavljivanje bolesti, tj. postojanje bolesti u određenim socijalnim skupinama te u određenim zemljopisnim područjima (32). Izrazito je visok porast broja oboljelih u zemljama bivšeg Sovjetskog Saveza (7) te je u Rusiji od 1988. g. do kraja 20. stoljeća zabilježen porast broja oboljelih za 62 puta (5). Smatra se da su uzroci epidemije mnogovrsni, uključujući porast siromaštva, nezaposlenost, osobito među ženama, smanjenje državne zdravstvene skrbi te povećana migracija stanovništva (33). U nekim zemljama poput Tajlanda i Zimbabvea došlo je do pada broja oboljelih zahvaljujući javnozdravstvenim kampanjama o upotrebi prezervativa te upotrebi antibiotika (5).

Izrazit porast sredinom 90-ih godina prošlog stoljeća zamijećen je i u Bugarskoj, Rumunjskoj, a nešto manje u Češkoj (34). Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) pretpostavlja se da je 1995. godine u cijelom svijetu zabilježeno 12 milijuna novih slučajeva sifilisa odraslih (35). Od toga se smatra da je najveći broj oboljelih u južnoj i jugoistočnoj Aziji, i to 5,8 milijuna, a 3,5 milijuna slučajeva zabilježeno je u subsaharskoj Africi (35). Procjenjuje se da je prosječni broj novootkrivenih slučajeva sifilisa godišnje u razvijenim zemljama od 3 do 8 na 100.000 stanovnika. Također se smatra da je pobol u gusto naseljenim gradovima nekoliko puta veći (36).

U Hrvatskoj podaci o oboljelima od sifilisa postoje od sredine 20. stoljeća kada je uvedeno obavezno prijavljivanje oboljelih i kada su osnovani tzv. "antivenerični dispanzeri" (37). Sukladno podacima iz svijeta, broj novootkrivenih bolesnika u Republici Hrvatskoj u laganom je porastu do 1995. g., od kada ponovno postupno pada (38,39). Slični podaci navode se i za područje Slovenije gdje je zabilježen blagi porast novooboljelih do 1997. g. od kada je ponovno zamijećen blagi pad (40). Pojava kongenitalnog sifilisa slijedi, obično s godinu dana odgode, trendove porasta učestalosti primarnog i sekundarnog sifilisa u žena (41). Istina, valja napomenuti da stvaran broj oboljelih nije uvijek u skladu sa statističkom podacima koje nalazimo u literaturi (42). Ovi podaci ovise o prijavljivanju bolesnika, o suradnji između zaraženih osoba i zdravstvene službe, a s obzirom na neujednačenost izvještavanja u praksi realno uspoređivanje među različitim zemljama gotovo je nemoguće (2).

1.3. *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*

Sifilis je uzrokovan spirohetom *Treponema pallidum* (blijeda treponema) subsp. *pallidum,* patogenom isključivo za ljude (43).

Spiroheta *T. pallidum* subsp. *pallidum* (*T. pallidum*), kao i *T. pallidum* subsp. *pertenue*, *T. carateum* i *T. pallidum* subsp. *endemicum*, članovi su roda *Treponema* koji, uz rod *Borrelia,* pripada porodici *Spirochaetaceae* i redu *Spirochaetales* (44). Rod *Treponema* uključuje gorenavedene četiri vrste patogene za ljude i najmanje šest vrsta nepatogenih za ljude (45). Ranija istraživanja ukazivala su da se treponeme patogene za ljude ne razlikuju morfološki, da imaju zajedničke antigene i visoki stupanj podudarnosti DNA (od engl. *deoxyribonucleic acid*) (>95%) (19). Te navedene sličnosti mogu otežavati interpretaciju seroloških testova za sifilis u bolesnika koji dolaze iz područja gdje su česte druge treponematoze. Neke od humanih i animalnih nepatogenih saprofitičnih treponema, poput *T. microdentium, T. macrodentium, T. denticola, T. orale* i *T. vincentii* kojima obiluje područje usne šupljine kao i analno područje, također mogu učiniti dijagnozu lezija u ovim regijama nepouzdanom i težom (3). U tim slučajevima značajnu ulogu ima metoda PCR (19,20,27,44) koja je omogućila i razlikovanje pojedinih podvrsta kao što su *T. pallidum* subsp. *pallidum* i *T. pallidum* subsp. *pertenue* i *endemicum* (46).

Većina saznanja o fiziologiji, metabolizmu te o antigenoj strukturi *T. pallidum* dobivena je iz Nicholsova soja koji se održava u kunićima od 1912. godine (5,47).

Za razliku od ostalih spiroheta koje su primarno krvni paraziti, *T. pallidum* je tkivni parazit. Prenosi se direktnim kontaktom kroz nevidljiva oštećenja na koži ili sluznici,

odakle se krvotokom prenosi u regionalne limfne čvorove u kojima se umnaža sve dok ne dosegne dovoljan broj koji može uzrokovati klinički jasnu bolest (3,48).

T. pallidum je vrlo osjetljiva na isušivanje, promjene temperature, varijacije pH te količinu kisika tako da je prijenos uzročnika preko predmeta gotovo nemoguć (3).

T. pallidum je dugačka između 6 i 15 μm, široka 0,10 do 0,18 μm. Ima zašiljene krajeve i 6 do 14 pravilnih spiralnih zavoja razmaknutih 1 μm (45). S obzirom da su pretanke da bi se mogle razlučiti običnim svjetlosnim mikroskopom, svrstavaju se u gram-neodređene bakterije (43). Gibaju se rotacijskim pokretima karakterističnim za virulentne treponeme što im olakšava penetraciju u tkiva (2). U tekućem mediju gube mogućnost gibanja te ih to razlikuje od ostalih, većinom saprofitnih treponema (1).

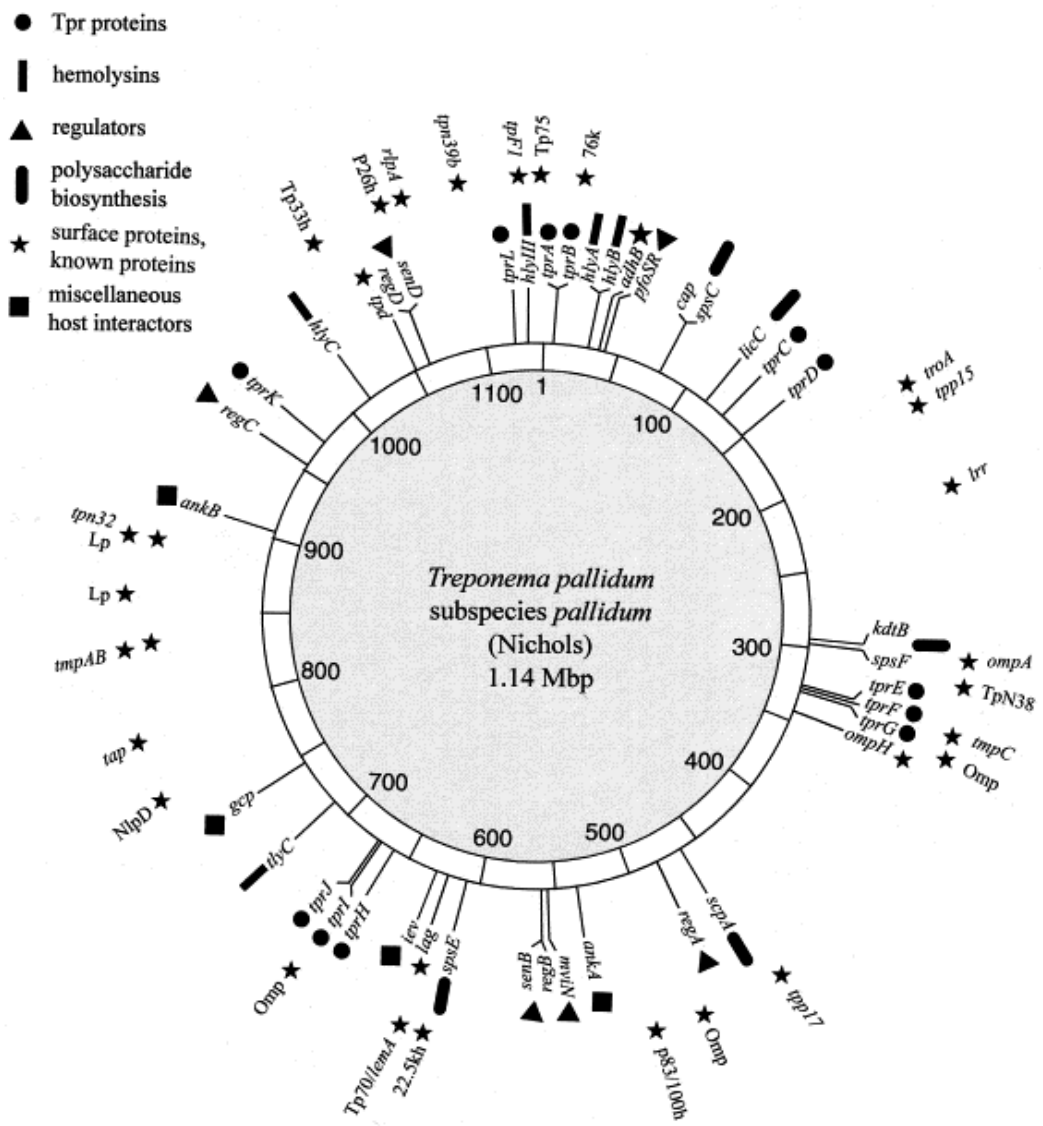
Elektronskomikroskopski utvrđene su tri glavne komponenete *T. pallidum.* To su centralni protoplazmatski cilindar (protoplast) koji sadrži genetski materijal i organele odgovorne za metabolizam, a koji je okružen citoplazmatskom membranom koja regulira apsorpciju i sekreciju. Zatim aksijalni filament (protoplazmatske flagele) koji se nalazi na svakom kraju treponeme i koji se sastoji od osam elastičnih fibrila omotanih oko protoplasta. Funkcija tih elastičnih fibrila je oblikovanje spiralne konfiguracije i sposobnost mobilnosti treponeme (49). I treća komponenta je vanjska ovojnica koja čuva oblik treponeme, čuva fragilnu citoplazmu od oštećenja i filtrira velike molekule. Ekstracelularni amorfni sluzavi sloj može zaštititi treponemu od fagocitoze. Vanjska ovojnica sadrži malu količinu integralnih transmembranskih proteina koji stimuliraju specifična protutijela tako da treponema lakše može izbjeći napad imunološkog sustava (50).

1.3.1. Genom *T. pallidum*

Fraser i sur. su 1998. godine opisali cjeloviti genom *T. pallidum* subsp. *pallidum,* kojeg čini kružna DNA s 1.138.006 parova baza. Utvrđeno je postojanje 1.041 otvorenog okvira čitanja, a za 28% od njih se pretpostavlja se da bi mogli predstavljati nove gene jer ne pokazuju homologiju s dosad otkrivenim genima (20). Već su prethodne studije utvrdile da treponema ima ograničenu mogućnost biosinteze te u velikoj mjeri koristi metaboličke sustave domaćina. Za 67 gena raspoređenih na kromosomu se pretpostavlja da bi mogli biti potencijalni virulentni faktori ove bakterije (Slika 1), međutim, smatra se ipak da najveće značenje za virulentnost treponeme ima 12 paralognih gena koji pokazuju sličnost s glavnim površinskim proteinom iz bakterije *Treponema denticola*, a označeni su kao *tpr* geni (*tpr* A-L) (55). Višestruke kopije *tpr* gena vjerojatno predstavljaju mehanizam za varijacije antigena *T. pallidum,* te stvaraju uvjet za mogući razvoj vakcina. Utvrđivanjem kompletne genomske sekvence otvara se put boljem razumijevanju patogeneze treponeme koja ne može biti uzgojena na podlozi za rast (11).

1.4. Način prijenosa i kontagioznost

Sifilis se najčešće prenosi direktnim seksualnim kontaktom s osobom u ranom stadiju bolesti. Rizik prijenosa postoji u primarnom, sekundarnom i ranom latentnom stadiju sifilisa, dok ga u kasnom stadiju gotovo nema. Nakon samo jednog kontakta s osobom koja ima rani sifilis vjerojatnost infekcije se kreće od 10%-60% (3,52). U svojoj



Slika 1. Smještaj mogućih virulentnih faktora na kromosomu *T. pallidum* (prema Weinstock i sur; 51)

studiji Schober je dokazao da je nakon kontakta s osobom koja ima primarni sifilis infekcija prenesena na 58% partnera, dok je u bolesnika sa sekundarnim sifilisom taj postotak iznosio 46% (53). Na prijenos infekcije utječe broj ekspozicija, tip seksualne aktivnosti te morfologija i distribucija lezija kod partnera oboljelog od sifilisa (54). U kasnom stadiju sifilisa mogućnost prijenosa je izuzetno niska i uglavnom se odnosi na transplacentarni prijenos od zaražene majke na plod (53). Vjerojatnost transplacentarnog prijenosa obrnuto je proporcionalna s duljinom trajanja infekcije (2). Ovdje valja napomenuti da je većina djece s kongenitalnim sifilisom zaražena *in utero*, ali novorođenčad može biti zaražena tijekom prolaza kroz porođajni kanal (5). Danas je prijenos infekcije transfuzijom gotovo isključen zbog redovitih obaveznih seroloških testiranja krvi davaoca, ali i zbog nemogućnosti da treponema preživi proces pohranjivanja krvi (3). Mogućnost prijenosa infekcije slučajnim ozljeđivanjem i inokulacijom iglom samo je teoretsko. Kod transplacentarnog prijenosa te u slučaju transfuzijskog ili prijenosa slučajnom inokulacijom nema primarne lezije. Ovaj oblik bolesti naziva se *syphilis d'emblee* (3). *T. pallidum* je osjetljiva na toplinu i isušivanje te na sapune i slabe dezinficijense tako da je prijenos preko predmeta gotovo nemoguć.

1.5. Klinička slika

Sifilis se u svome tijeku može manifestirati različitim kliničkim slikama koje su posljedica imunološkog odgovora domaćina na infekciju. Još od 19. stoljeća sifilis se dijeli na primarni, sekundarni i tercijarni stadij. Između svakog od ovih stadija postoji razdoblje bez kliničkih znakova bolesti (latentni sifilis), u kojem se bolest može otkriti samo na temelju pozitivnih seroloških testova (27,52,55). S obzirom na trajanje bolesti

razlikujemo rani i kasni sifilis. Pojmom ranog sifilisa, kojim se definira infekcija trajanja od jedne odnosno dvije godine (1,3,45), obuhvaćen je primarni i sekundarni sifilis te rani latentni stadij. Pojam kasni sifilis obuhvaća kasni stadij latencije i tercijarni sifilis (3,45).

Saznanja o prirodnom tijeku sifilisa temelje se na dvije studije provedene krajem 19. i sredinom 20. stoljeća (27). Naime, u studijama "Oslo" i "Tuskegee" osobe oboljele od sifilisa nisu bile podvrgnute nikakvoj terapiji već je praćen prirodni tijek bolesti (56-58).

1.5.1. Primarni stadij sifilisa

Nakon inkubacije od 9 do 90 dana (prosječno 3 tjedna), na mjestu ulaska *T. pallidum* nastaje tamno crvena makula koja prerasta u inflamiranu papulu te konačno u središtu papule nastane bezbolni ulkus (*ulcus durum*, primarni afekt, tvrdi čankir) (1,5). Ulkus je promjera od 1 do 2 cm, bezbolan, oštro ograničen, izdignut iznad razine kože s induriranim rubovima (59,60). Dno ulkusa je čisto, nepurulentno, a kad se ulceracija postranično stisne, dobije se serozni eksudat (tzv. podražajni serum) koji vrvi spirohetama (1), što predstavlja odraz lokalne proliferacije *T. pallidum* (3). Ulkus je okružen 1-2 mm širokim, izrazito eritematoznim rubom (2) (Slika 2). U 80% bolesnika prisutna je i regionalna, u početku unilateralna limfadenopatija (1,54), koja se u nešto većem postotku nađe u bolesnika s genitalnim lezijama (61). Lezije mogu biti solitarne, ali i multiple (61) (Slika 3), za koje se pretpostavlja da se javljaju češće u osoba s genitalnim herpesom (1). Rane papule se često previde, a također i manje ulceracije. *Ulcus durum* najčešće je lokaliziran na vanjskom spolovilu, i to u muškaraca na glansu penisa i koronarnom sulkusu, a u žena na velikim i malim stidnim usnama (Slika 4).



Slika 2. *Ulcus durum* na korpusu penisa



Slika 3. *Ulcus durum* – multiple lezije na penisu



Slika 4. *Ulcus durum* na stidnim usnama

Osim na navedenim lokalizacijama, u muškaraca se *ulcus durum* može naći i na prepuciju, perineumu, skrotumu, perianalnoj regiji, preponama te vanjskom ušću uretre, a u žena se mogu naći i na stražnjoj komisuri, klitorisu, otvoru uretre, dok su rjeđi vaginalni i cervikalni ulkusi, koji se i lakše previde. Kada su smješteni u području korijena penisa, nazivaju se i kondomski ulkusi (2,3). Poseban oblik primarnog afekta je *oedema indurativum*, koji se javlja češće u žena i to na velikim usnama, dok se u muškaraca nađe na prepuciju ili rjeđe na skrotumu. Manifestira se elefantijazom tj. oteklinom zahvaćenog područja (3). Ako se u bolesnika s ovakvim simptomima ne nađe lezija na spolovilu, postoji mogućnost da se lezija nalazi u mokraćnoj cijevi (3).

U oko 2%-5% bolesnika ulkus je smješten ekstragenitalno (54). Smještaj ekstragenitalnih lezija nije ograničen, već je ovisan o seksualnim navikama bolesnika. Najčešće su lokalizacije perianalna i rektalna regija te usta. U ustima ulkus je najčešće lokaliziran na usnicama, ali može biti smješten i na jeziku (Slika 5), bukalnoj sluznici te gingivi. Za razliku od genitalnih lezija, ovi su ulkusi bolni i nešto manje indurirani (1). *Ulcus durum* se može javiti i na prstima, i to češće u medicinskog osoblja (3).

Ako je neliječen, *ulcus durum* može trajati od 1-6 tjedana, nakon čega spontano nestaje ne ostavljajući ožiljak (62), dok uz provedenu terapiju epitelizira nakon 1-2 tjedna (1). Lokalna aplikacija antibiotika, imunodeficijencija ili lokalna infekcija mogu promijeniti kliničku sliku (62).

U 50% neliječenih bolesnika s primarnim sifilisom nastaje progresija u sekundarni stadij, dok ostalih 50% ulazi u stadij latencije (54).



Slika 5. *Ulcus durum* na jeziku

Dijagnoza se postavlja na temelju anamneze, prisutnosti primarne lezije i regionalne limfadenopatije. Od laboratorijskih pretraga radi se identifikacija *T. pallidum* tehnikom mikroskopiranja u tamnom polju, a testovi TPHA (od engl. *Treponema pallidum haemagglutination assay*) i VDRL (engl. *Venereal Disease Research Laboratory*)**,** koji su obično prve pozitivne serološke reakcije, postaju pozitivni obično 2-3 tjedna nakon pojave ulkusa (63).

