

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

DIAGNOSTIKA SYFILIS

Vedoucí diplomové práce: MUDr. PAVLA PATEROVÁ

HRADEC KRÁLOVÉ, 2014

LENKA BRANSKÁ

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala MUDr. Pavle Paterové z Katedry biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy za vedení bakalářské práce a MUDr. Haně Zákoucké, vedoucí Národní referenční laboratoře pro diagnostiku syfilis ze Státního zdravotního ústavu Praha za odborné konzultace a pomoc při orientaci v problematice.

Také bych ráda poděkovala doc. MUDr. Vladaně Woznicové, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu Fakultní nemocnice u Svaté Anny za poskytnuté informace o publikacích a odborných zdrojích vhodných pro tuto práci.

V neposlední řadě patří dík mé rodině za důležitou podporu, shovívavost a pomoc nejen při psaní této práce, ale i za celé studium.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Podpis:

Obsah

| | |
|---|----|
| 1. Obsah | |
| 2. Úvod..... | 6 |
| 3. Zadání – cíl práce..... | 7 |
| 4. Rod treponema..... | 8 |
| 4.1 Vlastnosti treponemat | 8 |
| 4.2 Původce syfilis – <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>Pallium</i> | 9 |
| 4.3 Historické aspekty..... | 9 |
| 5. Epidemiologie syfilis | 10 |
| 7. Neurosyfilis..... | 13 |
| 8. Vrozená syfilis | 14 |
| 9. Diagnostika syfilis – přímý průkaz | 14 |
| 9.1 Mikroskopie v zástínu..... | 15 |
| 9.2 Přímá imunofluorescence..... | 15 |
| 9.3 Polymerázová řetězcová reakce | 16 |
| 9.4 Histologické techniky | 17 |
| 9.5 Izolace na králíkovi..... | 18 |
| 10. Diagnostika nepřímá – serologie | 19 |
| 10.1 Humorální imunitní odpověď | 19 |
| 10.2 Reakce netreponemové | 20 |
| 10.2.1 Rychlá reaginová reakce..... | 21 |
| 10.2.2 VDRL (Venereal disease research laboratory)..... | 21 |
| 10.2.3 RPR (Rapid Plasma Reagin)..... | 22 |
| 10.2.4 Falešně pozitivní a negativní výsledky v netreponemových testech | 23 |
| 10.3 Reakce treponemové..... | 25 |
| 10.3.1 <i>T. pallium</i> hemagglutination (TPHA)..... | 25 |
| 10.3.2 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)..... | 26 |

| | | |
|--------|--|----|
| 10.3.3 | Imunofluorescenční reakce | 27 |
| 10.3.4 | Westernblot..... | 29 |
| 10.3.5 | Falešně pozitivní příčiny v treponemových testech..... | 30 |
| 11. | Léčba..... | 30 |
| 12. | Legislativa v České Republice..... | 32 |
| 13. | Statistika..... | 33 |
| 14. | Závěr | 42 |
| 15. | Souhrn..... | 43 |
| 16. | Abstract..... | 44 |
| 17. | Použité zkratky | 45 |
| 18. | Seznam obrázků..... | 46 |
| 19. | Seznam tabulek | 46 |
| 20. | Seznam grafů | 46 |
| 21. | Použitá literatura | 47 |

2. Úvod

Infekce způsobená *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* (*T. p. pallidum*) se označuje jako syfilis. V německé jazykové oblasti se používá spíše označení lues. Českým výrazem pro toto onemocnění je příjice. Syfilis je jedna z nejvýznamnějších pohlavně přenosných chorob, ale také zajímavá problematika laboratorního výzkumu.

Pro sepsání této bakalářské práce jsem se rozhodla proto, že zde mohu využít vlastní zkušenosti z pracoviště – úseku sexuálně přenosných chorob sérologické laboratoře Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Práce je psána formou literární rešerše. Hlavním cílem je charakteristika původce onemocnění a shrnutí poznatků laboratorní diagnostiky.

3. Zadání – cíl práce

Bakalářská práce je psána formou literární rešerše. Hlavním cílem je shrnutí poznatků o laboratorní diagnostice syfilis jejíž původcem je patogenní bakterie rodu *Treponema* *Treponema pallidum subsp. pallidum* ..

4. Rod treponema

Taxonomicky jsou treponemata řazena do řádu Spirochaetales, který obsahuje dvě čeledi s osmi rody, z nichž medicínsky nejdůležitější jsou kromě rodu *Treponema* především rody *Borrelia* a *Leptospira*.

Pro člověka jsou patogenní tato treponemata:

- *T. pallidum* subsp. *pallidum*, medicínsky nejdůležitější z treponemat – původce venerické syfilis
- *T. pallidum* subsp. *endemicum*, způsobující tzv. endemickou syfilis
- *T. pallidum* subsp. *pertenue*, příčina yaws
- *T. carateum*, vyvolávající onemocnění zvané pinta

4.1 Vlastnosti treponemat

Treponemata jsou aktivně pohyblivé spirálovité bakterie s pravidelnými závity. Jsou anaerobní nebo mikroaerofilní a jsou velmi citlivá vůči vyschnutí, změnám teploty a tenze kyslíku. Dělí se velmi pomalu – v infikovaných králících trvá generační doba asi 30 – 33 hodin.



Obrázek 1 Spirálky treponemat v zástinu (zvětšeno)
zdroj: (<http://www.medmicro.info/portal/index.html>)

Treponemata jsou v podstatě gramnegativní, ale špatně se barví. Dají se však vizualizovat poměrně snadno v zástinu. V zástinovém mikroskopu můžeme také pozorovat jejich čilý pohyb – smršťují se, rotují a kývají se.

Vrtící se spirálky treponemat lehce upoutají oko, které je pozoruje v mikroskopu. Za svůj až komický pohyb vděčí bičíkům a zvláštní stavbě své stěny. Bičíky probíhají z obou konců ke středu mikroorganismu prostorem mezi zevní buněčnou stěnou a vnitřní cytoplazmatickou membránou. (Woznicová 2007)

4.2 Původce syfilis – *Treponema pallidum subsp. Pallium*

T. p. pallidum, etiologické agens syfilidy, byla poprvé izolována v roce 1905. Onemocnění se přenáší pohlavním stykem s infikovanou osobou. Nejčastější je u osob ve věkové kategorii s nejvyšší sexuální aktivitou, tj. 15-30 let. Vrozená syfilis má původ ve vertikálním přenosu *Treponema pallidum* z matky na plod v děloze. Novorozenci se také mohou nakazit při porodu průchodem porodními cestami. Infekce in utero má pro plod smrtelné následky. Dříve byla syfilis také přenášena přímou transfuzí čerstvé krve (Greenwood 1999).

4.3 Historické aspekty

Původce syfilis, dříve označovaného jako *Spirochaeta pallida*, objevili Schaudinn a Hoffman v roce 1905. Syfilis je ale v Evropě známa mnohem déle, nejméně od roku 1493. Má se za to, že toto onemocnění zavlekli do Evropy Kolumbovi námořníci v letech 1494-1495. Nejprve byla nazývané španělskou, později francouzskou nemocí.

První doložená evropská epidemie syfilis se objevila již v roce 1494 během francouzské invaze do Itálie a španělské obrany Neapole. Protože v té době nejsou zaznamenány žádné překotné změny sexuálního chování, hygienických podmínek, ani náhlý vliv jiných faktorů, zdá se, že úporné válečné vřavy zkrátka přispívaly k vytváření náhodných i násilných sexuálních kontaktů. Všeobecný lidský chaos jistě přispěl k šíření syfilis. Je ale nutno dodat, že v té době se pojem „francouzská nemoc“ samozřejmě vztahoval jen ke klinickým projevům onemocnění, z nichž mnohé nebyly specifické. Proto se tímto pojmem označovaly a v historických pramenech zaznamenávaly také jiná infekční onemocnění doprovázená vyrážkami či teplotami (McGough 2006).