Diferencijalnodijagnostički u obzir može doći *ulcus molle*, *herpes simplex*, erozivni balanitis, početni spinocelularni karcinom, ali i *ulcus mixtum* koji predstavlja istovremenu infekciju s uzročnikom sifilisa i uzročnikom *ulcus molle* (Slika 6) (3).

1.5.2. Sekundarni stadij sifilisa

Sekundarni stadij sifilisa započinje 9-10 tjedana nakon infekcije, odnosno 6-7 tjedana nakon pojave primarne lezije kao posljedica hematogenog i limfogenog rasapa *T. pallidum* (3). Simptomi sekundarnog sifilisa mogu biti vrlo raznoliki, mogu oponašati mnoge dermatoze te stoga u početku često biti neprepoznati (63). Najčešće su zahvaćeni koža i sluznice (oko 80%), ali mogu biti zahvaćeni i unutarnji organi (64).

Često nema oštre granice između primarnog i sekundarnog stadija sifilisa (6), a navodi se da u oko trećine bolesnika može doći do preklapanja (54). U oko 60% bolesnika sekundarni sifilis je prva manifestacija sifilisa jer primarni stadij prođe nezamijećen (5). Prije promjena na koži mogu se javiti opći, nespecifični simptomi poput vrućice, slabosti, grlobolje, rinoreje, mijalgija, glavobolje te generalizirane limfadenopatije, iako oni često izostanu. Specifični egzantemi i enantemi, poznati kao sifilidi, obično su prošireni, simetrični i bogati treponemama, osobito ako vlaže ili zahvaćaju sluznice (3).



Slika 6. *Ulcus mixtum* na korpusu penisa

Osip može biti makulozan, makulopapulozan, papulozan, papuloskvamozan i anularan, a mnogo rjeđe nodularan i pustulozan, dok su vezikulobulozne promjene prisutne samo u kongenitalnom sifilisu (65). Najranija manifestacija sekundarnog sifilisa na koži je makulozni sifilid, u starijim udžbenicima poznat kao *roseola syphilitica* (1), karakteriziran simetričnim osipom češće lokaliziranim na postraničnim dijelovima trupa (Slika 7) te na fleksornoj strani gornjih ekstremiteta; susrećemo ga u oko 10% bolesnika. Od dijagnostičkog je značaja makulozni osip dlanova i tabana (66).

Makulopapulozni osip koji predstavlja razvojnu fazu prema papuloznom sifilidu nađe se u više od 50% bolesnika sa sekundarnim sifilisom te je stoga oblik koji se u praksi najčešće prvi vidi (1). Lezije su lokalizirane na spolovilu, licu (*corona Veneris*), dlanovima i tabanima (Slika 8) (1,54).

Papulozni sifilid javlja se u oko 10% bolesnika sa sekundarnim sifilisom (1), a karakteriziran je pojavom čvrstih, oštro ograničenih papula ravnog vrha, često crvenkasto smećkaste boje s površinskim sjajem te se stoga često naziva lentikularni ili lihenoidni sifilid. Papule u ovoj fazi vrve treponemama (63). U nekih bolesnika na površini papula dolazi do stvaranja nježnih sjajnih ljusaka. Tada govorimo o pojavi papuloskvamoznog ili psorijaziformnog sifilida (2). Distribucija papuloznog i papuloskvamoznog sifilida slična je onoj u makuloznom obliku, pretežno na trupu (3). Promjene na dlanovima i tabanima mogu biti hiperkeratotične i mogu oponašati *tinea pedis* ili čak klavuse i veruke. Palmoplantarna lokalizacija vrlo često upućuje na pravilnu dijagnozu (3). Poseban oblik papula koje se javljaju u vlažnim i intertriginoznim područjima nazivaju se *condylomata lata*. Radi se o hipertrofičnim, granulomatoznim lezijama s erodiranom površinom kroz



Slika 7. Makulozni osip na trupu



Slika 8. Makulopapulozni osip na tabanima

koju se drenira tekućina izuzetno bogata treponemama. Stoga se *condylomata lata* smatraju najinfektivnijim lezijama (Slika 9) (3). Za razliku od drugih lezija, *condylomata lata* mogu perzistirati mjesecima. Najčešće su smješteni na labijama, analnoj brazdi i prepuciju (3).

U rjeđe oblike sekundarnog sifilisa ubrajaju se pustulozni sifilid koji započinje kao pustula koja se osuši te nastaje krusta, te ulcerirajući sifilid kod kojeg dolazi do pojave ulcerirajućih lezija koje zarastaju s ožiljkom (4).

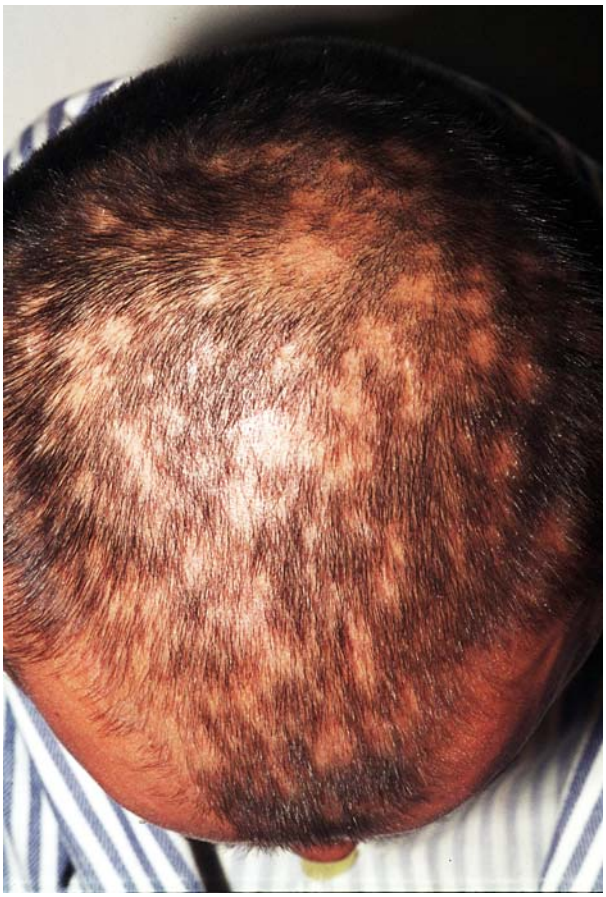
Maligni sifilid (*lues maligna*, *rupia syphilitica*) vrlo je rijetki oblik koji se najčešće javlja u bolesnika s imunodeficijencijom, a karakteriziran je nastankom dubokog ulkusa s debelom nečistom krustom, mekanih rubova. Čelo i vrat su predilekcijska mjesta, a pojava lezija na sluznici usne šupljine praćena je teškim općim simptomima. Ovaj oblik je češći u HIV inficiranih te u drugih imunosuprimiranih bolesnika (67).

Hiperpigmentacije i hipopigmentacije nastaju nakon regresije sifilitičnih lezija. Papuloskvamozne lezije regrediraju ili s hipopigmentacijama ili hiperpigmentacijama, dok je u određenog broja bolesnika moguće oboje. *Leukoderma syphiliticum* najčešća je na lateralnim stranama vrata (tzv. Venerina ogrlica). Hiperpigmentacije su obično tamno smeđe boje te nalikuju na *lichen planus* (3).

Poremećaj rasta kose može se očitovati žarišnom alopecijom (*alopecia syphilitica*) (Slika 10) ili potpunim gubitkom kose (68). Ovi se simptomi javljaju dosta kasno, obično 8-12 tjedana nakon prvih znakova sekudnarnog sifilisa. Gubitak kose može slijediti distribuciju prethodnog egzantema (3). Pregledom se mogu utvrditi žućkasto-crvenkasta žarišta alopecije (znak upale) koja mogu konfluirati i dati dojam izjedenosti od moljaca (4). I druga kosom obrasla područja mogu biti zahvaćena (3,68). Do gubitka dlaka dolazi uslijed toksičkog djelovanja treponema na folikule vlasi, kao što se to događa i u drugih



Slika 9. *Condylomata lata* u perianalnoj regiji i *ulcus durum* na skrotumu



Slika 10. *Alopecia syphilitica* na vlasištu

infekcija praćenih povišenom temperaturom (30). Uslijed oštećenja matriksa nokta promjene se mogu javiti i na noktima. Opisani su oniholiza, distrofija, paronihija kao i druge promjene na noktima (3).

Oko jedne trećina bolesnika ima promjene na sluznici usne šupljine u vidu mukoznih sifilida (5). Zbog macerirajućeg djelovanja sline, makule se ubrzo pretvaraju u mukozne plakove sivkaste boje koje su vrlo bogate treponemama te stoga i izuzetno zarazne (3).

Sifilitička angina, odnosno upala farinksa i tonzila tipična je za sekundarni sifilis, a odraz je limfadenopatije koja je udružena sa sekundarnim stadijem sifilisa (1). Tonzile su otečene, crvene, bolne i prekrivene sivkastim naslagama zbog maceracije slinom (5). Promjene su obično u početku unilateralne i udružene s unilateralnom cervikalnom limfadenopatijom (60).

Svi bolesnici sa sekundarnim sifilisom, osim onih s malignim sifilidom, imaju difuznu limfadenopatiju poznatu kao poliskleradenitis (1).

Oko 40% do 50% bolesnika ima neke od znakova da je zahvaćen SŽS, primjerice tvrdi vrat ili glavobolju. Većina ovih bolesnika ima patološki nalaz likvora, i to u vidu povišenih proteina, limfocitoze te pozitivnih seroloških testova. S obzirom na mogućnost nastanka kasnih komplikacija u vidu neurosifilisa, patološke nalaze likvora treba uzeti s osobitim oprezom (62).

U okviru sistemskih manifestacija mogu se javiti artralgije te bolovi u dugim kostima, koji su, najvjerojatnije, odraz subkliničkog periostitisa (70). Od rjeđih manifestacija mogu se javiti anoreksija, mučnina, povremeno povraćanje, erozivni gastritis (71), hepatitis (72), hepatomegalija bez hepatitisa (73), splenomegalija, intersticijalna pulmonarna fibroza (74), meningitis, glavobolje, periferna neuropatija (66),

perceptivna gluhoća (75) te Menierova bolest (1,76). Kao rijetka manifestacija opisan je sifilis bubrega (77), brzo progresivni glomerulonefritis (78) te parotitis (79). Na oku sifilis može uzrokovati episkleritis, skleritis, intersticijski keratitis, vitritis, stražnji uveitis (80-82), oštećenje očnog živca i poremećaj pokretljivosti oka (81).

U sekundarnom sifilisu moguć je širok spektar diferencijalnih dijagnoza. Makulozni sifilid može oponašati ospice (tzv. Kielske ospice), ali i bilo koji od egzantema virusne etiologije (uključujući i primarni stadij HIV-a) te šarlah, *pityriasis rosea*, kao i medikamentozni egzantem. Kod papuloznog sifilida potrebno je isključiti *lichen planus*, a kod papuloskvamoznog sifilida psorijazu te *pityriasis lichenoides chronica*. Diferencijalnodijagnostički *condylomata lata* treba razlikovati od *condylomata acuminata*. Kod alopecije diferencijalnodijagnostički dolazi u obzir alopecija areata druge etiologije. Kod potpuno razvijenih promjena na sluznici usne šupljine gotovo da i nema diferencijalne dijagnoze. U bolesnika s hiperpigmentacijama i hipopigmentacijama treba isključiti *pityriasis versicolor* i psorijatičku leukodermu (3,30).

Dijagnoza sekundarnog sifilisa postavlja se na temelju anamneze, kliničke slike, nalaza treponeme te seroloških nalaza koji su u vrijeme izbijanja egzantema svi pozitivni.

1.5.3. Latentni stadij sifilisa

Između klinički jasnih stadija sifilisa prisutni su stadiji latentne (inaktivne) infekcije. U tom razdoblju ne nalazi se tipičnih manifestacija na koži ili bilo kojih drugih kliničkih simptoma, ali su treponeme još uvijek aktivne te se repliciraju (84).

Uslijed imunološkog odgovora organizma aktivnost treponema se potiskuje te nestaju klinički znakovi. Serološke reakcije, i to specifične, a rjeđe nespecifične su

pozitivne. Distinkcija između ranog i kasnog latentnog sifilisa sastoji se u tome što je bolesnik u ranom latentnom stadiju infektivan, odnosno što spolnim kontaktom može prenijeti bolest, dok se bolest u kasnom latentnom stadiju može prenijeti samo transplacentarno (3). Tijekom ranog latentnog razoblja može doći do recidiva egzantema koji mogu biti makulozni, lihenificirani ili korimbiformni. Za razliku od onih u sekundarnom sifilisu, nisu simetrični, morfe su različite veličine, a sklone su grupiranju. Mogu se pojaviti i znakovi meningitisa (56).

U literaturi se kao podvrsta latentnog sifilisa spominje *syphilis incognito* koji se otkriva tek rutinskim serološkim pretragama. Ovaj oblik je zapravo posljedica ili primjene antibiotske terapije u ranom stadiju ali zbog druge indikacije, ili pak može biti rezultat previda primarnog ili neprepoznavanja sekundarnog stadija sifilisa (85).

1.5.4. Tercijarni stadij sifilisa

Manifestacije tercijarnog sifilisa mogu se pojaviti nakon 10, 20 ili još više godina, ali i znatno ranije (3). Danas je ovaj stadij vrlo rijedak, a javlja se u manjeg broja neliječenih ili neadekvatno liječenih bolesnika (63).

Kliničke promjene u ovom stadiju mogu se manifestirati promjenama na koži i sluznicama te promjenama na drugim organima, prvenstveno kardiovaskularnom i središnjem živčanom sustavu. Promjene na koži i sluznicama javljaju se u obliku tuberoznih i nodularnih sifilida te guma (2). Tipične promjene kod tuberoznog sifilida sastoje se od grupiranih papula, crvenkasto-smećkaste boje s minimalnim ljuskanjem na površini (1). Žarišta su često anularnog oblika, s centralnom atrofijom uz hipopigmentacije ili hiperpigmentacije te perifernom progresijom (59). Promjene su

najčešće smještene na licu i u vlasištu. Kada lezije perifernim širenjem dobiju vijugavi izgled, nazivaju se tuberoserpiginozni sifilid (Slika 11), a kada se pojave i ulceracije nekrotična dna, nazivaju se ulcerotuberoserpiginozni sifilidi (3). Gume ili subkutani sifilidi su subkutani nodusi u kojima se može dokazati prisutnost treponeme. Nodusi se postupno povećavaju, sraštavaju s fascijom i s kožom, koja na tom mjestu postaje lividno crvene do smeđe boje, zadebljanog i gumastog izgleda (27). Zbog pojave centralne nekroze dolazi do fluktuacije, a potom i perforacije, odnosno nastanka ulkusa koji je često bubrežasta oblika (54). Ulkusi kroz nekoliko mjeseci zacjeljuju hipopigmentiranim ožiljkom okruženim tamnim rubom (3). Gume mogu nastati bilo gdje, obično su bezbolne i nisu udružene s limfadenopatijom. S obzirom na razinu destrukcije, mogu zahvatiti periost i kost. Najčešće nastaju na čelu, vlasištu, usnicama (Slika 12), vratu, genitalnom području i potkoljenicama (3). Opisana je i pojava lezija na mekom nepcu (86).

Na drugim organskim sustavima tercijarni sifilis se najčešće očituje na kardiovaskularnom sustavu, kostima i u SŽS-u (2). Najčešća manifestacija kardiovaskularnog sifilisa je sifilitički aortitis koji zahvaća ascendentnu aortu (87). Najznačajnija promjena na krvnim žilama je granulomatozna upala medije aorte, što dovodi do vrećaste aneurizme. U bolesnika se nalazi i endarteritis koronarnih žila, što je potom udruženo sa stenozom ušća koronarnih arterija. Gume lokalizirane u kardiovaskularnom sustavu mogu dovesti do poremećaja srčanog provođenja te do rupture papilarnih mišića (3).

Zahvaćenost SŽS-a u tercijarnom sifilisu (neurosifilis) može se podijeliti na meningovaskularne bolesti, koje obično nastaju 5-10 godina nakon sekundarnog stadija



Slika 11. Tuberoserpiginozni sifilid u području lakatne jame



Slika 12. Guma na donjoj usnici

sifilisa, i na parenhimatozne bolesti, koje nastaju desetljećima kasnije (3). Meningovaskularni sifilis može se prezentirati različitim znakovima kao što su povišenje intrakranijalnog tlaka, znakovi ishemije SŽS-a, gubitak funkcije kranijalnih živaca, hemiparaliza ili afazija i sl. (5). Parenhimatozni sifilis obuhvaća *tabes dorsalis* i progresivnu paralizu, što uključuje invaziju živčanog sustava *T. pallidum* uz oslabljeni imunološki odgovor (1). Progresivna paraliza nastaje zbog destrukcije korteksa, a karakterizirana je neurološkim i psihijatrijskim poremećajima. *Tabes dorsalis* manifestira se lokomotornom ataksijom, parestezijama, nedostatkom dubokih refleksa i drugim neurološkim znakovima (2).

Gume se mogu naći i u plućima, probavnom traktu, a također na tvrdom nepcu i na dugim kostima (3).

Dijagnoza se postavlja na temelju kliničke slike, seroloških pretraga, kao i pretraga likvora, histološkog nalaza, te internističke i neurološke obrade.

Diferencijalnodijagnostički kod tuberoznih sifilida treba isključiti lupoznu tuberkulozu, sarkoidozu, aktinomikozu i karcinom. Kod gume potrebno je isključiti *tuberculosis cutis colliquativa*, *panniculitis*, maligne limfome, aktinomikozu.

1.5.5. Kongenitalni sifilis

Kongenitalni sifilis nastaje kao posljedica prodiranja *T. pallidum* od zaražene majke na plod, najčešće nakon prvog trimestra trudnoće (3,88), iako su neka novija istraživanja amnionske tekućine PCR-om dokazala da *T. pallidum* prodire do ploda već u 9-10. tjednu trudnoće (89). Bolest se iznimno rijetko može prenijeti tijekom poroda i to kontaktom s lezijom u području genitalnog trakta (90), dok se dojenjem može prenijeti samo ako se

primarna lezija nalazi u području bradavice dojke (89). Klinička slika, odnosno ishod trudnoće ovisi o vremenu kao i o masivnosti infekcije (88,90). Ako trudnica s primarnim ili sekundarnim stadijem sifilisa uopće nije ili nije adekvatno liječena, u gotovo svim slučajevima dolazi do infekcije ploda (91). Neliječeni sifilis u trudnoći može dovesti do pobačaja, rođenja mrtvog djeteta, restrikcije intrauterinog rasta, prijevremenog poroda kao i perinatalne smrti (89). Oko 60% inficirane djece nema simptome kod poroda, a ako ostanu neotkriveni i ne započne se liječenje, simptomi se razviju tijekom prvih tjedana, mjeseci ili godina života (90).

Treponema prodire direktno u fetalnu cirkulaciju pa je kongenitalni sifilis karakteriziran izostankom primarnog stadija. Kongenitalni sifilis se dijeli na rani koji se dijagnosticira tijekom prve dvije godine života i kasni kongenitalni sifilis koji se dijagnosticira nakon druge godine života (1).

Za rani kongenitalni sifilis karakteristični su, između ostalog, prijevremeni porod, niska porođajna težina, hepatosplenomegalija, anemija, žutica, trombocitopenija, blijeda i naborana koža, rinitis i pseudoparaliza (2,3,14,88). Jedan od najranijih simptoma je nazalni iscjedak izuzetno bogat treponemama. Mogu se javiti i vezikulobulozne promjene na dlanovima i tabanima koje su izrazito karakteristične za kongenitalni sifilis (14).

Kasni kongenitalni sifilis odgovara simptomima tercijarnog sifilisa, a njegove se manifestacije mogu podijeliti u malformacije ili *stigma* i aktivne patološke procese. *Stigma* predstavljaju ožiljke nastale kao posljedica lezija u ranom kongenitalnom sifilisu ili su posljedica trajnog upalnog procesa. Karakteristični su Hutchinsonovi zubi, molari koji podsjećaju na plod duda, intersticijalni keratitis, mentalna retardacija, atrofija očnog živca, izbočenje frontalne kosti, sedlast nos, izbočene mandibule, sabljaste tibije i Cluttonovi zglobovi (90).

Smatra se da je SŽS zahvaćen u 60% bolesnika s kongenitalnim siflisom. To se dijagnosticira pozitivnim testom VDRL, pleocitozom i povišenim sadržajem proteina u likvoru (95,96).

Dijagnoza se postavlja na temelju kliničke slike kongenitalnog sifilisa u djeteta uz pozitivne treponemske i netreponemske testove u majke. Ako nema kliničkih znakova sifilisa u djeteta, dijagnoza se postavlja na temelju pozitivnih seroloških testova u djeteta i majke te na temelju anamnestičkih podataka o bolesti majke. U dijagnozi osobitu važnost ima određivanje specifičnih IgM protutijela u djeteta. Sukladno smjernicama Centra za kontrolu bolesti(CDC, engl. *Center for disease control*) u SAD-u, suspektnim slučajem kongenitalnog sifilisa smatra se svako dijete rođeno od majke s neliječenim ili neadekvatno liječenim sifilisom kod poroda, bez obzira na klinički nalaz u djeteta, a također i djeca s prisutnim kliničkim znacima (92-94).

Kao i u ostalih oblika sifilisa, i ovdje se nameće problem neadekvatnog prijavljivanja slučajeva kongenitalnog sifilisa, kako ranog, tako i kasnog, a u skladu sa suvremenom definicijom i klasifikacijom kongenitalnog sifilisa (96).

Radi prevencije kongenitalnog sifilisa danas se savjetuje testiranje na sifilis u prvom trimestru trudnoće te kod poroda (97). S obzirom da se djeca ne rađaju uvijek sa znacima i simptomima kongenitalnog sifilisa, testiranje se preporuča učiniti u djece s povišenom temperaturom, aseptičkim meningitisom, hepatosplenomegalijom, hematološkim abnormalnostima, pa čak i ako su prethodni testovi bili negativni.

1.5.6. Sifilis i infekcija HIV-om

Prema nekim autorima smatra se da više od 50% bolesnika zaraženih sifilisom istovremeno boluje od još jedne spolno prenosive bolesti, od kojih oko 25% HIV pozitivnih bolesnika (98). Međutim, niti jedna od njih ne privlači toliko pozornosti koliko istovremena infekcija *T. pallidum* i HIV-om zato što može znatno promijeniti kliničku sliku i tijek bolesti, što otežava postavljanje dijagnoze bolesti. Atipične kliničke manifestacije sifilisa poput pojavljivanja *ulcus durum* u sekundarnom stadiju sifilisa (98) mogu biti prvi znak infekcije HIV-om (99). Na istovremenu infekciju HIV-om treba pomisiliti ako izostane odgovor na terapiju preporučenim dozama penicilina (100,101), ako neurosifilis (osobitno u meningo-vaskularnom obliku) nastane nekoliko mjeseci nakon infekcije ili nakon provedene terapije (102), te kad je prisutan *lues maligna*, koji je u ovih bolesnika šezdeset puta češći (103). U ovih bolesnika prisutna je i specifična abnormalnost u serološkim testovima, tj. ili su testovi lažno negativni ili su u reaktivnih bolesnika prisutni u visokom titru (99). Prije ere infekcije HIV-om vjerovalo se da negativni treponemski testovi isključuju sifilis. U svih bolesnika sa sifilisom preporuča se učiniti i testiranje na HIV (3), a u bolesnika s HIV-om preporuča se učiniti punkciju likvora (103). U sekundarnom stadiju mogu biti negativni reaginski testovi poput VDRL-a (100), što se češće i sreće u HIV pozitivnih bolesnika (103).

1.6. Dijagnostika sifilisa

Dijagnoza sifilisa postavlja se na temelju anamneze, kliničke slike, a potvrđuje direktnim i indirektnim metodama za dokazivanje *T. pallidum* (1,3,44). U razaznavanju

kliničke slike sifilisa uloga dermatologa je velika. Sifilis je zbog raznolikosti kliničkih slika nazivan "velikim imitatorom". Još je sir William Osler rekao da "onaj koji poznaje sifilis zna cijelu medicinu" (1). S obzirom na nemogućnost uzgoja *T. pallidum*, za dokazivanje uzročnika koriste se druge laboratorijske metode, i to direktne i indirektne metode (48). U direktne metode ubrajaju se patohistološka pretraga, detekcija živih *T. pallidum* tehnikom mikroskopiranja u tamnom polju te identifikacija gena *T. pallidum* metodom PCR. U indirektne metode ubrajaju se serološke pretrage koje se dijele na nespecifične (netreponemske) i specifične (treponemske) (11).

1.6.1. Direktne metode dokazivanja *T. pallidum*

1.6.1.1. Patohistološki nalaz

Patohistološki nalaz nije od većeg značenja u dijagnostici sifilisa, međutim važno ga je poznavati da bi se prepoznao kao slučajan nalaz (2). Temeljna patološka promjena i u ranom i u kasnom sifilisu pojava je perivaskularnih infiltrata limfocita i plazma stanica u i oko krvnih žila, udruženih s proliferacijom intime u arterijama i venama (2,3,49), dok je u gumi temeljna lezija granulomatozna upala (5).

1.6.1.2. Dokazivanje *T. pallidum* tehnikom mikroskopiranja u tamnom polju

Dokazivanjem *T. pallidum* tehnikom mikroskopiranja u tamnom polju uzoraka uzetih iz suspektnih lezija može se gotovo s potpunom sigurnošću dijagnosticirati sifilis u primarnom i sekundarnom sifilisu. Uzorak za pretragu u tamnom polju najčešće se uzima

iz kliničkih lezija bogatih uzročnikom poput *ulcus durum*, *condylomata lata* ili mukoznih ploča (1,62). U rjeđim slučajevima uzorak može biti uzet aspiracijom iz regionalnih limfnih čvorova, cerviksa i vagine (3,44). Ne preporuča se uzeti uzorke za ovu pretragu sa sluznice usne šupljine zbog mogućeg nalaza nepatogenih treponema (105).

U tamnom polju mikroskopa *T. pallidum* se vidi kao blijedi, spiralni mikroorganizam s pravilnim urezima i navojima koji se razlikuje od drugih spiroheta po kretanju u obliku slova "L" (pod kutom od 90 stupnjeva) te po tome što se ne može samostalno gibati. Da bismo izbjegli lažno pozitivne rezultate, prije pretrage potrebno je izbjegavati bilo kakvu lokalnu terapiju kao i peroralnu antibiotsku terapiju (105). Kao posljedica prisutnosti nepatogenih spiroheta, osobito u oralnim i analnim uzorcima, mogući su lažno pozitivni rezultati (105). Pozitivan rezultat, tj. dokaz treponema u tamnom polju definitivno potvrđuje dijagnozu, dok negativan rezlutat ne isključuje dijagnozu sifilisa. Negativan nalaz može biti odraz prisutnosti malog broja treponema, što se događa u fazi cijeljenja lezije, ili u slučaju ako su spirohete izmijenjene sistemskom ili lokalnom terapijom. Za ovu metodu od osobitog je značenja izvježbanost i iskustvo osoba koje izvode test (105,106).

1.6.1.3. Dokazivanje *T. pallidum* pomoću direktne fluorescentne metode

Indikacije kao i način uzimanja uzoraka za test istovjetni su onom za mikroskopiranje u tamnom polju (44). Za ovaj test nisu potrebni svježi preparati, što predstavlja prednost u usporedi s mikroskopiranjem u tamnom polju. Prednost ove metode je i u mogućnosti razlikovanja patogenih od nepatogenih treponema pomoću reakcije antigen-antitijelo, te je stoga osobito pogodna za pregledavanje uzoraka iz usne

šupljine i analnog područja (107). Kao i kod mikroskopiranja u tamnom polju, negativan rezultat ne isključuje dijagnozu sifilisa, dok je u slučaju pozitivnog rezultata osjetljivost gotovo 100% (108). Modifikacija ove metode može se koristiti i za dokazivanje *T. pallidum* u tkivu bolesnika, i to iz već prethodno učinjenih parafinskih rezova (108,109).

1.6.1.4. Uzgoj *T. pallidum* u životinjama

Kultivacija uzročnika u životinjama u literaturi je poznata pod skraćenicom RIT (od engl. *rabbit infectivity test*). Ovo je najstarija ali i najsenzitivnija metoda za dokazivanje treponema i predstavlja zlatni standard za određivanje osjetljivosti novih dijagnostičkih metoda poput PCR-a (109). Najpogodnija pokusna životinja za inokulaciju je kunić u kojeg se uzročnik najčešće inokulira intratestikularno, ali može i intradermalno, intravenozno ili okularno (110). Inokulirati se mogu različite vrste uzoraka (serum, likvor, eksudat lezije…), uz uvjet da nisu starije od 1 sat ili da su odmah po uzimanju zamrznute na temperaturi od –80^{o}C. Razdoblje inkubacije u kuniću od inokulacije do nastanka lezije, odnosno infekcije obrnuto je proporcionalno veličini inokuluma (44). Osjetljivost metode RIT doseže 100%, ako je broj treponema viši od 23 a bolesnik nije dobio antibiotsku terapiju. Nedostatak metode je dugo trajanje pretrage te zahtjevnost u izradi (osoblje i financije) (44).

1.6.1.5. Dokazivanje gena *T. pallidum* metodom PCR

Lančana reakcija polimerazom (PCR) zasniva se na umnažanju dijelova DNA pomoću enzima DNA-ovisne-DNA-polimeraze iz bakterije *Thermus aquaticus* (tzv. *Taq*-polimeraza) (111). Za reakciju je potrebno odabrati oligonukleotidne nizove koji su komplementarni krajevima DNA koje želimo umnožiti, odnosno moraju nam biti poznati nizovi baza koji omeđuju dio DNA koji se želi umnožiti. Ti slijedovi koriste se za sintezu početnih oligonukleotida za sintezu DNA (111,112).

U standardnu reakciju dodaju se dvije oligonukleotidne početnice, jedna komplementarna kodirajućem, a druga nekodirajućem lancu DNA. Te se početnice pri određenim uvjetima temperature vezuju na komplementarne dijelove DNA (faza sparivanja, odnosno hibridizacije). U prisutnosti enzima *Taq*-polimeraze, odgovarajuće koncentracije $MgCl_2$ i deoksiribonukleotida (dNTP), dolazi do sinteze DNA (faza produžavanja), u kojoj oligonukleotidni slijed služi kao početnica, a DNA kao kalup. Na taj način željeni se odsječak DNA, ako se nalazi u uzorku, umnoži, a njegova prisutnost odredi se npr. elektroforezom u gelu agaroze. Korištenjem biljega veličine DNA, moguće je odrediti odgovara li veličina dobivenog produkta onoj koja se očekuje, tj. da li je produkt uopće prisutan (111).

Metoda PCR pokazala se kao vrlo dobro sredstvo za detekciju bakterijskih infekcija, s tendencijom da zamijeni dosadašnje standardne metode izolacije bakterija uzgojem na hranjivim podlogama i druge. Dokazano je da su molekularne metode koje se zasnivaju na umnažanju nukleinskih kiselina daleko superiornije po osjetljivosti i specifičnosti u odnosu na sve ostale navedene metode. Pomoću metode PCR, moguće je detektirati vrlo male količine bakterija (112).

Molekularne metode naročito su zanimljive za detekciju *T. pallidum* zbog nemogućnosti uzgajanja treponeme na podlozi za rast te dugotrajnog uzgoja u kunićima. Do sada je razvijeno više različitih testova koji se temelje na PCR-u. Većina se testova temelji na umnažanju gena za membranske proteine, čiji je slijed nukleotida poznat (44). Prva dva testa su opisana gotovo istovremeno. Prvi se temeljio na amplifikaciji 658 pb segmenta gena za 47-kDa površinski antigen – protein koji je antigeno dominantan u imunološkom odgovoru na *T. pallidum*, a primijenjen je za dijagnostiku kongenitalnog sifilisa u novorođenčeta (18). Drugi test temeljio se na amplifikaciji gena za 39-kDa membranski protein, a primjenio se u dijagnostici neurosifilisa (19). U novije vrijeme je razvijena i metoda bazirana na umnažanju dijela gena za DNA polimerazu I *T. pallidum*, koji ne pokazuje homologiju sa sličnim genima iz dosad proučenih mikroorganizama te je dovoljno specifična i osjetljiva za detekciju *T. pallidum* u različitim uzorcima (krv, cerebrospinalni likvor, amnijska tekućina, genitalni čirevi….). U reakciji se umnaža fragment veličine 377 pb. Međutim, nedostatak svih ovih testova je da se ne mogu razlikovati žive treponema od mrtvih organizama (44).

1.6.2. Indirektne metode

Gotovo niti u jednoj zaraznoj bolesti indirektne, serološke metode pretrage nisu od tolike važnosti kao u otkrivanju i praćenju sifilisa. Kao što je već prethodno navedeno, s obzirom na tip antigena ove testove dijelimo na netreponemske (nespecifične) i treponemske (specifične) testove. U netreponemskim testovima kao antigen služi kardiolipin, dok je u treponemskim testovima antigen blijeda treponema.

1.6.2.1. Netreponemski testovi

1.6.2.1.1. Test VDRL

VDRL (engl. *Venereal Disease Research Laboratory)* je flokulacijski test, koji danas predstavlja najčešće upotrebljavani nespecifičan test u kojem se antigen sastoji od kardiolipina, lecitina i kolesterola (3). Nakon inkubacije antigena i seruma, odnosno likvora na 56^{o}C, dolazi do stvaranja flokula u kontaktu s kardiolipinom, kolesterolom i lecitinom (113). Rezultat se očitava svjetlosnim mikroskopom kao nereaktivan, slabo reaktivan i reaktivan (1). Reaktivan rezultat se dalje obrađuje kvantitativno, serijskim razrjeđenjem (1). Test postaje pozitivan 4-5 tjedana nakon infekcije. Tijekom prve godine nakon infekcije, ako je pravodobno započeta terapija, moguća je negativizacija testa (61). Ako visoki titar perzistira i nakon provedene terapije, treba isključiti neurosifilis (2). U vrlo ranoj fazi infekcije test može biti lažno negativan, dok je u oko 2% bolesnika sa sekundarnim sifilisom negativan nalaz rezultat "prozonskog fenomena" tj. nemogućnosti stvaranja kompleksa antigen-antitijelo potrebnog za vizualizaciju flokulacije u nerazrjeđenom serumu, a uslijed vrlo visokog titra protutijela (114). Treba naglasiti da test VDRL može biti lažno pozitivan u starijih osoba, u trudnoći, kod nekih bolesti vezivnog tkiva, malignih i infektivnih bolesti (114,115). Prednost ovog testa je u njegovoj niskoj cijeni i u činjenici da su materijal i tehnika izvođenja standardizirani u svijetu, što omogućava usporedivost. Ovim testom mogu se dokazivati protutijela i u serumu i u likvoru bolesnika. Osim toga, test je vrlo praktičan kao test otkrivanja sifilisa jer se može izraditi za jedan sat (62).

1.6.2.1.2. Test RPR

Test RPR (od engl. *rapid plasma reagin*) brzi je orijentacijski test kojim se dokazuju protulipidna protutijela. Upotrebljava se uglavnom kada je potrebno brzo pregledati veliki broj seruma. Ovaj test je modificirani test VDRL, u kojem se, radi lakšeg očitavanja, dodaju komadići drvenog ugljena te se takve flokule mogu očitavati bez pomoći mikroskopa (116). Ovaj test pogodan je za dokazivanje protutijela u serumu bolesnika, a nije pogodan za obradu likvora (1,3).

1.6.2.2. Treponemski testovi

Kao antigeni u ovim testovima služe ili cijele *T. pallidum* ili njihovi fragmenti. Usljed visoke osjetljivosti ovih testova, koja omogućava otkrivanje vrlo malog broja protutijela, s visokom sigurnošću potvrđujemo vjerojatnost treponemske infekcije. No, ovi testovi nisu pogodni za praćenje aktivnosti bolesti jer ne razlikuju aktivnu i prethodnu infekciju.

1.6.2.2.1. Test TPHA

Test TPHA (od engl. *Treponema pallidum haemagglutination assay*) jest standardizirani test za utvrđivanje protutijela usmjerenih protiv blijede treponeme u serumu bolesnika metodom aglutinacije senzibiliziranih ovčjih eritrocita (117). TPHA se temelji na relativno jednostavnom postupku hemaglutinacije, a pomoću njega može se obraditi veliki broj uzoraka (118). Prednost testa pred drugim specifičnim testovima je

jednostavnost, standardiziranost te komercijalna priprema (119). Test se smatra reaktivnim ako do aglutinacije dođe u razrjeđenju od 1:80 ili višem. Titar u gotovo svih bolesnika ostaje pozitivan i nakon pravilno provedene terapije (120). Ovaj test je vrlo osjetljiv, visoko specifičan, a odraz je prisutnosti IgG i IgM protutijela usmjerenih protiv *T. pallidum* (121). Postaje pozitivan već treći tjedan nakon infekcije. Lažno pozitivni rezultati mogu se naći u oko 1% nezaražene populacije, a mogu biti posljedica križne reakcije s *Borrelia burgdorferi* (122), ali i autoimunih bolesti vezivnog tkiva, nekih virusnih infekcija i u trudnoći (88).

1.6.2.2.2. Test FTA-ABS

U testu FTA-ABS (od engl. *fluorescent treponemal antibody-absorption*), metodom indirektne imunofluorescencije dokazuje se prisustvo treponemskih protutijela u serumu (123). Prije izvođenja testa iz seruma bolesnika se pomoću sorbenta koji sadrži Reiterove (nepatogene) treponeme apsorbiraju nespecifični treponemski antigeni (ABS). Kao antigen upotrebljavaju se *T. pallidum* iz orhitičnih testisa žrtvovanog kunića. Ako se u serumu bolesnika nalaze protutijela, ona se vežu s treponemom. Ovome se doda FITC-om označeni antihumani imunoglobulini (IgM i IgG klase). Kao rezultat, u vidnom polju fluorescentnog mikroskopa vide se spirohete obojene FITC-om (1,44). Intenzitet fluorescencije označava se kao nereaktivan (-), slabo reaktivan (+/-) i reaktivan (+). Reaktivni serumi se dalje obrađuju kvantitativno da bi im se odredio titar (62). Test postaje pozitivan 4. tjedna nakon infekcije (3). Lažno negativni rezultati su iznimno rijetki, dok se lažno pozitivni mogu javiti uz različite akutne i kronične bolesti poput sistemskog lupus eritematozusa, reumatoidnog artritisa, *diabetes mellitus*-a, reuma

faktora, genitalnog herpes simpleksa ili uslijed križne reakcije s *Borrelia burgdorferi* (122). Kao i kod ostalih imunofluorescentnih testova, negativna je strana ovog testa što rezultat može biti djelomično subjektivan. Kada rezultat jedanput postane pozitivan, gotovo uvijek ostaje reaktivan tijekom čitava života.