Hypotéza o příchodu syfilis z Nového světa je postavena na faktu, že kosterní změny ostatků nalézáných v Americe a datovaných před 15. stoletím jsou podobné změnám charakteristickým pro „moderní“ syfilis. Naopak v Evropě u srovnatelně starých nálezů podobné změny zaznamenány nejsou. Protože je těžké rozlišit, které projevy na kostech jsou způsobeny yaws, pintou, endemickou syfilis a případně jinými onemocněními, neocenitelnou roli hrají hlavně změny spojené s vrozenou syfilis. Projevy kongenitální syfilis jsou v tomto smyslu vcelku velmi typické a těžko zaměnitelné, a proto cenné z diferenciačního hlediska (například šavlovité tibie, nasopalatinální destrukce, poruchy zubů).

5. Epidemiologie syfilis

Inkubační doba syfilis kolísá mezi 9-90 dny. O inkubující syfilis hovoříme tehdy, když byl dosud asymptomatický jedinec exponován syfilis v minulých 90 dnech. Již během tohoto asymptomatického období se objevuje diseminace *T. p. pallidum* a může tedy dojít k přenosu infekce přímou transfúzí (Post 1933).

Kvůli nebezpečí přenosu infekce na plod nebo krví, je syfilis aktivně vyhledávána mezi těhotnými ženami a dárci krve. Vakcína chránící před přijící dosud neexistuje a jedinou ochranou je dodržování zásad bezpečného sexu. Epidemiologická situace v oblasti kontroly syfilis se celosvětově zhoršuje, v České Republice zřetelně po roce 1990. Příčina je mimo jiné v prostituci, zvláště pouliční a v užívání drog s prostitucí spojeném (Zákoucká 2004).

Jedinci se získanou syfilis jsou nejvíce infekční během primární či sekundární fáze infekce, zejména pokud mají vlhké kožně-slizniční léze. Osoby s primární syfilis mohou být infekční i dříve, než se takové léze vytvoří, přenos je možný také mikroskopickými abrazemi během pohlavního styku.

Přenosnost (transmisibilita) syfilis se podle některých studií odhaduje na 30 % (Schroeter 1971), přičemž léze primární a sekundární syfilis jsou pravděpodobně stejně rizikové (Schober 1983). Jindy se uvádí, že podle epidemiologických pozorování se syfilis nakazí asi 50 % jedinců, kteří byli v kontaktu s infekčními lézemi. Experimentálně jsou ale tyto odhady podpořeny jedině studiemi *in vitro*, které dokazují treponemicidní aktivitu v séru zdravých osob (Bishop 1983).

Magnusonova studie (1956) přinesla cenné poznatky o infekciozitě Nicholsova kmene *T. p. pallidum*, kdy ID₅₀ činila 57 treponemat a nelišila se významně u králíka a u člověka.

U některých jedinců infekci vyvolalo již 10 treponemat. Epidemiologická pozorování proto musí být korigována také s ohledem na trvání a typ kontaktu, anatomickou lokalizaci léze apod..

Přenos syfilis z matky na dítě (tzv. vertikální přenos) byl pozorován po několik století. Riziko vzniku kongenitální syfilis se odhaduje na 30–80 % u žen s časnou aktivní (tedy primární a sekundární) syfilis a s časem klesá (Schulz 1987).

Prospektivní studie v Parkland Memorial Hospital v Dallasu zjistila, že ze 24 žen s neléčenou časnou syfilis jich přeneslo tuto infekce na plod 16 (Hollier 2001). U fetální infekce je transplacentární invaze hlavní, ale ne jedinou cestou přenosu (Sheffield 2002). Vzácně se může objevit také infekce perinatální (Dorfman 1990).

6. Průběh a patogeneze syfilis

Tabulka 1 Stadia syfilis (zdroj: autor)

| stadium lues | | hlavní klinické projevy | infekčnost | |
|-----------------|--------|-------------------------|---|---|
| syfilis získaná | časná | primární | ulcus durum | ANO |
| | | secundární | exantémy, postižení CNS | ANO |
| | pozdní | latentní | Nejsou | postupně klesá, je vázána na délku trvání |
| | | terciární | kožní, viscerální, neurologické, kardiovaskulární | nízká |
| syfilis vrozená | časná | praecox | poškození orgánů neslučitelné se životem | ANO |
| | | recens | odpovídá II. stadiu syfilis získané | ANO |
| | pozdní | latens | Nejsou | postupně klesá, je vázána na délku trvání |
| | | tarda | následky specifických zánětů a příznaky III. stádia | nízká |

Neléčená syfilis je progresivní onemocnění s primárním sekundárním, latentním a terciárním stadiem. *T. p. pallidum* pronikne do tkáně neporušenou sliznicí nebo drobnými oděrkami na kůži. Rychle se dostává do lymfatických cest, šíří se krevní cestou a může se osídlit v kterémkoli orgánu.

Velikost infekční dávky potřebné pro člověka není známa, u pokusných zvířat stačí k započetí infekce méně než 10 mikrobů. Bakterie se množí v místě průniku a po inkubační době, průměrně za 3 týdny, se vytvoří léze charakteristická pro primární syfilitidu – *tvrdý vřed*. Není bolestivý, nejčastěji je lokalizován na vnějším genitálu, ale také na cervixu, v perianální oblasti, v ústech a v řitním otvoru. Tvrdý vřed je solitární, ale u osob s imunodeficitem, například infikovaných lidským virem imunitní nedostatečnosti (HIV), se jich může vytvořit několik.

Za 3-6 týdnů se tvrdý vřed spontánně vyhojí a o 2-12 týdnů později se objeví příznaky sekundární syfilitidy. Jsou velmi rozmanité morfologií i lokalizací, nejčastěji se na kůži trupu a končetin vytváří makulopapulózní exantém, který je vysoce infekční.

Příznaky pozvolna mizí a nastává období bez klinických projevů. Relaps sekundární syfilitidy je zcela běžný. Pacienti v pozdním latentním stadiu onemocnění se považují za neinfekční. Ženy však mohou infekci přenést na plod během těhotenství a jeho krev je pak nakažlivá.

Pozdní nebo terciální syfilis, která se projeví desítky let po primární infekci, je pomalé progredující destruktivní zánětlivé onemocnění, jež postihuje orgány bez predilekce. Třemi nejčastějšími formami pozdní syfilitidy jsou *neurosyphilis*, *kardiovaskulární syphilis* a *gumma* - vzácná granulomatózní léze kostí, kůže nebo sliznic (Greenwood 1999).

7. Neurosyphilis

Neurosyphilis patří do rámce orgánové syfilidy. V komplikované imunitní odpovědi na treponemovou infekci se u neurosyphilis vedle tvorby protilátek významně uplatňuje buňkami zprostředkovaná imunita. Od dalších nejčastějších forem pozdní syphilis (kardiovaskulární syphilis, gummata) se neurosyphilis liší možností současné přítomnosti zánětlivých patologických pochodů i degenerativních změn, což vede k velmi pestrému klinickému obrazu onemocnění.

Nejdůležitějšími a nejčastějšími formami jsou progresivní paralýza a tabes dorsalis, proto se udržela představa, že neurosyphilis je příznakem III. stadia. Ve skutečnosti nejméně u 40 % pacientů napadá *T. p. pallidum* CNS již během časného stadia syfilitické infekce.

Invaze *T. p. pallidum* do CNS je indikována změnami v mozkomíšním moku (CSF), zejména pleiocytózou a elevací proteinů. Tyto změny se však ve většině případů do dvou let normalizují. Pokud přetrvávají déle než dva roky od počáteční infekce a dosahují kvantitativně vyšších hodnot, je podstatně vyšší riziko vývoje symptomatické neurosyphilis.

Takto progreduje v prvních 10 letech infekce do klinicky manifestované neurosyphilis cca 20 % případů neléčené asymptomatické neurosyphilis a s postupem času toto procento dále narůstá. Naproti tomu pacienti s neléčenou syphilis a s normálním CSF pravděpodobně nejsou rizikováni pro vznik symptomatické neurosyphilis.