1.6.2.2.3. Test 19S-IgM-FTA-ABS

Test 19S-IgM-FTA-ABS visoko je specifičan test za koji se smatra da je pozitivan samo kada su u organizmu prisutne blijede treponeme (124). Ovaj test se ne primjenjuje rutinski već samo za diferencijaciju nejasnih slučajeva, za dijagnostiku kongenitalnog sifilisa te za praćenje aktivnosti bolesti (125). S obzirom na to da je molekula IgM velika i da ne može prijeći placentarnu barijeru, dokaz IgM u serumu novorođenčeta govori u prilog aktivnoj infekciji, a prisutna IgG protutijela prenesena su u fetalnu cirkulaciju iz cirkulacije majke te se negativiziraju tijekom prve godine života (126). Za izvođenje ovog testa potrebno je prvotno izolirati IgM frakciju iz seruma tehnikom filtracije u gelu primjenom sefadeksa G-200, nakon čega se izvodi test FTA-ABS s čistom IgM frakcijom (125). Ovaj test postaje pozitivan krajem drugog tjedna od početka infekcije, dok IgM protutijela nestaju obično nakon 6, a najkasnije 12 mjeseci nakon provedene terapije (62).

1.6.2.2.4. Test ELISA

U testu ELISA (od engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) protutijela usmjerena protiv *T. pallidum* vežu se na antigen na jažicama mikrotitarskih ploča te se inkubiraju s protutijelima usmjerenim protiv imunoglobulina čovjeka, a koji je obilježen

peroksidazom. Razvijeni su različiti tipovi testova ELISA u kojima su kao antigen upotrebljavani aksijalni filament spirohete *T. phagadenis* biotip *Reiteri*, kardiolipin, kolesterol i lecitin kao i sonikat purificirane *T. pallidum* (127). Specifičnost i osjetljivost prvobitnih testova ELISA jednaka je onoj kod testova TPHA i FTA-ABS pa je, kao i u tim metodama, suboptimalna u primarnom i kongenitalnom sifilisu (128). Novi testovi ELISA temeljeni su na novim rekombinantnim antigenima i imaju visoku specifičnost i osjetljivost te mogu otkriti IgM i IgG klase imunoglubulina u serumu bolesnika u svim stadijima bolesti (128). Ograničenje testa su vrijeme i cijena, dok je prednost mogućnost obrade velikog broja uzoraka te automatizirano očitavanje rezultata. Stoga očitavanje testa nije subjektivno kao što to može biti kod FTA-ABS i TPHA (44). Neki autori savjetuju uključivanje testa ELISA u testove otkrivanja (129,130).

1.6.2.2.5. Test ITP

Imobilizacija *T. pallidum* (ITP) prvi je specifični treponemski test. Ovaj test je niz godina predstavljao standard prema kojem su uspoređivani svi specifični treponemski testovi. Temelji se na principu imobilizacije *T. pallidum* Nicholsovog soja (kao antigenu uzgojenom u orhitičnim testisima kunića) u zaraženom serumu bolesnika sa specifičnim protutijelima uz prisustvo komplementa. Rezultat se očitava tehnikom mikroskopiranja u tamnom polju (131). Ovaj test se smatra najspecifičnijim serološkim testom. Međutim, budući da je njegovo izvođenje složeno i zahtjevno (uzgajanje kunića u koje se inokulira *T. pallidum*), danas ga izvode samo rijetki istraživački laboratoriji. Test postaje pozitivan 6-8 tjedana nakon infekcije.

1.7. Dijagnostika sifilisa i stadiji bolesti

Kao što je prethodno navedeno, laboratorijski testovi za dokazivanje sifilisa dijele se na one kojima se uzročnik dokazuje direktno (poput tehnike mikroskopiranja u tamnom polju) i na one kojima se dokazuju specifična protutijela u serumu i likvoru bolesnika. Ovi se potonji, serološki testovi dijele na netreponemske i treponemske testove. U svakodnevnoj kliničkoj praksi svi se testovi mogu grupirati u tri kategorije: testove otkrivanja, testove potvrđivanja i testove za praćenje aktivnosti bolesti. Iako su postojale, a ponegdje i danas postoje različite sheme tih testova, opće je prihvaćeno da se u testove otkrivanja uvrsti jedan netreponemski i jedan treponemski test (132). Upotreba samo netreponemskog testa smatra se nedostatnom zbog lažno negativnih rezultata, odnosno lažno pozitivnih testova koji se mogu javiti u različitim bolestima (133). U Hrvatskoj je uobičajeno da testovi otkrivanja budu testovi VDRL i TPHA, a testovi potvrđivanja testovi IgM i IgG FTA-ABS te kvantitativni VDRL. Kao test za praćenje aktivnosti bolesti može se smatrati kvantitativni test VDRL. Naime, četverostruki porast titra govori o svježoj infekciji ili reinfekciji, perzistencija titra govori u prilog bezuspješnoj terapiji, dok četverostruki pad titra govori u prilog djelotvornosti terapije (37). Kao test za praćenje aktivnosti bolesti, ali u prvom redu za potvrđivanje kongenitalnog sifilisa upotrebljava se test 19S-IgM-FTA-ABS (62). Kod praćenja aktivnosti bolesti i uspješnosti terapije uvijek se preporučuje upotreba istovjetnih testova radi lakše usporedbe, i to po mogućnosti u istom laboratoriju (134).

U primarnom stadiju sifilisa na mjestu ulaska treponeme, a nakon razdoblja inkubacije od prosječno tri tjedna, nastaje primarna lezija, tj. *ulcus durum*. Međutim, unutar nekoliko sati nakon što *T. pallidum* penetrira u organizam treponeme se

diseminiraju po čitavom organizmu. U tom se stadiju *T. pallidum* najranije može dokazati tehnikom mikroskopiranja u tamnom polju iz seroznog eksudata *ulcus durum* (11). Humoralna protutijela koja se dokažu serološkim netreponemskim i treponemskim testovima pojavljuju se 1-4 tjedna nakon nastanka *ulcus durum* (61), uz napomenu da oko 30% bolesnika s primarnim stadijem sifilisa ima nereaktivne netreponemske testove (44). Stoga je za definitivnu dijagnozu primarnog sifilisa često potrebna direktna mikroskopska identifikacija *T. pallidum* iz lezije, aspirat limfnog čvora ili biopsija ruba ulkusa (11).

U sekundarnom sifilisu svi organi kao i tjelesne tekućine mogu biti zahvaćene treponemom. U gotovo svih bolesnika sa sekundarnim sifilisom pozitivni su svi serološki testovi, a treponeme iz lezija mogu se dokazati mikroskopiranjem u tamnom polju (61). Dijagnoza se postavlja na temelju anamneze, kliničke slike, dokaza uzročnika tehnikom mikroskopiranja u tamnom polju, reaktivnih netreponemskih i treponemskih testova. Ako osoba ima pozitivnu prethodnu anamnezu o sifilisu, dijagnostičko značenje ima četverostruki porast titra. U bolesnika s atipičnim lezijama i/ili titrom manjim od 8 potrebno je ponoviti netreponemske testove i učiniti testove potvrđivanja (1).

U bolesnika s jasnom kliničkom slikom, a negativnim nalazima seroloških pretraga treba imati na umu mogućnost postojanja "prozonskog fenomena", tj. lažno negativnog rezultata uslijed visokog titra reaginskih protutijela koji mogu inhibirati proces flokulacije (61).

Latentni sifilis označava razdoblje nakon iščezavanja simptoma sekundarnog sifilisa. Razdoblje do godinu dana od infekcije označava se kao rani latentni sifilis. Serološki testovi u ranom latentnom stadiju su pozitivni, ali se pozitivitet (tzv. reaktivitet) netreponemskih testova smanjuje u odnosu na duljinu trajanja infekcije. Dijagnoza se postavlja na temelju kombinacije seroloških pretraga i anamneze (11).

Bolesnicima s kasnim latentnim sifilisom, tj. s nereaktivnim netreponemskim i slabo reaktivnim treponemskim testovima bez kliničkih znakova bolesti i bez pouzdane anamneze o provedenoj terapiji, treba učiniti obradu radi isključenja neurosifilisa. U bolesnika u kojih nije provedena terapija netreponemski testovi mogu biti slabo pozitivni (1).

Simptomi tercijarnog sifilisa nastaju često tek nakon 10-20 godina od primarne infekcije, i to u oko 1/3 bolesnika koji nisu primali terapiju. Oko 30% bolesnika s kasnim sifilisom ima nereaktivne netreponemske testove, stoga uvijek treba učiniti i treponemske testove. Treponemski testovi su gotovo uvijek reaktivni te predstavljaju samo temelj za dijagnozu; uz njih je nužno bolesnika internistički i neurološki obraditi (3).

U lezijama benignog oblika kasnog sifilisa (gumama) može se direktnim dokazivanjem mikroskopiranjem u tamnom polju pronaći pokoja treponema. Ako su prisutne gume, konačna se dijagnoza postavlja na temelju dokaza *T. pallidum* u bioptičkom materijalu uz pozitivne treponemske testove. Dijagnoza kardiovaskularnog sifilisa postavlja se na temelju simptoma karakterističnih za aortnu insuficijenciju ili aneurizmu, reaktivnih treponemskih testova te odsutnosti podataka o provedenoj terapiji sifilisa (44).

Iako se simptomi zahvaćanja SŽS-a mogu javiti i u sekundarnom stadiju sifilisa, neurosifilis označava promjene koje nastaju u tercijarnom stadiju. U bolesnika s kasnim latentnim sifilisom kao i u onih koji imaju znakove neurosifilisa potrebno je učiniti analizu likvora testovima VDRL, FTA-ABS ili TPHA, te ukupne proteine i leukocite u likvoru. Za postavljanje dijagnoze neurosifilisa potrebni su pozitivan treponemski test u serumu, nalaz povećanog broja stanica i proteina u likvoru kao i pozitivan test VDRL u likvoru. Nakon provedene terapije broj stanica kao i koncentracija proteina u likvoru se

normaliziraju, a u testu VDRL dolazi do pada titra. Obično su potrebne godine dok vrijednosti testa VDRL u likvoru postanu nereaktivne (1,3).

Danas postoje mnogobrojna oprečna mišljenja o utjecaju HIV infekcije na konvencionalne i novije dijagnostičke testove za dokazivanje sifilisa (98). U bolesnika s HIV-om serološki odgovor može biti reduciran te se češće nađu lažno negativni testovi. Razlog je tome gubitak sposobnosti produkcije protutijela usporedo s rastućom imunodeficijencijom (61). U bolesnika s HIV infekcijom s karakterističnom kliničkom slikom sifilisa, uz negativne serološke testove, potrebno je razmišljati o upotrebi histološke pretrage te metode PCR (134).

Za dijagnostiku kongenitalnog sifilisa od značenja su serološke pretrage i u majke i u djeteta jer u većine novorođenčadi nema vidljivih simptoma bolesti. Serološke pretrage u majke odgovaraju prethodno navedenim pretragama ovisno o kliničkom stadiju bolesti majke. U djeteta je potrebno učiniti iste pretrage kao i u majke. Zbunjujuće mogu djelovati IgG protutijela prisutna u serumu novorođenčeta, za koja treba znati da su transplacentarno prenesena od majke (91). Test izbora za potvrđivanje kongenitalnog sifilisa je test 19S-IgM-FTA-ABS (91). U novije vrijeme u dijagnostici kongenitalnog sifilisa upotrebljavaju se ELISA, PCR i *immunoblotting* (11).

Moguća je i prenatalna dijagnostika fetalne infekcije. S obzirom na to da majčina IgM protutijela ne prelaze placentu detekcija IgM protutijela u fetalnoj cirkulaciji je posljedica fetalnog humoralnog odgovora i stoga je znakovita za fetalnu infekciju. I u ovom slučaju test izbora je test 19S-IgM-FTA-ABS. Važno je napomenuti da u današnje doba niti jedno dijete ne bi smjelo napustiti rodilište bez učinjenih seroloških pretraga na sifilis u majke tijekom trudnoće (88).

1.8. Terapija sifilisa

Cilj terapije je preveniranje prijenosa uzročnika i izbjegavanje kasnih komplikacija u zaraženih bolesnika. Penicilin je i danas lijek izbora u provođenju terapije sifilisa, osobito zbog njegove sposobnosti prodiranja u sve tjelesne tekućine, mogućnosti prijelaza placentarne kao i likvorske barijere. Za sada nema naznaka da je *T. pallidum* razvila rezistenciju prema penicilinu (1-3).

U liječenju je nužno doseći treponemicidnu razinu penicilina u serumu bolesnika odnosno u likvoru (SŽS-u) u slučajevima neurosifilisa. Razina penicilina 0,018 mg/l se smatra treponemicidnom, a potrebno ju je održavati 7-10 dana. U tom se razdoblju odvije nekoliko ciklusa dijeljenja (30-33 sati) treponema u ranom sifilisu. Budući da je dioba treponema u kasnijim stadijima bolesti usporena, u tim stadijima bolesti nužna je i dugotrajnija terapija (135).

Iako među raznim autorima nema dvojbe oko lijeka izbora za liječenje sifilisa, male razlike postoje u stavovima oko duljine trajanja terapije. Prema SZO za sve manifestacije sifilisa u ranom stadiju, tj. tijekom prve godine nakon infekcije ordinira se 2,4 mil. i.j. benzatin-penicilina (po 1,2 mil. i.j. u svaki gluteus), i to dva puta u razmacima od 7 dana ili 1,2 mil. i.j. prokain-penicilina, svakodnevno tijekom 14 dana (135). Centar za kontrolu bolesti SAD-a u liječenju rane faze sifilisa koristi benzatin-penicilin G 2,4 mil. i.j. u jednokratnoj dozi (133). Za sve manifestacije kasnog sifilisa, uključujući i kasni latentni sifilis (osim neurosifilisa), primjenjuje se 2,4 mil. i.j. benzatin-penicilina, 3 puta u razmacima od 7 dana ili 1,2 mil. i.j. prokain-penicilina dnevno tijekom 21 dan (133). Neurosifilis se liječi benzil penicilinom u dozi 12-24 mil. i.j. i.v. dnevno, podijeljenoj u

6 dnevnih doza tijekom 10 do 21 dana ili prokain-penicilinom u dozi 1,2-2,4 mil. i.j. i.m.uz probenecid 500 mg p.o., 4 puta dnevno, ukupno zajedno 10 do 21 dan (1).

Kod preosjetljivosti na penicilin u ranom stadiju sifilisa dolazi u obzir terapija doksicilinom (koji prodire i u SŽS) od 100 mg, dva puta dnevno tijekom dva tjedna, zatim tetraciklinima od 500 mg četiri puta dnevno tijekom dva tjedna. Moguća je i terapija eritromicinom od 500 mg četiri puta dnevno tijekom dva tjedna, ali je najslabije djelotvoran i ne prodire kroz placentarnu i moždanu barijeru (135). Dolazi u obzir i ceftriakson u dozi od 250 mg i.m. dnevno tijekom 10 dana. U novije vrijeme u terapiji se koristi i azitromicin u dozi od 500 mg dnevno tijekom 10 dana. Hook i sur. (136) su dokazali da je azitromicin djelotvoran i u jednokratnoj dozi od 2 g ili u dvije doze od dva grama u razmaku od tjedan dana. U razdoblju kasnog latentnog sifilisa može se provesti terapija istim ovim lijekovima, samo u trajanju od četiri tjedna. Kod neurosifilisa se u slučaju preosjetljivosti na penicilin preporuča provesti desenzibilizacija, a u slučaju neuspjeha preporuča se terapija ceftriaksonom u dozi od 1 grama dnevno tijekom 14 dana ili doksicilinom 200 mg 2 puta dnevno tijekom 28-30 dana (135). Cilj je terapije neurosifilisa zaustaviti progresiju bolesti, dok se neurološka oštećenja mogu popraviti samo minimalno (1).

Terapiju trudnica treba provoditi prikladno stadiju bolesti (3). U trudnica s ranim sifilisom preporuča se terapija benzatin penicilinom 2,4 mil. i.j. i.m. u dvije doze u razmaku od tjedan dana ili prokain penicilinom 600.000-1,2 mil. i.j. i m. dnevno tijekom 10-14 dana. Problem se nameće u slučaju alergije na penicilin. Eritromicin najčešće ne postiže željeni efekt, tetraciklini su se pokazali djelotvorni u ostale populacije, ali u trudnica se ne preporučaju radi mogućeg obojenja zubi djeteta, oštećenja rasta dugih

kostiju te hepatotoksičnosti. Postoje neka izviješća o terapiji azitromicinom u dozi od 500 mg tijekom 10 dana ili ceftriaksonom. Dolazi u obzir provesti desenzibilizaciju (88,89).

Terapiju djeteta rođenog od majke sa sifilisom treba provesti kod aktivnih simptoma bolesti, kod pozitivnog testa 19S-IgM-FTA-ABS u serumu ili kod pozitivnog testa VDRL u likvoru. Terapija izbora je penicillin G (topivi) 150.000 i.j./kg dnevno podijeljeno u 6 doza (25.000 i.j./kg) i.v. svaka 4 sata tijekom 14 dana. Ako su prisutni neurološki simptomi, onda treba primijeniti dvostruku dozu. U slučaju stečenog sifilisa, u dječjoj dobi treba primijeniti benzatin-penicilin G 50.000 i.j./kg i.m. (133). Za djecu bez simptoma, rođenih od majki s nejasnim statusom infekcije u kojih je provedena terapija sifilisa, preporučena terapija je jedna doza benzatin penicilina, a ne uobičajena terapija vodenim ili prokainskim penicilinom tijekom 10-14 dana (94).

1.8.1. Praćenje djelotvornosti terapije

Po provedenoj terapiji važno je pratiti razvoj odnosno regresiju kliničkih simptoma, ali i kontrolirati serološke nalaze. Kontrola djelotvornosti terapije provodi se izvođenjem jednog nespecifičnog (VDRL) i jednog specifičnog testa (TPHA) nakon 1, 3, 6, 12 mjeseci te potom jedanput godišnje nakon otkrivanja bolesti te provedene terapije. Poslije provedene terapije primarnog i sekundarnog sifilisa do četverostrukog pada titra protutijela u testu VDRL trebalo bi doći nakon 3-4 mjeseca, dok bi poslije 6-8 mjeseci taj pad trebao biti osmerostruk (137). U bolesnika u kojih je terapija započela u kasnom sifilisu, titar pada vrlo postupno. Niski titrovi ostaju pozitivni u oko 50% bolesnika i nakon dvije godine po provedenoj terapiji. Današnja saznanja ovaj perzistentni

seropozitivitet ne označavaju kao neuspjeh terapije ili reinfekciju; smatra se da je riječ o osobama koje ostaju seropozitivne i ako se provede dodatna terapija (133).

U praksi se dosta često postavlja pitanje kada je potrebno ponoviti terapiju. Ipak, u određenom broju slučajeva nužno je ponoviti terapiju, i to kad klinički znaci sifilisa perzistiraju ili su se ponovno pojavili, ako dođe do četverostrukog ili višeg porasta titra u kvantitativnom netreponemskom testu ili ako perzistira visok titar netreponemskog serološkog testa za sifilis godinu dana po završenoj terapiji (137).

Praćenje djece rođene od seropozitivnih majki potrebno je provesti 1, 2, 4, 6 i 12 mjeseci nakon poroda. U liječene djece testove je potrebno kontrolirati sve dok se ne postanu negativni (89).

Postavlja se pitanje kada je indicirana terapija partnera inficirane osobe. Unatoč činjenici da se sifilis prenosi uglavnom u fazi kada su prisutne mukokutane lezije, nakon kontakta s osobom oboljelom od sifilisa u bilo kojoj fazi bolesti potrebno je partnera pregledati klinički i testirati serološki. Ako je do spolnog kontakta došlo unutar 90 dana prije dijagnoze primarnog, sekundarnog i ranog latentnog sifilisa, u seksualnog partnera postoji rizik infekcije te takve osobe treba liječiti preventivno. Dugogodišnje seksualne partnere koji imaju kasni sifilis treba pratiti klinički i serološki te ih liječiti prema nalazima (133).

1.8.2. Neželjena djelovanja terapije

Jarisch-Herxheimerova reakcija predstavlja skupinu simptoma - visoku tjelesnu temperaturu, glavobolju, limfadenopatiju, faringitis, mialgije, leukocitozu s limfocitozom koji se javljaju do 24 sata nakon početka terapije sifilisa. U mlađih bolesnika ova reakcija

obično prođe bez posljedica, međutim u bolesnika s destruktivnim sifilisom, osobito u onih s promjenama na aorti, može doći do letalnog ishoda. Nastanak ove reakcije objašnjava se naglim raspadom treponema s posljedičnim otpuštanjem toksina. Reakcija se može ublažiti ili spriječiti ako neposredno prije ili zajedno s prvom injekcijom penicilina bolesniku damo kortikosteroide - obično prednisolon u dozi od 1 mg na kilogram tjelesne težine intramuskularno. Važno je bolesnike upozoriti na mogućnost ovakve reakcije. Ova reakcija je češća u bolesnika s ranim sifilisom (1-3).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj i svrha ovoga rada bili su:

- utvrditi prisutnost infekcije *T. pallidum* testovima TPHA i VDRL:
    - u bolesnika s kliničkim manifestacijama primarnog stadija ranog sifilisa,
    - u bolesnika s kasnim latentnim sifilisom te
    - u kontrolnoj skupini dragovoljnih davatelja krvi;
- odrediti optimalne uvjete metode PCR u otkrivanju *T. pallidum*;
- utvrditi prisutnost *T. pallidum* metodom PCR:
    - u bolesnika s kliničkim manifestacijama primarnog stadija ranog sifilisa,
    - u bolesnika s kasnim latentnim sifilisom te
    - u kontrolnoj skupini dragovoljnih davatelja krvi;
- odrediti osjetljivost, specifičnost i dijagnostičko značenje metode PCR u usporedbi s testovima TPHA i VDRL u kliničkoj primjeni.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno u Laboratoriju za kliničku imunologiju, imunofluorescentnu i serološku dijagnostiku Klinike za kožne i spolne bolesti Kliničkog bolničkog centra i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta "Ruđer Bošković" u Zagrebu.

U istraživanje su bile uključene tri skupine ispitanika, ukupno njih 90, i to:

- 27 bolesnika s manifestacijama primarnog stadija ranog sifilisa;
- 33 bolesnika s kasnim latentnim sifilisom, te
- 30 slučajno odabranih dragovoljnih davatelja krvi koji su činili kontrolnu skupinu.

Materijali za analizu bili su serumi ispitanika dobiveni iz svježe krvi, kao i svježe pune krvi pohranjene u sterilnoj epruveti na $-20^{o}C$ do trenutka upotrebe.

3.2. Metode

U istraživanju su se koristile kliničke metode: anamneza i dermatološki pregled, laboratorijske metode direktnog i indirektnog dokazivanja *T. pallidum*, te statističke metode.

3.2.1. Anamneza i dermatološki pregled

U svih bolesnika uzeti su anamnestički podaci (osobna anamneza, anamneza bolesti, epidemiološka anamneza…..) te je učinjen dermatološki pregled inspekcijom.

3.2.2. Indirektne metode dokazivanja

3.2.2.1. Test TPHA

Serume bolesnika razrijedili smo u omjeru 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:5120 i inkubirali 30 min. na sobnoj temperaturi s apsorpcijskom tekućinom za uklanjanje nespecifične hemaglutinacije (TPHA-nosticon; Biomerieux). Zatim smo po 50 µl tako razrijeđenog seruma stavili u jažice mikrotitarske ploče sa 96 jažica, te potom tome dodali po 50 µl suspenzije ovčjih eritrocita senzibiliziranih s *T. pallidum.* Ploče se lagano protresu te ostave stajati na sobnoj temperaturi na čvrstoj podlozi kako bi bile sigurne od micanja i trešnje. Rezultate smo vizualno očitavali nakon 4 sata.

Ako u serumu postoje specifična protutijela, dolazi do aglutinacije ovčjih eritrocita što se vidi golim okom. Ako je serum nereaktivan tada senzibilizirani ovčji eritrociti padaju na dno udubljenja i stvaraju oštro ograničen prostor. Ovisno o intenzitetu hemaglutinacije serumi se označavaju kao nereaktivni, slabo reaktivni i reaktivni. Reaktivni serumi se titriraju. Test se smatra reaktivnim ako do aglutinacije dođe u razrjeđenju 1:80 ili višem.

Za kontrolu smo koristili serume s visokim titrom protutijela usmjerenih protiv *T. pallidum* i serume u kojima nisu utvrđena protutijela usmjerena protiv *T. pallidum,* razrijeđene u omjeru 1:80 kojem smo dodali 50 µl nesenzibiliziranih ovčjih eritrocita.

3.2.2.2. Test VDRL

Nakon inaktiviranja seruma u vodenoj kupelji pri 56^{o}C tijekom 30 min., u udubine pločica za VDRL (staklena pločica 5x10 cm s 10 udubina) stavljali smo 50 µl seruma i 10 µl kardiolipinskog antigena. Kardiolipinski antigen (Imunološki zavod, Zagreb) je otopina od 0,3% kardiolipina, 0,3% lecitina i 0,9% kolesterina u apsolutnom etilnom alkoholu. Antigen se razrjeđuje s 1% otopinom NaCl pH 6 u omjeru 1:10. Staklena pločica se potom rotira 4 min. na rotatoru 120 okretaja/min. uz promjer rotacije 2-3 cm. Neposredno nakon rotacije očitavamo rezultat Reichertovim binokularnim mikroskopom (okular 10x, objektiv 16x).

Rezultat se procjenjuje na temelju slike dobivene svjetlosnim mikroskopom te se opisuje kao nereaktivan, slabo reaktivan i reaktivan (1+ do 4+).

Kod stupnja reaktiviteta od 2+ do 4+ serumi se titriraju u razrjeđenjima 1:4, 1:8, 1:16, 1:32.

Kao kontrola upotrebljavaju se pozitivan i negativan ljudski serum prethodno ispitan nekim od treponemskih testova (TPHA, FTA-ABS).

3.2.3. Direktne metode dokazivanja

3.2.3.1. Uzgoj *T. pallidum* u testisima kunića

Kuniću intratestikularno inokuliramo suspenziju *T. pallidum* (30-40 treponema u vidnom polju mikroskopa) i sedmi dan ga žrtvujemo. Testise u Petrijevoj zdjelici izljuštimo iz ovojnice, usitnimo i uronimo u 10 ml Nelsonova medija (15,4 mM natrij klorid, 12 mM natrij hidrogen fosfat, 4,7 mM kalij fosfat, 1,8 mM natrij piruvat, 7,13 mM natrij bikarbonat, 18,4 mM natrij tioglikol, 0,02% cistein, 0,05% glutation, 0,25% albumin, 6,25% ultrafiltrat goveđeg seruma). Centrifugiranjem tog materijala uklone se ostaci tkiva testisa, spermatozoidi i eritrociti. Nakon ovog postupka mikroskopski se odredi broj treponema u otopini. Preparat se promatra u Reichertovom mikroskopu s tamnim poljem (okular 5x, objektiv 45x). Nakon toga se suspenzija inokulira u testise kunića. Postupak se ponavlja svakih 7 dana.

3.2.3.2. Detekcija DNA *T. pallidum* metodom PCR

3.2.3.2.1. Izolacija DNA iz tkiva i seruma

Izolaciju DNA iz testisa kunića kao i iz seruma smo proveli metodom fenol-kloroform ekstrakcije i etanol precipitacije prema Sambrook-u i sur. (138). Oko 100-300 µl seruma ili testisa kunića koji se prethodno usitni, prebaci se u sterilnu *Eppendorf*-epruvetu od 2 ml. Zatim se doda 700-1000 µl pufera za ekstrakciju (10 mM Tris HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, pH 9, 0,5% SDS) te 10-20 µl proteinaze K (10 mg/ml) ovisno o

količini tkiva, odnosno tekućine. Suspenzija se inkubira na 37ºC preko noći, odnosno dok se ne razgradi. Potom se doda 1 volumen fenola (66 % zasićen s 0,1 M TRIS-om, pH 7,9) i suspenzija se 5 minuta homogenizira mućkanjem epruveta. Nakon kratkog centrifugiranja (10.000 g, 5 s), na suspenziju se doda 1 volumen kloroforma (kloroform i izoamilni alkohol u omjeru 24:1) i ponovo se 5 min. homogenizira mućkanjem. Zatim se sadržaj epruveta centrifugira 5 min. na 9.000 g. Gornja faza (vodena) se prenese u novu *Eppendorf*-epruvetu. Na to se doda 2 volumena kloroforma i 5 min. se homogenizira ručnom inverzijom. Zatim se sadržaj epruveta ponovo centrifugira 5 min. na 9.000 g i gornja (vodena) faza se prenese (obično 500-600 µl) u nove *Eppendorf* epruvete. Na dobivenu vodenu fazu doda se NaCl u konačnoj koncentraciji od 100 mM te se doda 2 volumena 96%-tnog etanola (ohlađenog na –20°C). Otopina se homogenizira i pohrani na –20°C preko noći, a potom centrifugira (20 min., 4°C, 10.000 g). Supernatant se odlije suprotno od taloga DNA, koji se ispere sa 70%-tnim etanolom i centrifugira 15 minuta, na 10.000 g pri temperaturi od 4°C. Talog se osuši te se resuspendira u oko 150-250 µl pufera TE (10 mM Tris HCL, 1 mM EDTA, pH 7,6) ovisno o veličini taloga. DNA se zatim nekoliko sati ili preko noći otapa na 37°C. Otopljena DNA se homogenizira pipetiranjem. Tako otopljena DNA može se čuvati na 4°C nekoliko mjeseci, dok se duže čuva na –20°C.

3.2.3.2.2. Izolacija DNA iz krvi

Nekoagulirana krv (oko 5 ml sa 7,5% EDTA) se do izolacije čuva na –20ºC. Nakon odmrzavanja, krv se prebaci u sterilne Falcon epruvete (50 ml) i doda se pufer RCLB (10 mM Tris, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM NaCl) do ukupnog volumena od 40 ml. Zatim se

promiješa i stavi na led najmanje 15 min. da bi se postigla liza eritrocita. Epruvete se, zatim centrifugiraju 15 min. na 3.000 g pri +4ºC. Supernatant se dekantira, a talog se homogenizira u 5 ml RCLB i doda pufer RCLB do 40 ml. Čitav postupak se ponovi još dva puta. Talog se resuspendira u 2 ml pufera SE (75 mM NaCl, 25 mM Na_2EDTA), doda 200 µl 10 % SDS-a i 10 µl proteinaze K (10 mg/ml) i inkubira u vodenoj kupelji 2 sata na 56ºC ili preko noći na 37ºC. Zatim se doda 1/3 volumena 5 M NaCl, dobro promiješa i centrifugira 10 min. na 5.000 g pri sobnoj temperaturi. Supernatant se dekantira u novu plastičnu epruvetu i doda isti volumen 2-propanola (Kemika), otopina se homogenizira, DNA se izvadi sterilnom *Pasteur*-pipetom i ispere se u 70%-tnom etanolu. Nakon ispiranja DNA se otopi u odgovarajućem volumenu pufera TE (10 mM Tris HCL, 1 mM EDTA, pH 7,6).

Da bismo procijenili koncentraciju i kvalitetu izolirane DNA (onečišćenje RNA, fragmentirana DNA), po 5 µl svakog uzorka se pomiješa sa 1 µl pufera LB za nanošenje uzoraka (LB, od engl. *loading buffer*; 0,25% bromfenolplavilo, 0,25% ksilen cijanol, 30% glicerol) i nanesu se na 1%-tni gel agaroze. Na osnovu debljine i izgleda pruga, procjenjuje se je li DNA dovoljno kvalitetna za molekularne analize. Točna koncentracija DNA odredi se spektrofotometrijski, znajući da je maksimalna apsorbancija (A) nukleinskih kiselina, odnosno za A_{260}=1, koncentracija DNA iznosi 50 µg/mL.

3.2.3.2.3. Metoda PCR

Za optimizaciju koncentracije DNA u reakciji te kao pokazatelj kvalitete u lančanoj reakciji polimerazom za umnažanje slijeda β-globina čovjeka koristili smo početne oligonukleotide PC04 i GH20 (Tablica 1) (139).

Za utvrđivanje infekcije bakterijom *T. pallidum* u uzorcima, koristili smo par početnih oligonukleotida F1 i R1 komplementarnih dijelu gena za DNA polimerazu I (polA) (Tablica 1). Ti oligonukleotidi daju produkt veličine 377 pb (140,141). Zatim smo koristili dva para početnih oligonukleotida, S47-1/S47-2 (produkt veličine 658 pb) u prvoj i S47-3/S47-4 (produkt veličine 496 pb) u sljedećoj (engl. *nested*) reakciji, koji umnažaju dio sekvence gena za 47-kDa membranski antigen bakterije *T. pallidum* (Tablica 1). Da bi povećali osjetljivost metode, koristili smo *nested* PCR u kojem se produkti prve reakcije koriste kao kalup u drugoj reakciji.

Tablica 1. Sekvence početnih nukleotida korištenih u radu

Početni oligonuk-leotid	**Slijed nukleotida**	**Regija**	**Veličina PCR produkta**
PC04	5′ CAACTTCATCCACGTTCACC 3′	gen za β-globin	268 pb
GH20	5′ GAAGAGCCAAGGACAGGTAC 3′		
F1	5′ TGCGCGTGTGCGAATGGTGTGGTC 3′	gen za DNA polimerazu I	377 pb
R1	5′ CACAGTGCTCAAAAACGCCTGCACG 3′		
S47-1	5′ GACAATGCTCACTGAGGATAGT 3′	gen za 47-kDa membranski antigen	658 pb
S47-2	5′ ACGCACAGAACCGAATTCCTTG 3′		
S47-3	5′ TTGTGGTAGACACGGTGGGTAC 3′		496 pb
S47-4	5′ TGATCGCTGACAAGCTTAGGCT 3′		

PCR za umnožavanje dijela gena za DNA polimerazu I proveden je pod sljedećim uvjetima: početna faza denaturacije pri 95°C traje 10 min., zatim 50 ciklusa: 1. faza

denaturacije pri 95°C (30 s), 2. faza sparivanja pri 65°C (30 s), 3. faza sinteze (72°C, 30 s) te konačna faza sinteze tijekom 7 min. pri 72°C.

Ukupni volumen reakcije bio je 20 μL, a reakcijska smjesa je sadržavala: 0,1μg DNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 0,1 mM svakog deoksinukleotida (dNTP, odnosno dATP, dGTP, dCTP i dTTP), 2,5 mM $MgCl_2$, 0,5 μM početnih oligonukleotida F1 i R1 te 0,125 jedinica *Taq*-polimeraze.

Prva reakcija *nested*-PCR-a provedena je pod sljedećim uvjetima: početna faza denaturacije pri 95°C traje 10 min., zatim 30 ciklusa: 1. faza denaturacije pri 95°C (30 s), 2. faza sparivanja pri 55°C (30 s), 3. faza sinteze (72°C, 30 s) te konačna faza sinteze tijekom 7 min. pri 72°C.

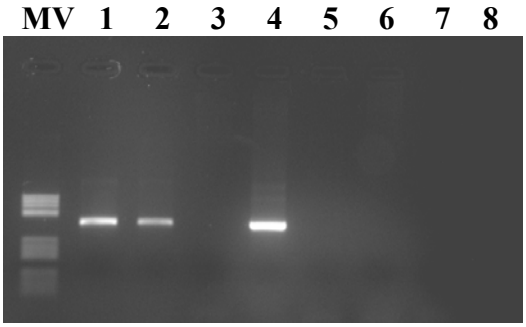
Nested reakcija ja provedena pod sljedećim uvjetima: početna faza denaturacije pri 95°C traje 10 min., zatim 40 ciklusa: 1. faza denaturacije pri 95°C (30 s), 2. faza sparivanja pri 58°C (30 s), 3. faza sinteze (72°C, 30 s) te konačna faza sinteze tijekom 7 min. pri 72°C.

Ukupni volumen *nested*-PCR-a bio je 20 μL, a reakcijska smjesa je sadržavala: 0,1μg DNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 0,1 mM svakog 2,5 mM $MgCl_2$, 0,5 μM početnih oligonukleotida S47-1/S47-2 te 0,125 jedinica *Taq*-polimeraze.

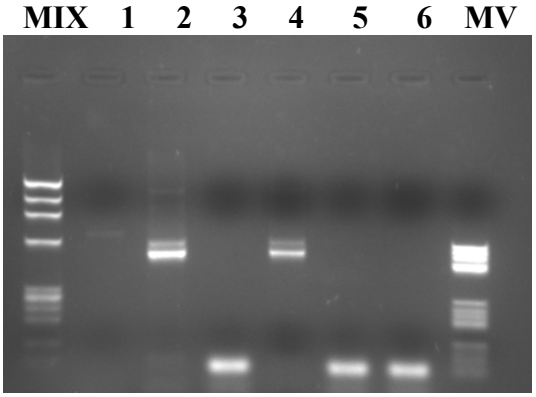
Produkti reakcije PCR analizirani su u 2%-nom gelu agaroze (Sigma) otopljene u puferu TAE (40 mM TRIS-acetat, 1 mM EDTA, pH 8), u kojeg je dodan etidij bromid (1 μg/ml). Prije nanošenja na gel, produkti reakcije PCR pomiješani su sa puferom LB u omjeru 1:5. Nakon provedene elektroforeze u TAE-puferu, na 80 V tijekom 40 min., gel je prenesen na UV-transiluminator (UVP INC. Pharmacia-Biotech) (Slike 13 i 14) i promatran pod UV-svjetlom (λ=254 nm). Etidij bromid koji se interkalira unutar lanaca

DNA, a također i RNA, vidljiv je pod UV-svjetlom. Gel je fotografiran na Image Master aparatu (Pharmacia-Biotech). Na osnovu DNA standarda koji sadrži odsječke DNA poznatih veličina (pBR322 DNA/HaeIII; Roche), određena je veličina dobivenih pruga, odnosno PCR produkata (138).