Pokud jsou přítomny pouze pozitivní likvorové nálezy bez přítomnosti klinické symptomatologie, hovoříme o asymptomatické neurosyphilis. Významný výskyt likvorových nálezů v časném stadiu

(projevy lues II. stadia a časná latence) ukazuje, že k postižení CNS může docházet prakticky ve všech stadiích lues, a proto je u všech případů syfilis zachycených po I. stadiu nutno provést vyšetření likvoru (Zdravotnické noviny).

8. Vrozená syfilis

U kongenitální syfilis se plod infikuje transplacentárně od nakažené matky. I když se vrozená syfilis již zdála blízko vymýcení, globální změny v průběhu posledních dvou desetiletí vedly k tomu, že se infekce znovu objevila. V České republice osciluje po roce 1989 incidence vrozené příjice kolem 10 případů ročně (Zákoucká 2006). Svou roli ve znovuobjevení vrozené syfilis sehrály drogy, prostituce a další faktory vedoucí k šíření infekce do populace (Křemenová 2006).

Dříve se tvrdilo, že v prvních 16 týdnech těhotenství existuje vůči transplacentárnímu přenosu *Treponema pallidum* bariéra. Tato představa se neshoduje s novějšími poznatky a byla už opuštěna. Naopak, *T. p. pallidum* se podařilo prokázat v potracených plodech starých asi 10 týdnů a v amniové tekutině kolem 16. týdne gravidity (Nathan 1997). Plod je tedy ohrožen v celém průběhu těhotenství. V časném těhotenství se ale nevyvíjí charakteristická histopatologická odpověď na infekci.

Počty případů kongenitální syfilis v podstatě kopírují počty primární a sekundární syfilis u mladých žen (Radolf 1999). Přenosnost je nejvyšší během úvodních fází onemocnění, kdy probíhá diseminace původce. Činí 70 - 100 % během primární a sekundární fáze onemocnění, 40 % u časné latentní syfilis a 10 % během pozdní latentní syfilis. Celkově tedy platí, že čím starší je infekce matky, tím menší je pravděpodobnost nákazy dítěte (Pospíšil 1981). Tento poznatek se někdy označuje jako Kassowitzovo pravidlo.

9. Diagnostika syfilis – přímý průkaz

Hlavním omezením přímé diagnostiky *T. p. pallidum* je neschopnost kultivace na umělých kultivačních médiích. Po rozvinutí ulcus durum je možno *Treponemata* dokázat v exsudátu ze spodiny vředu nebo z jiné kožně-slizniční léze, prokazatelná jsou také v lézích sekundární syfilis nebo vrozené syfilis (Pospíšil 1981).

Klinickým materiálem pro přímý důkaz může být stěr z ulcerací suchým tampónem, plná krev, sérum, tkáň, punktát a v neposlední řadě také mozkomíšní mok.

9.1 Mikroskopie v zástinu

Nejstarší a nejjednodušší přímou metodou je mikroskopie v zástinu. Vyžaduje však zkušeného pracovníka, má omezenou citlivost a v případě přítomnosti nepatogenních spirochét může vést k falešným výsledkům.

Podstata mikroskopie v zástinu spočívá v tom, že do roviny objektu vstupují z kondenzoru pouze okrajové, velmi šikmé světelné paprsky, zatímco středové paprsky jsou pohlceny a při zobrazení se neuplatní. Objekt je tedy osvětlen jen ze stran, paprsky se od něj odrážejí a lámou. Do objektivu vstupují jen paprsky odražené od povrchu objektu a ten proto září v temném poli.

Mikroskopii v zástinu je nutno provádět přímo v dermatovenerologické ordinaci z důvodu krátké životaschopnosti treponemat a to ihned po odběru materiálu z léze. Odběr by měl být serózní, jelikož přítomnost tkání či krve může komplikovat pozorování treponemat (Kennedy 1998). V zástinu se dají vyšetřit mimo jiné i další tělní tekutiny jako je punktát z regionálních lymfatických uzlin (Baranton 1995). Při odběru by se neměly používat desinfekční přípravky a roztoky, protože hrozí naředění vzorku a tím i znemožnění správného vyšetření (Larsen 1995).

Senzitivita mikroskopie v zástinu se pohybuje okolo 80 % (Daniels 1977, Romanowski 1987). Při malém množství treponemat v lézi nelze pozitivní výsledek vyloučit, zvláště u hojících se lézí či po nasazení terapie místní či celkové. *T. p. pallidum* lze lehce zaměnit s nepatogeními spirochetami, které jsou běžně přítomné na sliznicích člověka. Na lidském genitálu lze běžně najít *Treponema refringens* a *T. phagedenis*, které snižují specifitu mikroskopie v zástinu (Zákoucká 2007).

9.2 Přímá imunofluorescence

Tato metoda využívá vazbu mezi treponemami a značenými protilátkami. Pokud při této metodě použijeme monoklonální značené protilátky, stává se metoda citlivější a specifitější. Přímá imunofluorescence (DFA-TP, Direct Fluorescent Antibody test for *T. pallium*) se používá místo mikroskopie v zástinu. Citlivost přímé fluorescence se tak blíží PCR (Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce) zejména při vyšetření materiálu z čerstvé léze. Potom se citlivost metody blíží 100 %. Stejně jako u mikroskopie v zástinu ani negativní výsledek DFA-TP nemůže pozitivitu vyloučit.

9.3 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce je amplifikační metoda pro průkaz specifických konzervativních úseků genomu. Využití PCR k přímému průkazu DNA *T. p. pallidum* v suspektních lezích a v likvoru přináší téměř 100% specifickosti (treponemata, která se vyskytují v naší zeměpisné oblasti mají pouze 5% homologii genomu s *T. p. pallidum*). Citlivost testu je srovnatelná s izolací původce syfilis na králíkovi (RIT -rabbit infectivity testing) a blíží se 1 mikroorganismu/5 μ l. Jako biologický materiál pro průkaz přítomnosti mikroba lze použít stěry z lézí, biopsii, plnou krev, cerebrospinální tekutinu, tkáň, amniovou tekutinu, placentární trofoblastické klky, do parafinu zalité tkáně. Vzorek není nutné zpracovávat bezprostředně po odběru a je možné jej přepravovat bez zvláštních opatření, pokud je cílovou molekulou DNA. Stanovení přítomnosti *T. p. Pallidum* v CSF je specifické (není zkřížená reaktivita s borreliemi či jinými bakteriemi, případně viry) a má rozhodující vliv na prognózu onemocnění i strategii terapie.

V případě využití PCR lze při diagnostice syfilis congenita dosáhnout maximální možné spolehlivosti vyloučením interference s organizmem matky v důsledku pasivního přenosu protilátek. Multiplexní PCR umožňuje současný průkaz více původců (mikrobiálních i virových) genitálních lézí z jednoho vzorku.

Klinický materiál pro PCR lze snadno skladovat při pokojové teplotě a výhodou je, že lze opakovaně zmrazovat a rozmrazovat, bez výrazného ovlivnění detekčních možností PCR (Villanueva 1998). I přes vysokou citlivost amplifikačních metod zůstává hlavním omezením malý obsah treponemat v klinických materiálech jako je například krev a likvor.

Molekulárně biologických technologií, včetně PCR, lze použít i k průkazu příčiny rezistence *T. p. pallidum* na antibiotika např. makrolidy, tetracykliny.

Přístroj LightCycler[®] 2.0 Instrument slouží k provádění rychlé PCR (polymerázové řetězové reakce) s detekcí v reálném čase a/nebo ke kvantifikaci cílové NA (nukleové kyseliny) a dále k následné (post-PCR) analýze amplifikované NA analýzou křivky tání (Roche-diagnostics.cz).



Obrázek 2 Přístroj LightCycler 2.0 sloužící k provádění rychlé PCR
(zdroj: <http://www.roche-diagnostics.cz/produkty/pcr/lightcycler.aspx>)

9.4 Histologické techniky

Histologické metodiky jsou převážně využívány v patologii a nejsou zcela specifické pro *T. p. pallidum*. Jedná se o zdlouhavé vyšetření zatížené řadou artefaktů. Mezi nevýhody patří, že stříbro impregnuje i mnohé další mikroorganismy, proto hlavním identifikačním znakem je morfologie zachyceného organismu. Provádí se impregnace stříbrem dle Steinerja nebo Whartinova-Starryho metoda (Steiner 1950).