Kao pozitivnu kontrolu koristili smo DNA bakterije *T. pallidum* izolirane iz testisa zaraženih kunića.



Slika 13. Analiza produkata reakcije (20 µl) PCR s početnim oligonukleotidima za DNA polimerazu I *T. pallidum*
MV: molekularni biljeg DNA (pBR322 DNA/HaeIII; *Roche*)
1: pozitivna kontrola
2-7: uzorci 10-15
8: negativna kontrola



Slika 14. Analiza produkata reakcije (20 µl) PCR s početnim oligonukleotidima za 45 kDa antigen *T. pallidum*
MIX: molekularni biljeg DNA (ΦX174-DNA/*Hae*III, *Roche*)
1: pozitivna kontrola iz prve reakcije
2: pozitivna kontrola iz *nested* reakcije
3-5: uzorci 10-12
6: negativna kontrola
MV: molekularni biljeg DNA (pBR322 DNA/HaeIII; *Roche*)

3.2.4. Statističke metode

Primijenjene su standardne statističke metode: deskriptivna statistika za prikaz vrijednosnih varijabli: aritmetička sredina, standardna devijacija i raspon, prosjeke za prikaz zbirnih vrijednosti atributivnih varijabli, Studentov t-test za testiranje razlika vrijednosnih varijabli, Hi-kvadrat (χ^2) – test za testiranje razlika kod neparametrijskih varijabli i test proporcija za testiranje odnosa u proporcijama. Izračun je vršen na osobnom računalu IBM proizvodnje u programu STATISTICA i Microstat statistici. Prikaz rezultata dan je u tablicama.

4. REZULTATI

4.1. Testovi VDRL i TPHA

Serumi svih ispitanika ispitani su testovima VDRL i TPHA.

Od ukupno 90 ispitanika, negativan test VDRL utvrđen je u 51 (56,7%) ispitanika, pozitivan test – titar 0 u 4 (4,4%) ispitanika, titar 2 u 12 (13,3%) ispitanika, a titar 4 u 1 (1,1% ispitanika). Titar 8 utvrđen je u 7 (7,8%) ispitanika, titar 16 u 9 (10%), a titar 32 u 6 (6,7%) ispitanika.

Od ukupno 90 ispitanika, negativan test TPHA utvrđen je u 31 (34,5%) ispitanika. Pozitivan test TPHA u titru 80 utvrđen je u 4 (4,4%) ispitanika, u titru 160 utvrđen je u 2 (2,2%), a u titru 320 u 21 (23,3%) ispitanika. Titar 1.280 utvrđen je u 12 (14,5%), titar 5120 u 16 (17,8%), a titar veći od 5.120 u 3 (3,3%) ispitanika.

4.2. Metoda PCR

DNA je uspješno izolirana iz tkiva kunića inficiranog *T. pallidum*, a što je poslužilo za pozitivnu kontrolu. DNA je također uspješno izolirana iz 32 uzorka krvi. Međutim u uzrocima seruma (n=10) nije izolirana dovoljna količina DNA.

Sva 32 uzorka krvi iz kojih smo izolirali DNA kao i 10 seruma, testirali smo metodom PCR na prisutnost DNA *T. pallidum*. U svim uzorcima krvi je uspješno umnožen gen za β-globin, dok isti nije bio utvrđen niti u jednom serumu. Za

identifikaciju

T. pallidum umnažali smo gen za DNA polimerazu I pomoću para početnih oligonukletida F1 i R1 (*single*-PCR), te gen za 47-kDa membranski antigen pomoću dva para početnih oligonukleotida, S47-1/S47-2 u prvoj i S47-3/S47-4 u sljedećoj reakciji (*nested*-PCR). Umnažanjem oligonukleotida, S47-1/S47-2 u prvoj i S47-3/S47-4 u sljedećoj reakciji nismo dobili pozitivitet u obrađenim uzorcima, dok smo umnažanjem početnih oligonukletida F1 i R1 utvrdili pozitivitet u 5 uzoraka krvi.

4.3. Analiza ispitanika prema stadiju bolesti

Ukupni broj ispitanika iznosi 90, od kojih 60 bolesnika razdijeljenih u dvije skupine, te 30 zdravih ispitanika. Prvu skupinu čini 27 (30%) bolesnika s primarnim stadijem ranog sifilisa, dok drugu skupinu čini 33 (36,7%) bolesnika s kasnim latentnim sifilisom. Bolesnici su razvrstani u odgovarajuće skupine na temelju anamneze, kliničkog nalaza te učinjenih testova TPHA i VDRL. Treću kontrolnu skupinu čini 30 (33,3%) slučajno odabranih ispitanika među dobrovoljnim davateljima krvi.

4.3.1. Skupina bolesnika s primarnim stadijem ranog sifilisa

Bolesnici su uvršteni u ovu skupinu na temelju jednog ili više navedenih parametara: kliničke slike primarnog stadija sifilisa (*ulcus durum*), dokaza *T. pallidum* tehnikom mikroskopiranja u tamnom polju, pozitivne anamneze o spolnom kontaktu s osobom oboljelom od sifilisa te pozitivnim odgovarajućim serološkim nalazima.

4.3.1.1. Statistička analiza bolesnika prema spolu i dobi

Od ukupno 27 bolesnika s primarnim stadijem ranog sifilisa 14 (52%) su bile žene, a 13 (48%) muškarci s prosječnom životnom dobi 29,77±7,59 godina u rasponu 21-56 godine. Najveći broj bolesnika bio je u dobnom razredu od 21-30 godine, njih 14 (51,9%), a najmanji u dobnim razredima od 41-60 godine, ukupno 2 (7,4%) (Tablica 2).

Analizirajući ukupnu skupinu bolesnika s primarnim stadijem ranog sifilisa istovremeno prema spolu i dobi nije utvrđena statistički značajna razlika u broju oboljelih prema spolu i dobi (χ^2=0,39; n.s.).

Tablica 2. Prikaz ispitanika s primarnim stadijem ranog sifilisa prema spolu i dobnim razredima

Godine starosti	Ženski		Muški		Ukupno	
	N	%	n	%	n	%
21-30	6	46,2	8	57,2	14	51,9
31-40	7	53,8	4	28,6	11	40,7
41-50	0	0,0	1	7,1	1	3,7
51-60	0	0,0	1	7,1	1	3,7
Ukupno	13	100	14	100	27	100

4.3.1.2. Statistička analiza bolesnika prema nalazu TPHA i spolu

Od 27 bolesnika s primarnim stadijem ranog sifilisa 26 (96,3%) ih je imalo pozitivan nalaz TPHA. Analizirajući visinu titra TPHA najveći broj ispitanika, njih 14

(51,8%) je imalo titar 5120 ili veći. Niže titrove, 320 i 1.280, imalo je ukupno 12 ispitanika (44,4%) (Tablica 3).

Među spolovima se nije našla statistički značajna razlika u pozitivitetu TPHA (χ^2=0,78; n.s.).

Tablica 3. Prikaz razdiobe nalaza TPHA u bolesnika s primarnim stadijem ranog sifilisa prema spolu

TPHA	Ženski		Muški		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Neg	0	0,0	1	7,1	1	3,7
320	2	15,4	3	21,4	5	18,5
1.280	4	30,8	3	21,4	7	25,9
5.120	7	53,8	4	28,6	11	40,7
>5.120	0	0,0	3	21,5	3	11,1
Ukupno	13	100	14	100	27	100

4.3.1.3. Statistička analiza bolesnika prema nalazu VDRL i spolu

Od 27 bolesnika iz ove skupine 21 (77,8%) je imao pozitivan VDRL. Najveći broj ih je imalo titar 16 i 32, njih 15 (55,5%). Nije se pokazala statistički značajna razlika u razdiobi prema spolu (χ^2= 2,07; n.s.) (Tablica 4).

Tablica 4. Prikaz razdiobe nalaza VDRL u bolesnika s primarnim stadijem ranog sifilisa prema spolu

VDRL	Ženski		Muški		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Neg	2	15,4	4	28,6	6	22,2
8	4	30,8	2	14,2	6	22,2
16	5	38,5	4	28,6	9	33,4
32	2	15,3	4	28,6	6	22,2
Ukupno	13	100	14	100	27	100

4.3.1.4. Statistička analiza bolesnika prema nalazu PCR i spolu

U skupini ispitanika s kliničkim primarnim stadijem ranog sifilisa 10 bolesnika je odabrano za PCR analizu. Od njih 10, samo 3 (33,3%) ih je imalo pozitivan PCR.

Nije se pokazala statistički značajna razlika prema spolu (Tablica 5).

Tablica 5. Prikaz razdiobe nalaza PCR u bolesnika s primarnim stadijem ranog sifilisa prema spolu

	Ženski		Muški		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Poz	0	0,0	3	42,9	3	30,0
Neg	3	100	4	57,1	7	70,0
Ukupno	3	100	7	100	10	100

4.3.1.5. Prikaz nalaza PCR s obzirom na nalaze TPHA i VDRL

Od 3 ispitanika s pozitivnim PCR, jedan je imao pozitivan TPHA i VDRL, jedan pozitivan samo TPHA,a jedan negativan i TPHA i VDRL (Tablica 6).

Tablica 6. Usporedni prikaz različitih metoda dokazivanja u primarnom stadiju ranog sifilisa

TPHA	**VDRL**	**PCR**
5120	32	Poz
320	8	Poz
Neg	Neg	Poz
5120	8	Neg
1280	8	Neg
1280	8	Neg
1280	Neg	Neg
1280	Neg	Neg
320	Neg	Neg
320	Neg	Neg

4.3.2. Skupina bolesnika s kasnim latentnim sifilisom

U ovu skupinu bolesnici su uvršteni na temelju anamneze o prethodno postojećim kliničkim i serološkim manifestacijama sifilisa te na temelju pozitivnih specifičnih testova.

4.3.2.1. Statistička analiza bolesnika prema spolu i dobi

Od ukupno 33 bolesnika s kasnim latentnim sifilisom, 16 (48,5%) su bile žene, a 17 (51,5%) muškarci. Prosječna starost bila je 46,18±12,78 godina u rasponu 23-66 godina.

Najveći broj ih je bio u dobnim skupinama od 41-70 g. života, njih 23 (69,7%), a najmanje u dobnim razredima od 21-40 g (Tablica 7).

Analizirajući ukupnu skupinu bolesnika s kasnim latentnim stadijem sifilisa istovremeno prema spolu i dobi, nije bilo statistički značajne razlike (χ^2= 0,28; n.s.).

Tablica 7. Prikaz ispitanika s kasnim latentnim stadijem sifilisa prema spolu i dobnim razredima

Godine starosti	Ženski		Muški		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
21-30	2	12,5	2	11,8	4	12,1
31-40	3	18,8	3	17,7	6	18,2
41-50	5	31,2	5	29,4	10	30,3
51-60	4	25,0	3	17,6	7	21,2
61-70	2	12,5	4	23,5	6	18,2
Ukupno	16	100	17	100	33	100

4.3.2.2. Statistička analiza bolesnika prema nalazu TPHA i spolu

Sva 33 bolesnika s kasnim latentnim sifilisom imala su pozitivan TPHA test.

Analizirajući pozitivitet prema spolu, nije se našla statistički značajna razlika (χ^2=1,04; n.s.).

Analizirajući TPHA, najveći broj ispitanika, njih 16 (48,5%) imalo je titar 320. Visoke titrove, 1.280 i 5.120, imalo je 11 (33,4%) ispitanika, dok su ostali imali titar 80 i 160 (Tablica 8).

Tablica 8. Prikaz razdiobe nalaza TPHA u bolesnika s kasnim latentnim stadijem sifilisa prema spolu

TPHA	Ženski		Muški		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
80	2	12,5	2	11,8	4	12,1
160	0	0,0	2	11,8	2	6,1
320	9	56,3	7	41,2	16	48,5
1280	1	6,2	5	29,4	6	18,2
5120	4	25	1	5,8	5	15,1
Ukupno	16	100	17	100	33	100

4.3.2.3. Statistička analiza bolesnika prema nalazu VDRL i spolu

Od 33 ispitanika, 16 (48,5%) ih je imalo negativan nalaz VDRL, dok su ostali bili u skupini slabo pozitivnih i pozitivnih s titrom 0.

Niti u ovoj skupini ispitanika nije se pokazala statistički značajna razlika prema spolovima (χ^2 2,07; n.s.**)** (Tablica 9).

Tablica 9. Prikaz razdiobe nalaza VDRL u bolesnika s kasnim latentnim stadijem sifilisa prema spolu

VDRL	Ženski		Muški		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Neg	7	43,8	9	52,9	16	48,5
Slabo pozitivno	7	43,8	5	29,5	12	36,4
Poz-0	2	12,6	3	17,6	5	15,1
Ukupno	16	100	17	100	33	100

4.3.2.4. Statistička analiza bolesnika prema nalazu PCR i spolu

U ovoj skupini odabrano je 11 ispitanika za PCR analizu. Od njih 11 samo 1 ispitanik imao je pozitivan nalaz (Tablica 10).

Tablica 10. Prikaz razdiobe nalaza PCR u bolesnika s kasnim latentnim stadijem sifilisa prema spolu

PCR u krvi	Ženski		Muški		Ukupno	
	n	%	n	%	n	%
Poz	1	25	0	0,0	1	9,1
Neg	3	75	7	100	10	90,9
Ukupno	4	100	7	100	11	100

4.3.2.5. Prikaz nalaza PCR s obzirom na nalaze TPHA i VDRL

Samo jedan ispitanik u ovoj skupini je imao pozitivan PCR. Isti je imao istovremeno TPHA u titru 80, a VDRL negativan (Tablica 11).

Tablica 11. Usporedni prikaz različitih metoda dokazivanja u kasnom latentnom stadiju sifilisa

TPHA	VDRL	PCR
80	Neg	Neg
80	Neg	Poz
1280	Neg	Neg
5120	Neg	Neg
80	Neg	Neg
160	Neg	Neg
320	Neg	Neg
320	Neg	Neg
160	Neg	Neg
320	Neg	Neg
320	Neg	Neg

4.3.3. Kontrolna skupina ispitanika

Slučajno odabranih 30 dobrovoljnih davalaca krvi predstavlja 33,3 % od ukupnog broja ispitanika.

Niti jedan od ispitanika u kontrolnoj skupini nije imao pozitivan nalaz TPHA ni VDRL.

U ovoj skupini od 30 ispitanika također je odabrano 11 ispitanika za PCR analizu. Jedan ispitanik (9,1%) imao je pozitivan PCR test.

5. RASPRAVA

U našem istraživanju analizirali smo tri skupine ispitanika. Prva skupina sastojala se od 27 bolesnika s primarnim stadijem ranog sifilisa. Uzorci koje smo analizirali u ovoj skupini bolesnika prikupljeni su u trogodišnjem razdoblju (2000-2002.) u kojem se broj novootkrivenih bolesnika kretao od 15 do 20 godišnje. Stoga nismo niti mogli očekivati veći broj uzoraka u ovom stadiju sifilisa jer se u oko 30% bolesnika bolest dijagnosticira tek u sekundarnom stadiju bolesti (1). Inače je u Hrvatskoj 1995. godini zamijećen posljednji izraziti porast novooboljelih, ukupno njih 50. I drugi autori iz zemalja sa sličnim socioekonomskim uvjetima bilježe slične podatke (38). Porast broja novooboljelih u Republici Hrvatskoj 1995. g. povezuje se s povećanim migracijama vojnika iz zemalja u kojima je zamijećen izraziti porast broja oboljelih od sifilisa, kao što je na pr. Rusija (7,33). Ovdje se nameće i pitanje stvarnog broja novooboljelih za kojeg se smatra da je višestruko veći od navedenog. Naime, jedan dio populacije, osobito osobe iz zaostalijih sredina te među niže obrazovanim ruralnim stanovništvom, ne javlja se u medicinske institucije već su skloni samoliječenju različitim lokalnim i alternativnim pripravcima. Također je razlog i u tome što se učestalo propisuje antibiotska terapija zbog različitih indikacija, pa se na taj način prekrije klinička slika primarnog stadija sifilisa. Tako ti bolesnici ostanu neprepoznati. Također je upitno i redovito prijavljivanje oboljelih od strane liječnika koji utvrdi dijagnozu (37).

Druga skupina ispitanika obuhvaćala je 33 bolesnika s kasnim latentnim sifilisom u kojem nema kliničkih znakova bolesti, već samo pozitivitet u serološkim nalazima (3). Ovaj stadij bolesti može nastupiti u bolesnika u kojih je nakon utvrđene dijagnoze provedena antibiotska terapija uz perzistentne serološke nalaze, u bolesnika u kojih je

antibiotska terapija provedena radi neke druge indikacije, i u bolesnika u kojih je rutinskim pretragama slučajno utvrđen pozitivitet u serološkim nalazima. Inače se kasni latentni sifilis dijagnosticira učestalije od primarnog sifilisa, što potvrđuju i drugi autori (1,44).

Treću skupinu ispitanika predstavlja 30 slučajno odabranih dobrovoljnih davatelja krvi u kojih se rutinski provodi serološko testiranje na sifilis. U ovoj skupini nas je zanimalo, unatoč uvjetu o negativnim serološkim pretragama, ima li dokaza evantualne infekcije *T. pallidum*.

Svaku smo skupinu zasebno analizirali prema dobi i spolu bolesnika, te prema nalazima TPHA, VDRL i PCR.

Analizom smo utvrdili da je prosječna životna dob bolesnika s primarnim stadijem ranog sifilisa 30 godina. To je povezano s intenzivnijom seksualnom aktivnosti u toj životnoj dobi. Bolesnici s kasnim latentnim sifilisom su prosječne životne dobi od 46 godina. Ovaj podatak je očekivan s obzirom da su to bolesnici koji su već preboljeli primarni i/ili sekundarni stadij ranog sifilisa ili su otkriveni slučajno rutinskim serološkim testiranjem (44,54,62).

Ispitanike obje skupine ispitivali smo prema spolu i utvrdili smo da je odnos muškaraca i žena u svim ispitivanim skupinama bio jednak. Ovi podaci u skladu su s podacima iz literature gdje se navodi jednaka učestalost muškaraca i žena (3,142).

Analizirajući indirektne laboratorijske testove dokazivanja *T. pallidum* konstatirali smo da je u bolesnika s primarnim stadijem TPHA bio pozitivan u njih 96,3%. To je uobičajen postotak pozitivnosti jer TPHA postaje pozitivan 3 tjedna nakon pojave kliničkih simptoma bolesti (3,47). U većine bolesnika titar je bio 5.120 i veći što je u skladu s podacima iz literature, jer titar specifičnih treponemskih protutijela doseže

najvišu razinu oko 4. tjedna nakon infekcije (120,121). U jednog bolesnika s primarnim stadijem ranog sifilisa nalaz TPHA bio je negativan. Na temelju toga može se ustvrditi da se radi o bolesniku kod kojega nije prošlo više od 3 tjedna od infekcije te da specifična treponemska protutijela nisu prisutna. U svih bolesnika s kasnim latentnim sifilisom nalaz TPHA je bio pozitivan, najčešće u titru 320. To je očekivano jer se treponemska protutijela ne negativiziraju do kraja života osim u iznimnim slučajevima (na pr. kod imunodeficijencije), a za raspravu je ima li visina titra TPHA značajnost u praćenju aktivnosti bolesti odnosno u procjeni aktivnosti terapije (118,120,121).