Mezi histologické techniky by se dal rovněž zařadit i přímý fluorescenční test na protilátky – DFA-TP (Direct Fluorescent Antibody – *T. Pallidum* assay). Z fixovaných tkání je také možné prokázat treponemata pomocí PCR. Obě metody jsou citlivější a specifitější než stříbření a měly by dostat při analýze tkání přednost (George 1998, Wicher 1999).

9.5 Izolace na králíkovi

I přes četné pokusy kultivovat *T. p. pallidum* na různých půdách, zůstává očkování na zvířatech jediná vhodná metoda k izolaci i množení. Umožňuje vyšetřit široké spektrum materiálu oproti mikroskopickým metodám. Použit lze v podstatě jakýkoliv klinický materiál, který je nutné okamžitě zamrazit nebo naočkovat do 60 minut po odběru. Inkubační doba je nepřímou úměrná množství inokula (Larsen 1995)



Obrázek 3 Novozélandský bílý králík - plemeno používané pro RIT
(zdroj: <http://kchkmp.wz.cz/plemena.html>)

Testování infekčnosti na králíkovi je technicky náročné a nákladné a vyžaduje až 90 dnů k získání výsledku. Proto je izolace na králíkovi -RIT (Rabbit Infectivity Testing) vhodný pouze pro výzkum, výjimečně ke srovnání citlivosti nově zaváděných metod a jako zlatý standard pro účely hodnocení testů. Dříve se užívala k odlišení nevenerických trepanematóz.

Experimentálně lze užít k pasáži *T. p. Pallium* i jiná laboratorní zvířata jako je morče a to zejména při modelování přenosu infekce z matky na plod a poškození plodu.

10. Diagnostika nepřímá – serologie

Sérologická diagnostika je stěžejním nástrojem v diagnostice syfilis. Reakce užívané v sérologii syfilis lze rozdělit dle povahy použitého antigenu na netreponemové (nespecifické) a reakce treponemové (specifické).

Netreponemové testy detekují nespecifické protilátky případně kardiolipin, což je fosfolipid tvořící součást buněčných membrán. Nespecifické protilátky po účinné léčbě během několika týdnů až měsíců vymizí, ale specifické IgG zůstávají detekovatelné dlouhodobě (Woznicová 2007).

Mezi tyto reakce můžeme zahrnout VDRL (Venereal Diseases Research Laboratory), RRR (Rychlá Reaginová Reakce) a RPR (Rapid Plasma Reagin) test.

Treponemové testy detekují specifické protilátky proti *T. p. pallidum*. Do těchto testů můžeme zahrnout např. TPHA (Treponema pallidum hemagglutination), FTA-Abs (Fluorescent Treponemal Antibody – absorbet) a v neposlední řadě EIA (Enzyme immuno assay) testy.

10.1 Humorální imunitní odpověď

Humorální imunitní odpověď se dá zachytit obvykle nejdříve ve druhém týdnu infekce, kdy se objevují protilátky třídy IgM. Ty jsou během dalších dvou týdnů následovány tvorbou IgG, které často dosahují vyšších hladin než IgM (Luger 1988). Syfilis navozuje u primární infekce odpověď zejména ve třídě IgG1 a u sekundární syfilis ve třídách IgG1 a IgG3 (Baughn 1988, Versalovic 1990).

Stěžejními antigeny, vůči kterým je cílena humorální odpověď, jsou specifické polypeptidy o molekulové hmotnosti 15, 17, 33, 37, 39, 43, 45, 47 a 49 kDa (Larsen 1998, Norris 1993, Wicher 1989). Molekulové hmotnosti se podle různých prací nepatrně odlišují.

Nověji byl charakterizován antigen Tp0453, který patří mezi proteiny zevní membrány a proti němuž je cílena vysoce specifická protilátková odpověď (Hazlett 2001). Rekombinantní Tp0453 má excelentní schopnost detekovat primární syfilis již u pacientů, kteří jsou ještě VDRL-negativní (uvádí se dokonce citlivost 100 % a specifická 100 %). Podobně Tp92 vykazuje citlivost 98 % a specifickou 97 %, takže jsou oba slibnými antigeny pro metodu ELISA, neboť zkracují obávané diagnostické okno (Voorhis 2003).

10.2 Reakce netreponemové

Netreponemové reakce se používají v kombinaci s treponemovými testy ke screeningu syfilis, k posouzení aktivity choroby a úspěšnosti léčby. Jsou však zatíženy 2 - 10 % falešně pozitivních výsledků a také falešně negativních reakcí (zonální fenomén 2%, u pozdní latentní syfilis až 30 % reakcí) (Zákoucká 2001).

Netreponemové testy zahrnují průkaz nespecifických antikardiolipinových protilátek v různých formátech, jako jsou RPR (Rapid Plasma Reagin) – makroskopické hodnocení testu, RRR (Rychlá Reaginová Reakce), či reakce označovaná jako VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) – obě reakce vyžadují mikroskopický odečet.

V praxi jsou zastoupeny celou řadou komerčních preparátů, jejichž citlivost a specificita jsou srovnatelné. Pozitivita reakce nastupuje cca 1-2 týdny po vzniku tvrdého vředu. Reakce je rychlá a jednoduchá, při semikvantitativním stanovením titru protilátek lze sledovat jejich pokles po léčbě a hodnotit její úspěšnost. Vzhledem k tomu, že se kardiolipin (cílová determinanta protilátek) vyskytuje jak v lidských membránách, tak i v treponematech, jsou zaznamenávány relativně častěji biologicky falešně pozitivní reakce.

10.2.1 Rychlá reaginová reakce

Principem RRR (Rychlá Reaginová reakce) je precipitace kardiolipinového antigenu protilátkami v pacientově séru. Precipitace je viditelná pouhým okem. Metoda slouží ke stanovení protilátek v séru nebo mozkomíšním moku pacienta a hodí se ke sledování úspěšnosti léčby.



Obrázek 4 Rychlá reaginová reakce
pozitivní výsledek - shluky kardiolipinu (precipitáty) při 4-násobném zvětšení
(zdroj: <http://www.medmicro.info/portal/index.html>)

10.2.2 VDRL (Venereal disease research laboratory)

VDRL je flokulační (precipitační) test na sklíčku a zároveň jediný standardizovaný test doporučený WHO (World Health Organization) pro vyšetření likvoru. Je metodou volby pro vyšetřování neurosyfilis (Wicher 1999). Existují také testy s VDRL antigenem ve formátu ELISA. Metoda ELISA je všeobecně citlivější než flokulační testy, což platí i pro diagnostiku syfilis (Wicher 1999).

10.2.3 RPR (Rapid Plasma Reagin)

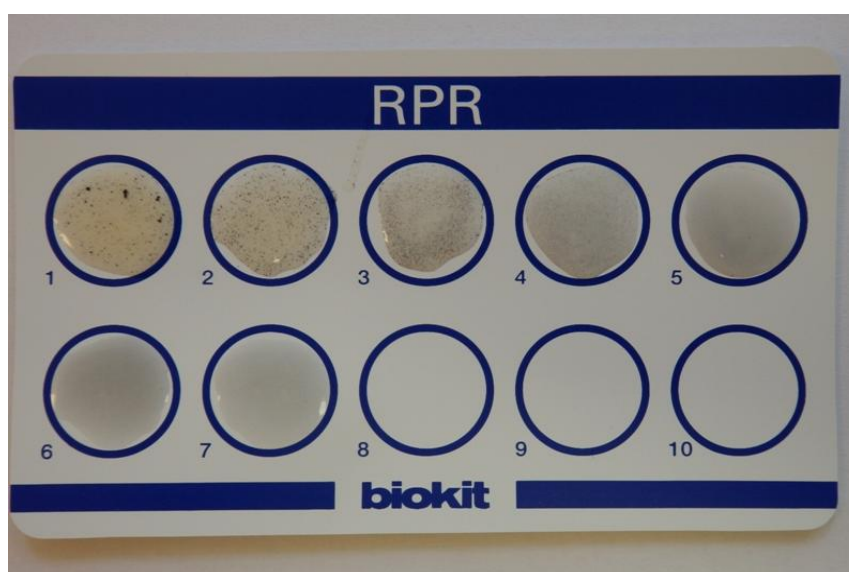
Protilátky obsažené v séru pacienta, umožňují vznik aglutinační reakce suspenze kardiolidových antigenů (V.D.R.L. modifikovaných) adsorbovaných na karbonových částicích. Karbonové mikročástice umožňují makroskopicky snadné určení aglutinace u pozitivních vzorků. (GALI.cz). Reakci lze provést kvalitativně či při pozitivním výsledku semikvantitativně s odečtem titru protilátky (viz. tabulka č. 2).

Tabulka 2 Semikvantitativní RPR test – ředění, provedení a interpretace testu
(zdroj: Autor)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|--|--|-----------------------|-----|-----|------|------|------|
| fyziologický roztok (μl) | - | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| vzorek (μl) | 50 | 50 | - | - | - | - | - |
| smíchání a přenos (μl) | | ↳50 ↳50 ↳50 ↳50 ↳50 → | | | | | |
| ředění | 1:1 | 1:2 | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 |
| ke každému ředění přidat 1 kapku antigenu (17μl) | | | | | | | |
| pozitivní reakce | čistá aglutinace během 8 minut rotace na vortexu; titr odpovídá poslední, jasně viditelné aglutinaci | | | | | | |
| negativní reakce | bez aglutinace po 8 minutách vortexu | | | | | | |

Falešně pozitivní reakce může nastat hlavně u vzorků od osob užívajících drogy, u nemocných trpících leprou, malárií, toxoplasmózou, infekční mononukleózou, virovou pneumonií a v těhotenství.

Naopak falešně negativní výsledky při evidentních klinických příznacích syfilis mohou nastat v časném primárním i sekundárním stadiu syfilis. Metoda není vhodná pro testování mozkomíšního moku (GALI.cz).



Obrázek 5 RPR (Rapid plasma reagin) test
 Praktické provedení. Pozitivní reakce až do ředění 1:16 - č.4. (Zdroj: Autor)

Senzitivita metody se udává u primární syfilis 86%, sekundární syfilis 100%, latentní syfilis 98%, a terciární 73%. Specificita v porovnání s jinou komerčně dostupnou metodou dosáhla 100% u 77 testovaných vzorků (GALI.cz).

10.2.4 Falešně pozitivní a negativní výsledky v netreponemových testech

Jak už bylo výše řečeno, netreponemové testy jsou zatíženy poměrně vysokým procentem (2-10%) falešně pozitivních výsledků. Dlouhodobě izolovaně pozitivní netreponemový test by měl být impulzem k detailnímu internímu vyšetření možných příčin (autoimunitní onemocnění, maligní onemocnění, antifosfolipidový syndrom apod.). Opačným problémem může být výskyt falešně negativních reakcí (v počátku onemocnění před sérokonverzí; u pozdní latentní syfilis představuje až 30% případů; zonální fenomén u akutní syfilis).

Zonální fenomén se může projevit u sér s vysokým titrem specifických a nespecifických protilátek v době akutní syfilis (1-2%) a znamená nezachycení aktivního infekčního onemocnění. V neředěném séru je pak výsledek testu negativní. Se stoupajícím ředěním dochází k rozvoji pozitivní reakce až do konečného bodu titrace. Vzhledem k uvedeným skutečnostem není vhodné používat netreponemové testy jako jediný screeningový test (Zákoucká, web SZÚ.cz)

Akutní příčiny falešně pozitivních výsledků (trvání méně než 6 měsíců)

- Virové hepatitidy
- Příušnice
- Infekční mononukleóza
- Plané neštovice
- Ostatní virové infekce
- Malárie
- Rozsáhlý infarkt myokardu
- Rozsáhlé poškození tkáně – popáleniny
- Očkování
- Gravidita
- Užívání drog

Chronické příčiny falešně pozitivních výsledků (trvání déle než 6 měsíců)

- Autoimunitní onemocnění
- Abnormality imunoglobulinů
- Užívání drog
- Stáří
- Lepra
- Malignity
- Nevenerické treponematózy

(Larsen 1995)

10.3 Reakce treponemové

Treponemové reakce lze rozdělit na reakce vyhledávací a konfirmační. Reaktivita ve vyhledávacích testech se musí potvrdit testy konfirmačními.

Vyhledávacími reakcemi jsou TPHA (*T. Pallidum* HemAgglutination), TPPA (*Treponema Pallidum* Particle Agglutination), ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay - Imunoenzymatické stanovení protilátek) stanovující celkové nebo IgG protilátky, případně imunochromatografické testy.

Pro konfirmaci syfilis slouží FTA-ABS, FTA-ABS IgM, 19S IgM FTA-ABS, westernblot IgM a IgG, 19S IgM SPHA a immunoline assay IgG (Zákoucká 2007).

Testy jsou dostupné pro detekci jednotlivých tříd protilátek – IgG a IgM, nebo pro všechny společně. Nástup pozitivita je individuální i ve vztahu k použité metodě – FTA – ABS IgG již od 2. týdne po infekci patogenem. Průměrně však 4.-5. týden po infekci. Protilátky ve třídě IgG přetrvávají celý život i po úspěšné léčbě. Procento nespecificky pozitivních reakcí je výrazně nižší než u netreponemových testů, rovněž falešně negativní výsledky jsou méně časté.

Antigeny používané v reakcích jsou buď přirozeného původu (z kmene Nichols *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*), případně se jedná o rekombinantní proteiny, či syntetické peptidy produkované geneticky manipulovanou kulturou *Escherichia coli*. (Zákoucká, SZÚ).

10.3.1 *T. pallium* hemagglutination (TPHA)

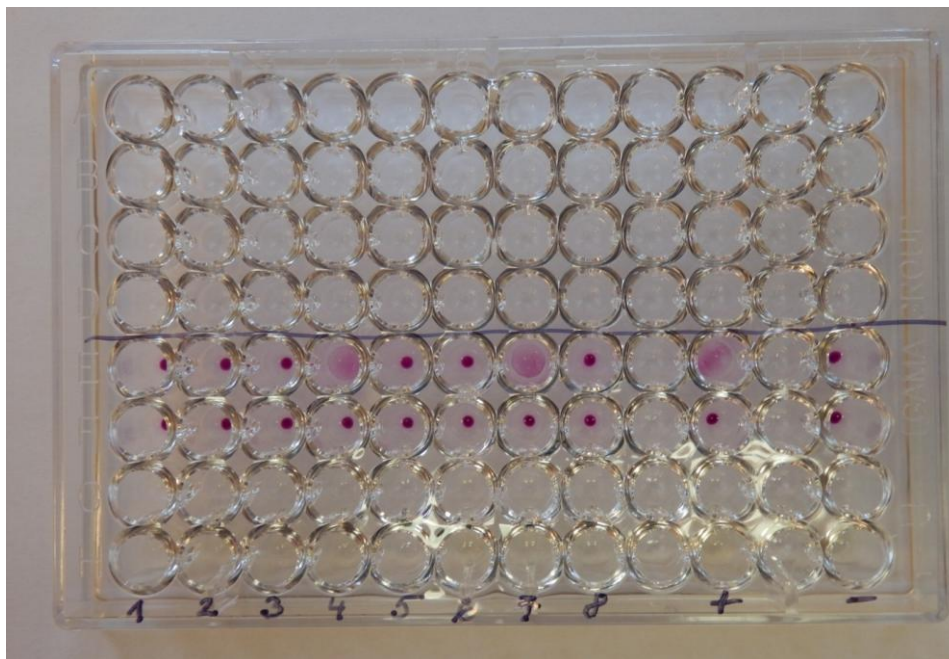
TPHA se řadí díky své citlivosti, jednoduchosti a finanční dostupnosti mezi vyhledávané screeningové testy (Woznicová 2007, Zákoucká 2007). Při sérokonverzi je to jedna z prvních pozitivních séroreakcí. Citlivost TPHA u primární syfilis se uvádí mezi 69 - 90 %, u sekundární syfilis až 100 % , později kolem 97 %. Specificita je 98 – 100 % (Larsen 1995).