Analizirali smo i nalaze VDRL-a koji su u bolesnika s primarnim stadijem ranog sifilisa bili pozitivni u 77,8% bolesnika. Ovaj podatak je očekivan jer VDRL-test postaje pozitivan 5 tjedana nakon pojave kliničkih simptoma ranog sifilisa (1-3), a većina naših ispitanika je bila u tom razdoblju nakon infekcije. Oko 55% bolesnika imalo je visoke titrove (>16) što odgovara najaktivnijoj fazi primarnog stadija sifilisa. No 6 ispitanika imalo je negativan nalaz VDRL-a. Razlog tome je što VDRL postaje pozitivan u 5. tjednu infekcije, a bolesnicima je najvjerojatnije uzeta krv prije tog vremena. Iz istog razloga jedan od njih imao je i negativan nalaz TPHA. U bolesnika s kasnim latentnim sifilisom utvrdili smo da je u gotovo polovice VDRL bio negativan, a pola ispitanika je imalo vrijednosti koje nisu relevantne za dijagnozu sifilisa niti za provođenje terapije. Naši nalazi su sasvim u skladu s literaturnim podacima (44,113).

U 10 bolesnika s primarnim stadijem ranog sifilisa koje smo obradili metodom PCR, pozitivan nalaz utvrđen je u troje. U dvoje od njih su i TPHA i VDRL bili istovremeno pozitivni, a u trećeg su TPHA i VDRL bili negativni. Istaknuli bismo vrijednost PCR-testa upravo u tog bolesnika s negativnim nalazima u serološkim pretragama u kojeg se dijagnoza mogla utvrditi samo na temelju kliničke slike i nalaza

T. pallidum tehnikom mikroskopiranja u tamnom polju jer se protutijela još nisu pojavila (3,11,44). Međutim ukupan pozitivitet PCR-a bio je oko 34% što odgovara literaturnim podacima gdje se kreće od 29% do 48% (143).

Od 11 bolesnika s kasnim latentnim sifilisom koje smo obradili metodom PCR, nalaz je bio pozitivan samo u jednog bolesnika. VDRL u ovog bolesnika je bio negativan što je značilo da je u akutnoj fazi bolesti provedena izvjesna terapija, no očito nedostatna jer je PCR-testom zabilježena DNA *T. pallidum*. Međutim, ovdje se nameće pitanje može li metoda PCR razlikovati žive od neživih treponema (144).

Mogući razlog niskog pozitiviteta u PCR-u autori obrazlažu različitim kriterijima odabira uzoraka, vremena proteklog od infekcije kao i odnosa prema pozitivitetu u serološkim pretragama (145,146). Problem predstavlja i različitost pristupu kliničkim stadijima bolesti. Naime, danas još uvijek ne postoji standardizirana definicija prema kojoj je u potpunosti jasno koji bolesnici pripadaju skupini kasnog latentnog sifilisa.

Smatra se da će značaj metode PCR biti osobit u dijagnostici kongenitalnog sifilisa, neurosifilisa, ranog primarnog sifilisa te konačno u razlikovanju svježe od stare infekcije. Stoga smo mi u ovom radu nastojali utvrditi prednosti metode PCR u primarnom stadiju sifilisa osobito u bolesnika s jasnom kliničkom slikom a s negativnim serološkim nalazima. Također smo proučavali značaj metode PCR u bolesnika s kasnim latentnim sifilisom. Entitet latentnog sifilisa pobuđuje posebnu pozornost kao dijagnostički i terapijski problem jer se manifestira pozitivitetom seroloških nalaza i izostankom kliničkih manifestacija.

Doprinos pozitiviteta PCR u bolesnika s ranim sifilisom koji imaju negativnu serologiju je u tome što je nalaz PCR-a omogućio pravovremeni početak terapije, a u bolesnika s latentnim sifilisom ponovno liječenje prikladnim izborom i dozom lijeka.

Poseban osvrt dali bismo na pozitivan nalaz PCR u jednog ispitanika iz skupine dobrovoljnih davatelja krvi. Svakako nije očekivana prisutnost *T. pallidum* u zdravih ispitanika iz skupine dobrovoljnih davatelja krvi. Tim više što se ti ispitanici obvezatno podvrgavaju serološkim testovima na sifilis i tek potom postaju davatelji krvi. Ovakvih podataka nismo našli u literaturi (147,148). Ovaj nalaz zabrinjava i upućuje na nužnost dodatne provjere i testiranja na sifilis u institucijama koje pribavljaju krv i krvne derivate. To otvara mogućnosti daljnje provjere vrijednosti PCR metode u toj dijagnostici.

U našem istraživanju kromosomalne DNA, a time i DNA *T. pallidum*, izolacija je uspjela iz krvi oboljelih i tkiva testisa kunića zaraženog sifilisom. No iz uzoraka seruma nismo uspjeli izolirati kromosomalnu DNA.

U samom početku postavljanja metode PCR u dijagnostiku sifilisa na određenom broju ispitanika iskušali smo izolirati DNA iz seruma (19,20). No rezultati su se pokazali vrlo skromni. DNA smo samo u nekim uzorcima identificirali tek u tragovima. O izboru uzorka za izolaciju DNA *T. pallidum* u literaturi se nalaze dvojaki podaci (149). Neki autori iznose uspješnost izolacije iz seruma (19,143), a neki neadekvatnost seruma kao uzorka za izolaciju DNA i detekciju DNA *T. pallidum* (140,150).

U izvođenju lančane reakcije polimerazom osjetljivije i specifičnije nam se pokazalo umnažanje gena DNA polimeraze I *T. pallidum* (*single*-PCR s F1/R1) od *nested*-PCR u kojoj smo umnažali gen za 47-kDa antigen *T. pallidum.* U literaturi se navodi veća osjetljivost i specifičnost *nested* metode (151).

Postoji otvorena mogućnost daljnjeg istraživanja vrijednosti metode PCR u dijagnostici sifilisa kako u oboljelih tako i u zdravih osoba, potencijalnih davalaca krvi.

6. ZAKLJUČCI

U našem istraživanju sifilisa izdvojena je skupina oboljela od primarnog stadija ranog sifilisa te kasnog latentnog sifilisa, kao dvije skupine oboljelih, u kojih otkrivanje *T. pallidum* uobičajenim dijagnostičkim metodama nije uvijek moguće.

Broj ispitanika ukupno je relevantan jer se godišnje registrira 15 do 20 bolesnika sa sifilisom od kojih 30% tek u sekundarnom stadiju.

Ispitanici u našem istraživanju bili su podjednako zastupljeni prema spolovima. Primarni stadij ranog sifilisa češće se dijagnosticira u mladih ljudi (srednja životna dob 30 godina) dok se latentni stadij kasnog sifilisa registrira češće u starijoj populaciji (srednja životna dob 46 godina).

Rezultati analize TPHA i VDRL u oba istraživana stadija bolesti očekivani su.

Pozitivitet u PCR-testu u obje ispitivane skupine oboljelih pokazao se očekivan, pri čemu bi istaknuli pozitivitet u bolesnika s negativnim nalazom TPHA- i VDRL-testa u primarnom stadiju ranog sifilisa, kao i u bolenika u kasnom latentnom stadiju s negativnim nalazom VDRL-a i nerelevantnom vrijednosti TPHA. Ističemo pozitivitet u zdravog ispitanika iz kontrolne skupine dobrovoljnih davatelja krvi u kojeg su serološke pretrage bile očekivano negativne.

Izolacija DNA pokazala se uspješnom iz krvi bolesnika i tkiva testisa zaraženih kunića a neuspješnom iz seruma bolesnika.

Umnažanje gena DNA polimeraze I *T. pallidum* pokazalo se pogodnije od umnažanja gena za 47-kDa antigen *T. pallidum*.

PCR nije metoda izbora za probir bolesnika, ali bi mogla zamijeniti dugotrajnu i složenu metodu uzgoja *T. pallidum* u kunićima.

7. SAŽETAK

U ovom radu laboratorijskim indirektnim i direktnim metodama za dokazivanje sifilisa analizirano je 90 ispitanika od kojih 60 oboljelih od sifilisa te 30 zdravih ispitanika iz kontrolne skupine dobrovoljnih davatelja krvi.

Ispitanici su gotovo ravnomjerno bili zastupljeni prema spolu, a i dob im je bila očekivana za stadije bolesti koje smo analizirali. U skupini s primarnim stadijem ranog sifilisa češće su bili mlađi bolesnici, dok su u skupini s kasnim latentnim sifilisom u većem broju bili stariji bolesnici.

Serološke pretrage većinom su odgovarale stadiju bolesti, a lančana reakcija polimerazom kao direktna metoda dokazivanja *T. pallidum* pokazala se korisnom u bolesnika s negativnim nalazima VDRL i TPHA testa. Osobito važan i upozoravajući nalaz pozitivnog PCR testa nađen je u zdravog ispitanika među redovito serološki testiranim dragovoljnim davateljima krvi.

DNA je uspješno izolirana iz krvi bolesnika i tkiva zaraženih kunića.

Umnažanje gena DNA polimeraze I *T. pallidum* pokazalo se pogodnije od umnažanja gena za 47-kDa antigen *T. pallidum*.

PCR se nije pokazao metodom izbora za dijagnostiku sifilisa s izuzetkom u nekim slučajevima primarnog stadija sifilisa kao i u svrhu dodatne provjere dobrovoljnih davatelja krvi.

8. SUMMARY

Determining the presence of T. pallidum in patients with primary-stage of early syphilis and late latent syphilis.

A total of 90 subjects, 60 patients with syphilis and 30 healthy controls (volunteer blood donors), were analyzed by using indirect and direct diagnostic laboratory methods for diagnosis of syphilis.

The two groups of subjects were comparable for sex distribution and of expected age for the analyzed stages of the disease. The patients with primary stage of early syphilis were of younger age, whereas patients with late latent syphilis were older.

Serologic findings mostly corresponded to the stage of the disease, although polymerase chain reaction (PCR), as a direct method for *T. pallidum* detection, proved useful in patients with negative serologic results. Positive PCR result in patients with primary stage of syphilis and negative results of Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) test and Treponema Pallidum Hemagglutination Assay (TPHA) was significant, allowing timely treatment. Positive PCR result obtained in a healthy subject was especially significant and alarming, as volunteer blood donors are serologically tested on a regular basis.

DNA was successfully extracted from the blood and tissues of infected rabbits. Amplification of gene DNA polymerase I *T. pallidum* PCR proved to be more succesful than amplification of gene for 47-kDa antigen of *T. pallidum.*

PCR did not prove to be a sufficiently specific method to establish the diagnosis of syphilis, except in some cases of primary stage early syphilis, and as a complement control in a group of volunteer blood donors.

5. POPIS LITERATURE

1. Sanchez M, Luger AF. Syphilis. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF, eds. Dermatology in general medicine. New York:McGraw Hill, 1993:2704-43.
2. Morton RS. The treponematoses. In: Champion RH, Burton JL, Burnes DA, Breathnach SM. Rook/Wilkinson/Ebling Textbook of dermatology. 6th ed. Oxford:Blackwell, 2002: 1237-75.
3. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WH. Sexually transmitted bacterial diseases. In: Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WH. Dermatology. 2nd ed. Berlin:Springer, 2000:245-98.
4. Kogoj F. Sifilis ili lues. U: Kogoj F. Spolne bolesti. Zagreb:Izdavački zavod JAZU,1966:9-258.
5. Singh AE, Romanowski B. Syphilis: review with emphasis on clinical, epidemiologic, and some biologic features. Clin Microb Rev 1999;12:187-209.
6. Tomić-Karović K. O porijeklu sifilisa. Lijec Vjesn 1975;97:639-53.
7. Waugh M. The progress of venereology in Europe since the sixteenth century. Clin Dermatol 2002;20:119-21.
8. Hudson MM, Morton RS. Fracastoro and syphilis: 500 years on. Lancet 1996;348:1495-6.
9. Sartin JS, Perry HO. From mercury to malaria to penicillin. The history of the treatment of syphilis at the Mayo Clinic – 1916-1955. J Am Acad Dermatol 1995;32:255-61.

10. Albert MR, Mackool BT. A dermatology ward at the beginning of the 20th century. J Am Acad Dermatol 2000;42:113-23.
11. Larsen SA, Johnson RE. Diagnostic tests. In: Larsen SA, Pope V, Johnson RE, Kennedy EJ,Jr. A Manual of tests for Syphilis. Washington:APH Assoc, 1998:2-52.
12. Schaudin FN, Hoffman E. Vorlaufiger Bericht uber das Vorkommen von Spirochaeten in syphilitischen Krankheitsprodukten und bei Papillomen. Arbeiten K Gesundheits 1905;93:412-4.
13. Wasserman A, Neisser A, Buck C. Eine serodiagnostische Reaktion bei Syphilis. Dtsch Med Wochenschr 1906;32:745-6.
14. Parrish JL. Treponemal infections in pediatric population. Clin Dermatol 2000;18:687-700.
15. Coles AC. *Spirochaeta pallida*: Methods of examination and detection, especially by means of the dark-ground illumination. Br Med J 1909;1:1117-20.
16. Nelson RA, Jr, Mayer MM. Immobilization of *Treponema pallidum in vitro* by antibody produced in syphilitic infection. J Exp Med 1949;89:369-93.
17. Orhel I. Tehnika izvođenja reakcije imobilizacije treponeme palide po Nelsonu i Mayeru u Serodijagnostičkom laboratoriju Dermatovenerološke klinike u Zagrebu. Rad Med fak Zagreb 1954;2:155-62.
18. Grimpel E, Sanchez PJ, Wendel GD, Burstein JM, McCracken GH, Radolf JD *et al*. 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;29:1711-8.

19. Noordhoek GT, Wolters EC, De Jonge ME, van Embden JD. Detection by polymerase chain reaction of *Treponema pallidum* DNA in cerebrospinal fluid from neurosyphilis patients before and after antibiotic treatment. J Clin Microbiol 1991;29:1976-84.
20. Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, White O, Sutton GG, Dodson R, *et al*. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. Science 1998;281:375-88.
21. Mahoney JF, Arnold RC, Harris AD. Penicillin treatment of early syphilis. Am J Pub Health 1943;33:1387-91.
22. Anonimus. Prostitucija kasnog srednjovjekovlja u starom Dubrovniku – "quod non est in literis non est in mundo". Liječničke novine 2000;28:34-8.
23. Kogoj F. Liječenje luesa. Lijec Vjesn 1937;59:231-5.
24. Kogoj F. Penicilin kao antiluetično sredstvo. Lijec Vjesn 1948;70:247-52.
25. Bošnjaković S. Osnutak i razvoj dermatovenerološke klinike. Osvrt prilikom prve desetogodišnjice. Lijec Vjesn 1938;60:662-3.
26. Schwarzward M. Iz povijesti Katedre za dermatovenerologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Acta derm Iug 1975;2:63-70.
27. Hutchinson CM, Hook EW 3rd Syphilis in adults. Med Clin North Am 1990;74:1389-1416.
28. Haustein UF, Pfeil B, Zschiesche A. Analyse der von 1983-1991 and der Universitäts-Hautklinik Leipzig beobachteten Syphilisfälle. Hautartzt 1993;44:23-9.
29. Blank S, McDonnell DD, Rubin SR, Neal JJ, Brome MW, Materson MB, *et al*. New approaches to syphilis control. Sex Trasm Dis 1997;24:218-26.
30. Hook EW 3rd, Marra CM. Acquired syphilis in adults. N Engl J Med 1992;326:1060-69.

31. Farley TA. Approaches to screening and antibiotic use for syphilis prevention. Sex Transm Dis 1997;24:227-8.
32. Gunn RA, Rolfs RT, Geenspan JR, Seidman RL, Wasserheit JN. The changing paradigm of sexually transmitted disease control in the era of managed health care. JAMA 1998;279:680-4.
33. Tichonova L, Borisenko K, Ward H, Meheus A, Gromyko A, Renton A. Epidemics of syphilis in the Russian Federation: trends, origins, and priorities for control. Lancet 1997;350:210-3.
34. Petzold D. Ansteig der Syphilis in der Alpen-, Donau-, Moldauregion. Hautartzt 1996;47:335.
35. WHO office of HIV/AIDS and STDs. An overview of selected curable STDs. Syphilis estimates, 1995. Geneva:WHO, 1995.
36. Balić-Winter A, Dobrić I. Spolne bolesti i bolesti koje se prenose spolnim putem. U: Dobrić I i sur. Dermatovenerologija. 2. ispravljeno izd. Zagreb:Dobrić i Grafoplast, 1999:433-51.
37. Marinović B, Lipozenčić J. Where does syphilis stand in Croatia? Clin Dermatol 2002;20:141-6.
38. Zdravstveno statistički ljetopis. Zagreb:Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 2002.
39. Marinović B, Lipozenčić J, Balić-Winter A. Syphilis serodiagnosis at the Department of Dermatology and Venerology, Zagreb University Hospital Center, in 1993-1998 period. Acta Dermatovenerol Croat 1999;7:184.
40. Kansky A, Vegnuti M, Potočnik M. Epidemiological trends of scabies and syphilis in Slovenia. Acta Dermatoven APA 2000;9:105-9.
41. MMWR. Congenital spyhilis – United States, 1998. Arch Dermatol 2000;136:136-7.

42. Huang J, Bailey SB, Perkey B. Potential opportunities to enhance syphilis surveillance system. Tenn Med 2002;95:331-3.

43. Vraneš J. Spirohete. U: Kalenić S, Mlinarić-Missoni E i sur. Medicinska bakteriologija i mikologija. 2. izd. Zagreb:Merkur ABD, 2001:321-42.

44. Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH. Laboratory diagnosis and interpretation of tests for syphilis. Clin Microbiol Rev 1995;8:1-21.

45. Norris SJ, Larsen SA. Treponema and other host-associated spirochetes. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH, eds. Manual of clinical microbiology. 6th ed. Washington DC: ASM Press, 1995; 636-51.

46. Centurion-Lara A, Castro C, Castillo R, Shaffer JM, van Voorhis WC, Lukehart SA. The flanking region sequences of the 15-kDa lipoprotein gene differentiate pathogenic treponemes. J Infect Dis 1998;177:1036-40.

47. Nichols HJ, Hough WH. Demonstration of *Spirochaeta pallida* in cerebrospinal fluid. JAMA 1913;60:108.

48. Fieldsteel AH, Stout JG, Becker FA. Comparative behaviour of virulent strains of *Treponema pallidum* and *Treponema pertenue* in gradient cultures of various mammalian cells. Infect Immun 1979;24:337-45.

49. Crowon NA, Magro C, Mihm M Jr. Treponemal diseases. In: Elder D, Elenitas R, Jaworsky C, Johnson B Jr. Lever's Histopathology of the skin. 8th ed. Philadelphia: Lippincott, 1997:503-15.