V TPHA reagují specifické protilátky vzniklé při syfilis s antigenem Nicholsova kmene *T. p. pallidum* naneseným na krutých erythrocytech. Sérum obsahující protilátky proti treponematům aglutinuje (shlukuje) červené krvinky za vzniku typického povlášku erythrocytů - aglutinátu.

Kvantifikace protilátkové odpovědi u TPHA nemá na rozdíl od netreponemových testů velký význam, jelikož TPHA neodráží aktivitu infekce a je tedy spíše „sérologickou jizvou“, která přetrvává dlouhodobě i po úspěšné léčbě. Pasivní hemagglutinační zůstává někdy jedním z mála validních svědectví o infekci *T. p. pallidum* v minulosti (Larsen 1995, Woznicová 2007). U časně

léčené syfilis nastává vymizení protilátek poměrně zřídka a u případů léčené pozdní syfilis zůstává TPHA obvykle pozitivní (Pospíšil 1981, Woznicová 2007).

TPPA (*Treponema Pallidum Particle Agglutination*) je obdoba TPHA, kde jako nosič specifických antigenů nefiguruje krvinka, ale želatinová částice. Výrobek má proto vyšší stabilitu a snad i specifitu.



Obrázek 6 TPPA (*Treponema Pallidum Particle Agglutination*) test - č. 4 a č.9 pozitivní výsledek, + pozitivní kontrola, - negativní kontrola (zdroj: Autor)

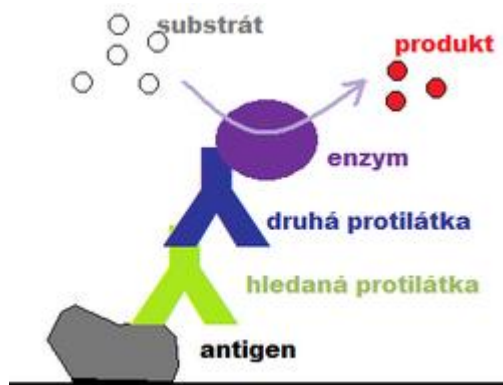
10.3.2 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

ELISA, někdy také označovaná EIA (Enzyme Immuno Assay) je jednou z nejpoužívanějších imunologických metod sloužících k detekci protilátek proti různým antigenům *T. p. pallidum*, například proti celým treponematům nebo proti antigenům rekombinantním. ELISA využívá dvou základních vlastností imunoglobulinů, a to schopnosti proteinů vázat se na povrch plastů (např. polystyrenu) a dále i schopnost vázat enzym na Fc fragmenty imunoglobulinových molekul. Stanovovat se mohou protilátky třídy IgM, IgG, případně celkové protilátky.

Celkové stanovení protilátek je poněkud výhodnější, a proto se často používá jako základní screeningové vyšetření, jelikož na počátku onemocnění mohou být po určitou dobu zachytitelné pouze IgM protilátky (Larsen 1998). Můžeme také pozorovat potlačení protilátkové odpovědi ve

třídě IgG, a to při včasné diagnóze a bezprostředně navazující léčbě. Naopak protilátky třídy IgM se nemusí u dospělých vůbec zachytit. Klíčovou roli hraje detekce IgM protilátek u dětí narozeným luetičkám, kde jejich nález může svědčit o vrozené syfilis (Sanchez 1989).

Principem reakce je, že specifické IgM nebo IgG se váží na antigeny *T. p. pallidum* v důlku mikrotitrační destičky potažmo na mikropartikule. Poté po odmytí nenavázaných protilátek přidáváme konjugát, který obsahuje protilátky proti hledaným protilátkám s kovalentně navázaným enzymem. Ten katalyzuje chemickou přeměnu substrátu, který je přidán do reakční směsi, na barevný produkt. Stanovuje se pak spektrofotometricky (s chromogenním substrátem) nebo na základě fluorescence. Koncentrace produktu je úměrná koncentraci protilátky ve vzorku.



Obrázek 7 Schéma ELISA metody
(zdroj:<http://www.wikiskripta.eu/index.php/ELISA>)

Výhodou reakce ELISA je především snadná automatizace a standardizace metody s objektivními výsledky. Bývá však často dražší než například TPHA, jehož nevýhodou je ale subjektivní odečet.

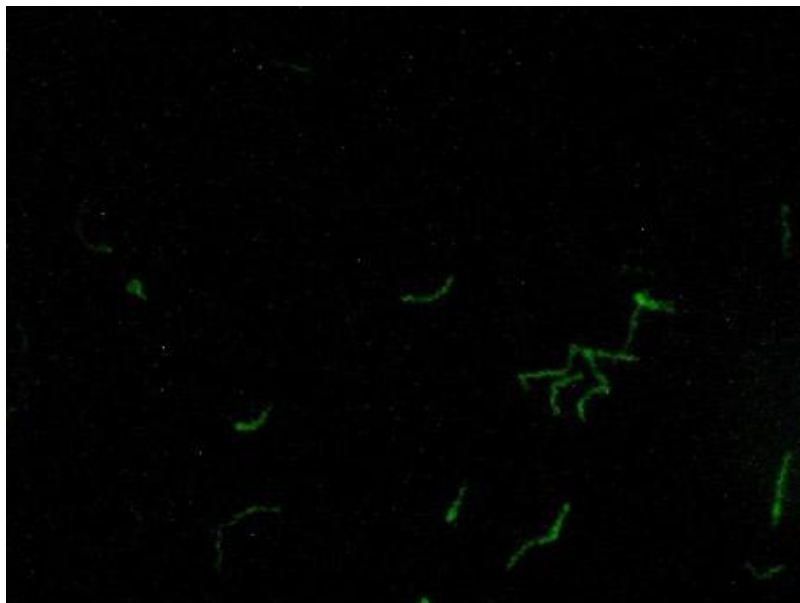
10.3.3 Imunofluorescenční reakce

Test FTA-ABS (Fluorescent Treponemal Antibody – absorbed) není určen pro běžné použití nebo jako screeningový postup. Jeho hlavní význam spočívá v rozlišení netreponemových falešně pozitivních výsledků a stanovení diagnózy již na samém počátku onemocnění, a to zhruba od 2.-3. týdne nemoci.

FTA-ABS je velmi citlivá metoda, u primární lues se pohybuje mezi 70 – 100 %, u sekundární a u latentní lues až 100 %. Specifická je o něco nižší než u hemaglutinace, asi 97% (Larsen 1995).

Principem metody je navázání specifických protilátek IgG a IgM na antigeny Nicholsova kmene *T. p. pallidum*, které jsou navázány na speciálním mikroskopickém podložním sklíčku. Na vzniklý komplex antigen – protilátky se naváže další, fluoresceinem značený imunoglobulín (tzv. FITC), a výsledkem je viditelné žlutozelené světélkování, které odečítáme ve fluorescenčním mikroskopu.

Hodnocení této imunofluorescenční reakce je subjektivní a vyžaduje dlouhodobou zkušenost. Takto mohou být určeny také izolovaně IgM protilátky nebo frakce IgM v reakci 19S IgM FTA-ABS (Larsen 1998).



Obrázek 8 Pozitivní výsledek FTA-ABS - ostře zelená fluorescence spirálek trepatom
(zdroj: <http://www.medmicro.info/portal/index.html>)

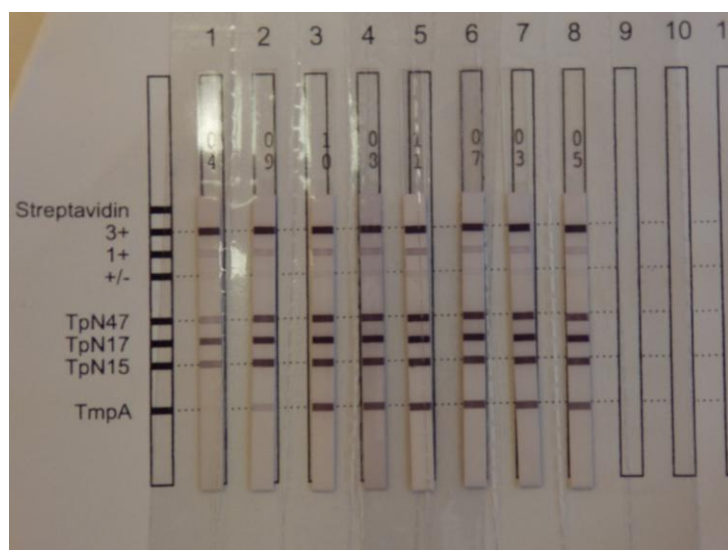
Jako materiál pro FTA-ABS můžeme použít sérum či mozkomíšní mok. Sérum by nemělo být hemolytické, chylózní a obsahovat větší množství bakterií, které by mohly vadit při odečítání výsledků. Dále vyžaduje odstranění rušivých, méně specifických protilátek, které mohou do reakce vstupovat a ovlivňovat ji, ale často s vlastním syfilis nesouvisejí (Larsen 1998). K odstranění těchto zkříženě reagujících protilátek se používá tzv. sorbent, který obsahuje antigen připravený z *T. phagedenis* a tím se sérum před vlastní reakcí tzv. vysytí. Typickou příčinou falešně pozitivních výsledků u FTA-ABS je např. systémový lupus erythematosus. I přes použití sorbentu ovšem nelze vždy falešné pozitivitu zabránit (George 1998)

10.3.4 Westernblot

Westernblot (WB) představuje molekulární charakterizaci humorální imunitní odpovědi na *T. p. pallidum*, protože umožňuje stanovit protilátky (IgM nebo IgG) specificky proti spektru treponemálních proteinů (Byrne 1992, Meyer 1994, Sanchez 1989).

Předností westernblotu je především citlivost detekce i nízké hladiny protilátek v séru pacienta v začátku infekce, kdy je často citlivější než FTA-ABS (Backhouse 2001). Dle studie prováděné MUDr. Zákouckou (2007), která porovnávala dvanáct sérologických metod (různé typy ELISA a FTA, VDRL, TPHA, westernblot) je z testovaných metod bez ohledu na fázi infekce stanovení IgG westernblotem citlivější. Další studie ukazuje výrazněji lepší výsledky u problematických sér s reaktivitou pouze v jednom treponemovém testu, kde shoda mezi WB a TPPA (61,5 %) byla výrazně lepší než mezi WB a FTA-ABS (38,5 %). Z toho vyplývá použití WB jako dalšího konfirmačního testu nebo jako alternativa k FTA-ABS (Backhouse 2001).

Princip testu je v navázání specifických IgG nebo IgM na odpovídající antigeny *T. p. pallidum* na membráně westernblotu. Vazba se prokáže reakcí konjugátu (protilátek proti hledaným protilátkám značených enzymem) se substrátem, což vede k vývoji barevných pruhů v místech specifických antigenů.



Obrázek 9 Westernblot - detail proužků s pozitivní reakcí
Firma INNO-LIATM Syphilis score (zdroj: Autor)

10.3.5 Falešně pozitivní příčiny v treponemových testech

Příčiny dlouhodobě falešně pozitivních výsledků:

- Autoimunitní onemocnění
- Abnormality imunoglobulinů
- Nevenerologické treponematózy
- Malignity
- Drogová závislost

Bezprostřední příčiny falešně pozitivních výsledků:

- Hepatitidy
- Borrelióza
- Infekční mononukleosa
- Malárie
- Očkování
- Užívání drog
- Idiopatické

(Larsen 1995)

11. Léčba

Léčba syfilis je doménou dermatovenerologie. Stále platí, že základem terapie syfilis je podávání penicilinu. Ten byl do léčebného arzenálu zaveden již v roce 1943 a dosud ho žádné antibiotikum nepřekonalo. Léčba penicilinem je nejefektivnější. Důležité je samozřejmě léčit co nejčasněji.

Optimální terapií syfilis je penicilin aplikovaný parenterálně (Resl 2002). Doporučuje se prokain penicilin a benzathin penicilin. Časná syfilis se obvykle léčí 15 dní, pozdní syfilis až 21 dnů. Schémata se v různých zdravotnických zařízeních liší. U kongenitální syfilis záleží na tom, zdali je nebo není postižen CNS. Neurosyfilis vyžaduje podání penicilinu intravenózně (Resl 2002) a má vůbec své specifické rysy. Nedají se například použít makrolidy, protože nevytvoří v likvoru účinné hladiny.

Alternativou v případě alergie na penicilinová antibiotika jsou makrolidy nebo doxycyklin (Resl 2002). Z makrolidů se doporučuje spiramycin, doxycyklin je v těhotenství kontraindikován.

Tabulka 3 Léčba hlášených případů syfilis podle druhů užitých antibiotik (zdroj: ÚZIS)

| Druh antibiotika | Syfilis | | | | |
|-----------------------------|----------------|--------------|---------------|---------------------------|-------------------|
| | vrozená A50 | časná A51 | pozdní A52 | jiná a neurčená A53 | celkem A50–A53 |
| Amoxicilin | 1 | 2 | - | - | 3 |
| Azithromycin | - | 5 | - | - | 5 |
| Benzathin - Penicilin | 3 | 262 | 35 | 100 | 400 |
| Benzyl - Penicilin | 1 | 273 | 60 | 73 | 407 |
| Ceftriaxon | - | 3 | - | - | 3 |
| Doxycyklin | - | 26 | 2 | 9 | 37 |
| Erythromycin | - | - | - | - | - |
| Ofloxacin, Ciprofloxacin | - | - | - | - | - |
| Spectinomycin | - | 1 | - | - | 1 |
| Tetracyklin | - | 6 | 3 | - | 9 |
| jiná ATB | - | 33 | 14 | 26 | 73 |
| neléčen | - | 7 | 13 | 23 | 43 |
| Celkem ¹⁾ | 5 | 618 | 127 | 231 | 981 |

¹⁾ Od roku 2004 je možno uvádět kombinaci více druhů užitých antibiotik u jednoho případu onemocnění. Z tohoto důvodu převyšuje celkový součet počet hlášených případů pohlavních onemocnění.

12. Legislativa v České Republice

První zákonná norma v prevenci pohlavních nemocí byla v ČR přijata již v roce 1922 (Zákoucká 2007). Dnes je legislativa v této oblasti upravena hned několika nařízeními.

Z nejdůležitějších uved'me:

- Zákon č. 258/2000 Sb. o předcházení infekčních nemocí
- Vyhláška MZ ČR č. 143/2008 Sb. o požadavcích na zajištění bezpečnosti a jakosti lidské krve a jejích složek
- Vyhláška MZ ČR č. 422/2008 Sb. o požadavcích na zajištění bezpečnosti a jakosti lidských tkání a buněk
- Předpis MZ ČR č. 306/2012 Sb. o podmínkách předcházení vzniku a šíření infekčních onemocnění a o hygienických požadavcích na provoz zdravotnických zařízení a ústavů sociální péče

Vyšetření na syfilis není indikováno vzhledem k povaze onemocnění pouze klinickým podezřením, ale je také součástí obligátních vyšetřovacích schémat (Zákon č. 258/00 Sb., Předpis 306/2012) u dárců krve, v rámci prenatální péče, u základního screeningu novorozenců, při předoperační přípravě a za hospitalizace.

Rozsah povinného základního vyhledávacího vyšetření na syfilis je specifikován v Předpisu č. 306/2012: §7. (3) Lékař provádí klinické a sérologické vyšetření na syfilis s použitím jedné nespecifické a jedné specifické reakce u

- a) všech těhotných žen ve třetím a sedmém měsíci těhotenství,
- b) pupečnickové krve každého novorozence,
- c) každé ženy před provedením interrupce,
- d) všech osob ve věku 15 až 65 let přijímaných k první hospitalizaci na oddělení venerologické,
- e) osob ve věku 15 až 65 let přijímaných na jiná než venerologická oddělení, pokud to lékař považuje za odůvodněné (<http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2008-143>)

13. Statistika

Zdrojem informací pro tuto práci je povinné Hlášení pohlavní nemoci, jemuž podléhají onemocnění pohlavní nemocí včetně reinfekcí, úmrtí na pohlavní nemoc a podezření z onemocnění nebo nákazy pohlavní nemocí na území České republiky.