50. Norris SJ and the *Treponema pallidum* polypeptide research group. Polypeptides of *Treponema pallidum*: progress toward understanding their structural, functional and immunologic roles. Microbiol Rev 1993;57:750-79.

51. Weinstock GM, Hardham JM, McLeod MP, Sodergren EJ, Norris ST. The genome of *T. pallidum*: new light on the agent of syphilis. FEMS Microb Rev 1998;22:323-332.

52. Garnett GP, Aral SO, Hoyle DV, Cates W, Jr, Anderson RM. The natural history of syphilis. Implications for the transmission dynamics and control of infection. Sex Transm Dis 1997;24:185-200.

53. Schober PC, Gabriel G, White P, Felton WF, Thin RN. How infectious is syphilis? Br J Vener Dis 1983;59:217-9.

54. Brown TJ, Yen-Moore A, Tyring SK. An overview of sexually transmitted diseases. Part I. J Am Acad Dermatol 1999; 41: 511-29.

55. Balić-Winter A, Kansky A. Serološka dijagnostika sifilisa. Lijec Vjesn 1985;107:92-4.

56. Gjestland T. The Oslo study of untreated syphilis: an epidemiologic investigation of the natural course of syphilis infection based upon a re-study of the Boeck-Brunsgaard material. Acta Derm Venereol (Stockh) 1955;35(suppl 34):1-368.

57. Rockwell DH, Yobs AR, Moore MB. The Tuskegee study of untreated syphilis. The 30th year of observation. Arch Intern Med 1964;114:792-8.

58. Peters JJ, Peers JH, Olansky S, Cutler JC, Gleeson GA. Untreated syphilis in the male Negro. Pathologic findings in syphilitic and nonsyphilitic patients. J Chron Dis 1955;1:127-48.

59. Brockmeyer NH. Syphilis. In: Plewig G, Przybilla B. 15. Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie. Berlin:Springer,1997:351-60.

60. DiCarlo RP, Martin DH. The clinical diagnosis of genital ulcer disease in men. Clin Infect Dis 1997;25:292-8.

61. Chapel TA. The variability of syphilitic chancres. Sex Transm Dis 1978;5:68-70.

62. Johnson PC, Farnie MA. Testing for syphilis. Dermatol Clin 1994;12:9-17.

63. Marinović B. Sifilis. U: Lipozenčić J i sur. Dermatovenerologija. Zagreb:Naklada Zadro, 1999:348-56.

64. Rosen T, Brown TJ. Cutaneous manifestations of sexually transmitted diseases. Med Clin N Am 1998;82:1081-104.

65. Mindel A, Tovey SJ, Timmins DJ, Williams P. Primary and secondary syphilis, 20 years' experience. 2. Clinical features. Genitourin Med 1989;65:1-3.

66. Chapel TA. The signs and symptoms of secondary syphilis. Sex Transm Dis 1980;7:161-4.

67. Sands M, Markus A. Lues maligna, or ulceronodular syphilis, in a man infected with human immunodeficiency virus: case report and review. Clin Infect Dis 1995;20:387-90.

68. van der Willigen AH, Peereboon-Wynia JDR, van der Hoek JCS, Mulder PGH, van Joost Th, Stolz E. Hair root studies in patients suffering from primary and secondary syphilis. Acta Derm Venereol (Stockh) 1987;67:250-4.

69. Mannara GM, Sacilotto C, Frattasio A, Pedace E, Di Loreto C, Ferlito A. Bilateral secondary syphilis of the tonsil. J Laryngol Otol 1999;113:1125-7.

70. Reginato AJ. Syphilitic arthritis and osteitis. Rheum Dis Clin North Am 1993;19:379-98.

71. Butz WC, Watts JC, Rosales-Wuintana S, Hicklin MD. Erosive gastritis as a manifestation of secondary syphilis. Am J Clin Pathol 1975;63:895-900.

72. Schlossberg D. Syphilitic hepatitis: a case report and review of the literature. Am J Gastroenterol 1987;82:552-3.

73. Campisi D, Whitcomb C. Liver diseases in early syphilis. Arch Intern Med 1979;139:365-6.

74. Janković S, Miše K, Alujević A, Tocilj J, Marasović D, Andjelinović S. A case of syphilitic interstitial pulmonary fibrosis. Croat Med J 1998;39:453-4.

75. Gagnebin J, Maire R. Infection screening in sudden and progressive idiopathic sensorineural hearing loss: a retrospective study of 182 cases. Otol Neurotol 2002;23:160-2.

76. Morrison A. On syphilis and the ear – an otologist's view. Genitourin Med 1992;68:359-62-

77. Thompson L. Syphilis of the kidney. JAMA 1920;75:17-20.

78. Hunte W, al-Ghraoui F, Cohen RJ. Secondary syphilis and the nephrotic syndrome. J Am Soc Nephrol 1993;3:1351-5.

79. Hira SK, Patel JS, Bhat SG, Chilikima K, Mooney N. Clinical manifestations of secondary syphilis. Int J Dermatol 1987;26:103-7.

80. Deschenes J, Seamone CD, Barnes MG. Acquired ocular syphilis: diagnosis and treatment. Ann Ophthalmol 1992;24:134-8.

81. Margo CE, Hamed LM. Ocular syphilis. Surv Ophthalmol 1992;37:203-20.

82. Villaneuva AV, Sahouri MJ, Ormerod LD, Puklin JE, Reyes MP. Posterior uveitis in patients with positive serology for syphilis. Clin Infect Dis 2000;30:479-85.

83. Schmidt D, Berghorn C, Wiek J, Dichmann S, Vaith P. Ocular syphilis. Klin Monatsbl Augenheilkd 2002;219:433-9.

84. McDonald LL, Stites PC, Buntin DM. Sexually transmitted diseases update. Dermatol Clin 1997;15:221-32.

85. Stratigos JD, Katoulis AC, Hasapi V, Stratigos AJ, Arvantis A, Vounatsou M, et al. On epidemiological study of syphilis incognito, an emerging public health problem in Greece. Arch Dermatol 2001;137:157-60.

86. Kirwald H, Montag A. Stage 3 syphilis of the mouth cavity. Laryngorhinootologie 1999;78:254-8.

87. Kampmeier RH. The late manifestations of syphilis: skeletal, visceral and cardiovascular. Med Clin North Am 1964;48:667-92.

88. Murat-Sušić S. Konatalni sifilis. U: Lipozenčić J i sur. Dermatovenerologija. Zagreb:Naklada Zadro 1999;357-8.

89. Genc M, Lediger WJ. Syphilis in pregnancy. Sex Transm Inf 2000;76:73-9.

90. Sanchez PJ, Wendel GD. Syphilis in pregnancy. Clin Perinatol 1997;24:71-90.

91. Glaser JH. Center for Disease Control and Prevention guidelines for congenital syphilis. J Pediatr 1996;129:488-90.

92. Stoll BJ, Lee FK, Larsen S, Hale E, Schwartz D, Rice RJ, *et al*. Clinical and serologic evaluation of neonates for congenital syphilis:a continuing diagnostic dilemma. J Infect Dis 1993;167:1093-9.

93. Mascola L, Pelosi R, Blount JH, Alexander CE, Cates W. Congenital syphilis revisited. Am J Did Child 1985;139:575-80.

94. Risser WL, Hwang LY. Problems in the current case definitions of congenital syphilis. J Pediatr 1996;129:499-505.

95. Michelow IC, Wendel GD, Norgard MV, Zeray F, Leos K, Alsaadi R, Sanchez PJ. Central nervous system infection in congenital syphilis. N Engl J Med 2002;346:1792-8.

96. MMWR. Evaluation of congenital syphilis surveillance system – New Jersey, 1993. Arch Dermatol 1995;131:987-8.

97. Dorfman DH, Glaser JH. Congenital syphilis presenting in infants after the newborn period. N Engl J Med 1990;323:1299-302.

98. Hutchinson CM, Hook EW 3rd Shepherd M, Verley J, Rompalo AM. Altered clinical presentation of early syphilis in patients with human immunodeficiency virus infection. Ann Intern Med 1994;121:94-9.

99. Schöfer H. Syphilis:Besonderheiten bei HIV-Infektion. Allergologie 1994;17:309-15.

100. Maxwell LG, Myers SA, Shea CR, Livengood CN 3rd, Preito VG, Hicks CB. Failure of benzathine penicillin in a case of seronegative secondary syphilis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: case report and review of the literature. Arch Dermatol 2001;137:1374-6.

101. Berry CD, Hooton TM, Collier AC, Lukehart SA. Neurological relapse after benzathine penicillin therapy for secondary syphilis in a patient with HIV infection. N Engl J Med 1987;316:1587-9.

102. Johns DR, Tierney M, Feldsenstein D. Alteration in the natural history of neurosyphilis by concurrent infection with the human immunodeficiency virus. N Engl J Med 1987;316:1569-72.

103. Schöfer H, Imhof M, Thoma-Greber E, Brockmeyer NH, Hartman M, Gerken G, *et al*. Active syphilis in HIV infection: a multicentre retrospective survey. Genitourin Med 1996;72:176-81.

104. Fieldsteel AH, Cox DL, Moeckli RA. Cultivation of virulent Treponema pallidum in tissue culture. Infect Immun 1981;32:908-15.

105. Kennedy EJ Jr, Creighton ET. Darkfield microscopy for the detection and identification of *Treponema pallidum*. In: Larsen SA, Pope V, Johnson RE, Kennedy EJ Jr. A Manual of tests for Syphilis. Washington:APH Assoc, 1998:120-34.

106. Romanowski B, Forsey E, Prasad E, Lukehart S, Tam M, Hook EW 3rd. Detection of *Treponema pallidum* by a fluorescent monoclonal antibody test. Sex Transm Dis 1987;14:156-9.

107. George RW, Hunter EF, Fears MB. Direct fluorescent antibody test for *Treponema pallidum* (DFA-TP). In: Larsen SA, Pope V, Johnson RE, Kennedy EJ Jr. A Manual of tests for Syphilis. Washington:APH Assoc, 1998:136-46.

108. Ito F, Hunter EF, George RW, Larsen SA, Pope V. Specific immunofluorescent staining of pathogenic treponemes with a monoclonal antibody. J Clin Microbiol 1992;30:831-8.

109. George RW, Hunter EF, Fears MB. Direct fluorescent antibody tissue test for *Treponema pallidum* (DFA-TP). In: Larsen SA, Pope V, Johnson RE, Kennedy EJ Jr. A Manual of tests for Syphilis. Washington:APH Assoc, 1998:148-56.

110. Wilcox RR, Guthe T. *Treponema pallidum*, a bibliographical review of the morphology, culture and survival of *T. pallidum* and associated organisms. Bull WHO 1966;35(Suppl):91-93.

111. Saiki RK, Gefland DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, *et al*. Primer-directed enzymatic amplification of DNA polymerase. Science 1988;239:487-91.

112. Lo AC, Feldman SR. Polymerase chain reaction. Basic concepts and clinical applications in dermatology. J Am Acad Dermatol 1994;30:250-60.

113. Kennedy EJ Jr, Creighton ET. Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) slide test. In: Larsen SA, Pope V, Johnson RE, Kennedy EJ Jr. A Manual of tests for Syphilis. Washington:APH Assoc, 1998:159-78.

114. Taniguchi S, Osato K, Hamada T. The prozone phenomenon in secondary syphilis. Acta Derm Venereol (Stockh) 1995;75:153-4.

115. Berkowitz KM, Stampf K, Baxi L, Fox HE. False negative screening test for syphilis in pregnant women. N Engl J Med 1990;322:270-1.

116. Larsen SA, Creighton ET. Rapid plasma reagin (RPR) 18-mm circle card test. In: Larsen SA, Pope V, Johnson RE, Kennedy EJ Jr. A Manual of tests for Syphilis. Washington:APH Assoc, 1998:194-207.

117. Vukelić V, Brnobić A. *Treponema pallidum* hemaglutinacioni test u serodijagnostici sifilisa. Acta derm Iug 1974;1:197-203.

118. Kiraly K, Prerau H. Evaluation of the *Treponema pallidum* haemagglutination (TPHA) test for syphilis on "problem sera". Acta Derm Venerol (Stockh) 1974;54:303-10.

119. Luger A, Schmidt A, Spendlingwimmer I, Horn F. Recent observations on the serology of syphilis. Br J Vener Dis 1980;56:12-6.

120. Lesinsky J, Krach J, Kadzewicz E. Specificity, sensitivity, and diagnostic value of the TPHA test. Br J Vener Dis 1974;50:334-40.

121. Uete T, Fukazawa S, Ogi K, Takenuchi Y. Clinical evaluation of the *T. pallidum* haemagglutination test. Br J Vener Dis 1971;47:73-6.

122. George RW, Hunter EF, Fears MB. Fluorescent treponemal antibody-absorption (FTA-ABS) test. In: Larsen SA, Pope V, Johnson RE, Kennedy EJ Jr. A Manual of tests for Syphilis. Washington:APH Assoc, 1998:225-245.

123. Carlsson B, Hanson HS, Wasserman J, Brauner A. Evaluation of the fluorescent treponema antibody-absorption (FTA-ABS) test specificity. Acta Derm Venereol (Stockh) 1990;71:306-11.

124. Müller F. Der 19S (IgM)-FTA-ABS Test in der Serodiagnostik der Syphilis. Immun Infekt 1982;10:23-34.

125. Bolanča-Bumber S, Balić-Winter A, Kansky A, Kastelic M. Test 19S-IgM-FTA-ABS u bolesnika sa sifilisom. Acta derm Iug 1988;15:97-102.

126. Holzman HP, Meurer M, Braun-Falco O. Aussagekraft des 19S-IgM-FTA-ABS-Test fur Diagnostik und Therapie der Syphilis. Hautartzt 1987;38:76-81.

127. Schmidt BL, Edjlalipur M, Luger A. Comparative evaluation of nine different enzyme-linked immunosorbent assays for determination of antibodies against *Treponema pallidum* in patients with primary syphilis. J Clin Microbiol 2000; 38:1279-82.

128. Sambri V, Marangoni A, Simone MA, D'Antono A, Negosante M, Cevenini R. Evaluation of recomWell Treponema, a novel recombinant antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of syphilis. Clin Microbiol 2001;7:200-5.

129. Siletti RP. Comparison of CAPTIA Syphilis G enzyme immunoassay with rapid plasma reagin test for detection of syphilis. J Clin Microbiol Infect 1995;33:1829-31.

130. Reisner BS, Mann LM, Tholcken CA, Waite RT, Woods GL. Use of *Treponema pallidum* – specific Captia Syphilis IgG assay in conjunction with the rapid plasma reagin to test the syphilis. J Clin Microbiol 1997;35:1141-3.

131. Orhel I. Proučavanje imobilizina kod sifilisa kunića, Zagreb 1959. Disertacija, str 168.

132. Muić V, Vodopija I. Serotestiranje na lues, dijagnostička uspješnost i zdravstveni nadzor. Lijec Vjesn 1996;118:184-6.

133. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually tranmitted diseases treatment diseases guidelines 2002. MMWR Recomm Rep 2002;51:1-78.

134. CDC. 1998 Guidelines for treatment of sexually transmitted diseases. MMWR 1998;47:1-116.

135. Goh BT, van Voorst Vader PC. European guideline for the management of syphilis. Int J STD AIDS 2001;12(Suppl 3):14-26.

136. Hook EW 3rd, Martin DH, Stephens J, Smith BS, Smith K. A randomized, comparative pilot study of azithromycin versus benzathine penicillin G for treatment of early syphilis. Sex Transm Dis 2002;29:486-90.

137. Brown ST, Zaidi A, Larsen SA, Reynolds GH. Serological response to syphilis treatment: a new analysis of old data. JAMA 1985;253:1296-9.

138. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York:Cold Spring Laboratory Press, 1989.

139. Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. J Natl Cancer Inst 1993;85:1159-64.

140. Liu H, Rodes B, Chen CY, Steier B. New tests for syphilis: rational design of a PCR method for the detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene. J Clin Microbiol 2001;39:1941-6.

141. Marfin AA, Liu H, Sutton MY, Steiner B, Pillay A, Markowitz LE. Amplification of the DNA polymerase I gene of *Treponema pallidum* from whole blood of persons with syphilis. Diagn Microbiol Infect Dis 2001;40:163-6.

142. Felman YM. Sexually transmitted diseases: selections from the literature since 1990. Syphilis:epidemiology. Cutis 1993;52:72-4.

143. Burstein JM, Grimpel E, Lukehart SA, Norgard MV, Radolf JD. Sensitive detection of *Treponema pallidum* by using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991;29:62-9.

144. 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;35:1348-52.

145. Jethwa HS, Schmitz JL, Dallabetta G, Behets F, Hoffman I, Hamilton H, ***et al.*** Comparison of molecular and microscopic tchniques for detection of *Treponema pallidum* in genital ulcersw. J Clin Microbiol 1995;33:180-3.

146. Nathan L, Bohman R, Sanchez PJ, Leos NK, Twickler DM,Wendel GD Jr. *In utero* infection with *Treponema pallidum* in early pregnancy. Prenat Diagn 1997;17:119-23.

147. Orton SL, Liu H, Dodd RY, Williams AE. Prevalence of circulating *Treponema pallidum* DNA and RNA in blood donors with confirmed-positive syphilis test. Transfusion 2002;42:94-9.

148. Orton S. Syphilis and blood donors: what we know, what we do not know, and what we need to know. Transfus Med Rev 2001;15:282-91.

149. Kouznetsov AV, Prinz JC. Molecular diagnosis of syphilis: the Schaudinn-Hoffman lymph-node biopsy. Lancet 2002;360:388-9.

150. Wicher K, Noordhoek GT, Abbruscato F, Wicher V. Detection of *Treponema pallidum* in early syphilis by DNA amplification. J Clin Microbiol 1992;30:497-500.

151. Zoehling N, Schluepen EM, Soyer HP, Kerl H, Volkenandt M. Molecular detection of *Treponema pallidum* in secondary and tertiary syphilis. Br J Dermatol 1997;136:683-6.

10. ŽIVOTOPIS

Branka Marinović rođena je 16. srpnja 1962. g. u Zagrebu gdje je završila Klasičnu gimnaziju. Na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu diplomirala je 1988. g. Pripravnički staž obavila je u Kliničkom bolničkom centru "Zagreb", a stručni ispit položila je 1990. godine. Specijalizaciju iz dermatologije i venerologije započela 1992. g. kao specijalizant Klinike za kožne i spolne bolesti KBC-a i MF-a Sveučilišta u Zagrebu. Specijalistički ispit položila je 1995. g. od kada radi kao liječnik specijalist iste Klinike. Tijekom specijalizacije završila je poslijediplomski studij iz dermatovenerologije. Magistarski rad "Ultrastrukturna analiza epidermodermalne granice kod Duhringovog herpetiformnog dermatitisa i buloznog pemfigoida" obranila je 1998. g. (mentor: prof.dr.sc. Ivan Dobrić). Od 1998. g. mlađi je asistent, a od 1999. g. asistent Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Autor je više stručnih i znanstvenih radova objavljenih u indeksiranim časopisima.

Član je Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog dermatovenerološkog društva i Europske akademije za dermatologiju i venerologiju.