Povinnému hlášení podléhá - syfilis - příjice - lues vrozená (A50), časná (A51), pozdní (A52), jiná a nespecifikovaná (A53).

Zpravodajskou jednotkou je každé, zpravidla dermatovenerologické, zdravotnické pracoviště bez ohledu na zřizovatele, které onemocnění diagnostikovalo. Jednotlivá hlášení jsou zaznamenávána do Registru pohlavních nemocí (RPN) prostřednictvím Krajských hygienických stanic (KHS).

Některé případy zahrnuté do statistiky příslušného roku mohou být diagnostikovány ještě v předcházejícím roce a naopak případy zjištěné koncem roku mohou být dohlášeny ještě počátkem roku následujícího. Jedna osoba může mít v průběhu roku hlášeno více případů stejného druhu onemocnění nebo různých pohlavních nemocí. Počet hlášení tak převyšuje celkový počet nakažených osob.

Na území České Republiky bylo v roce 2011 hlášeno do Registru pohlavních nemocí 1 452 případů pohlavně přenosných infekčních onemocnění, z toho 737 případů syfilis (dg. A50–A53) (ÚZIS 2012).

Tabulka 4 Vývoj počtu hlášených onemocnění syfilis dle jednotlivých diagnóz v letech 2001 – 2011 (zdroj: ÚZIS 2012)

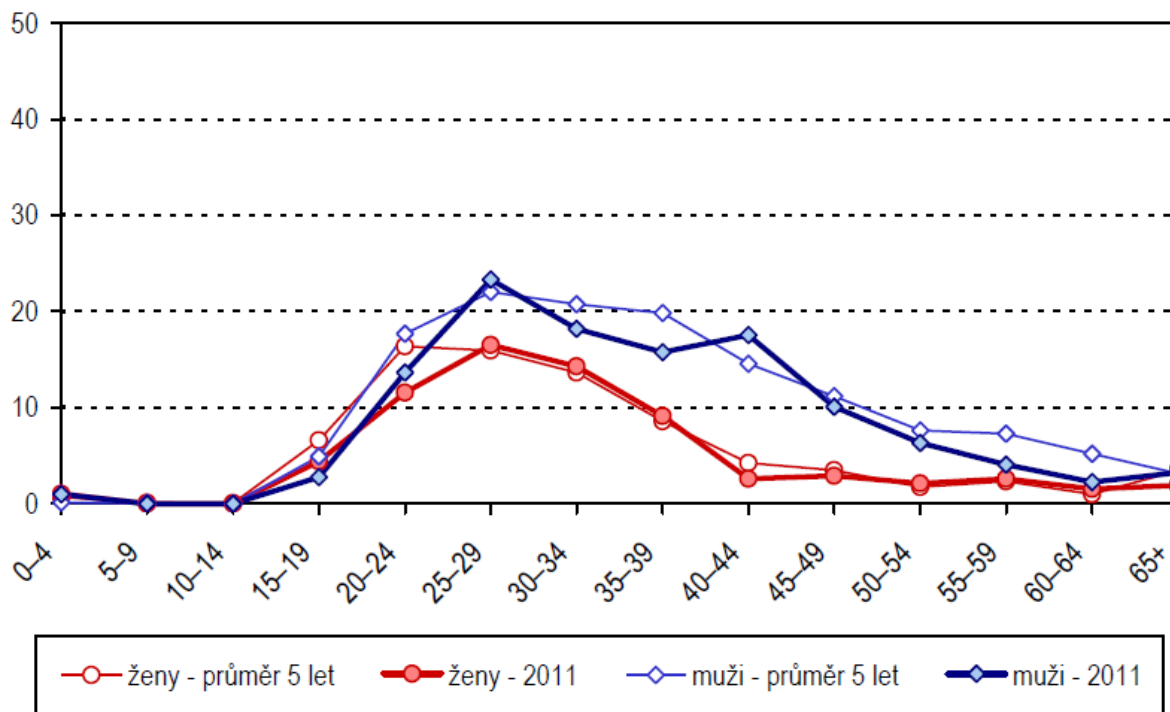
| Rok | Hlášená onemocnění - syfilis | | | | | | | |
|-------------|------------------------------|------------|------------|------------|---------------------|------------|------------|------------|
| | absolutně | | | | na 100 000 obyvatel | | | |
| | vrozená | časná | pozdní | jiná | vrozená | časná | pozdní | jiná |
| 2001 | 13 | 405 | 183 | 775 | 0,1 | 4,0 | 1,8 | 7,6 |
| 2002 | 7 | 304 | 154 | 511 | 0,1 | 3,0 | 1,5 | 5,0 |
| 2003 | 11 | 232 | 132 | 474 | 0,1 | 2,3 | 1,3 | 4,6 |
| 2004 | 10 | 225 | 118 | 331 | 0,1 | 2,2 | 1,2 | 3,2 |
| 2005 | 3 | 161 | 128 | 231 | 0,0 | 1,6 | 1,3 | 2,3 |
| 2006 | 6 | 177 | 123 | 196 | 0,1 | 1,7 | 1,2 | 1,9 |
| 2007 | 6 | 413 | 118 | 285 | 0,1 | 4,0 | 1,1 | 2,8 |
| 2008 | 2 | 513 | 128 | 207 | 0,0 | 4,9 | 1,2 | 2,0 |
| 2009 | 1 | 695 | 84 | 217 | 0,0 | 6,6 | 0,8 | 2,1 |
| 2010 | 3 | 702 | 77 | 240 | 0,0 | 6,7 | 0,7 | 2,3 |
| 2011 | 5 | 437 | 101 | 194 | 0,0 | 4,2 | 1,0 | 1,8 |

Vývoj výskytu onemocnění syfilis se vyznačuje, po výrazném nárůstu počtu hlášení téměř na dvojnásobek - z 4,9 až na 9,7 případů v přepočtu na 100 tisíc obyvatel mezi lety 2006 až 2010, znatelným poklesem o 28 % na 7,0 případů v roce 2011. Vzhledem k tomu, že se pokles výrazněji projevil u českých občanů, vzrostl mírně podíl cizinců na počtu onemocnění syfilis z 22 % na necelou čtvrtinu (24,6 %). Z celkového počtu hlášených případů syfilis činila 437 případů časná forma (59 %) dg. A51, 101 případů (14%) pozdní forma dg. A52 a 5 případů se týkalo vrozené syfilis u dětí dg. A50. Zbývajících 194 případů bylo určeno jako jiná či nespecifikovaná forma (26 %) dg. A53. Nejvíce se pokles projevil u časné formy, kde oproti předchozímu roku ubylo téměř 38 % případů, naopak u pozdní formy došlo k nárůstu o více než 31 %. V 89 % případů syfilis se jednalo o osoby infikované touto nemocí poprvé v životě a ve zbývajících 82 případech (11,1 %) šlo o opakované infekce (ÚZIS 2012).

Registrovaná pohlavně přenosná onemocnění se vyznačují výrazně vyšším výskytem u mužů než u žen. U syfilis činil počet hlášení na 100 tisíc mužů 9 případů ve srovnání s 5 případy na 100 tisíc žen.

Výrazné rozdíly v incidenci pohlavně přenosných nemocí se vzhledem k převažujícímu způsobu přenosu projevují i z hlediska věkového rozložení. U obou pohlaví byl nejvyšší výskyt syfilis zaznamenán ve věku 25 až 29 let s 23,3 případy na 100 tisíc mužů a 16,5 případy na stejný počet

žen téhož věku. Tyto intenzity z roku 2011 zhruba odpovídají i průměrným hodnotám z předchozích pěti let (ÚZIS 2012).



Graf 1 Incidence syfilis podle věku a pohlaví na 100 000 obyvatel.

Tabulka uvádí průměrné hodnoty nově nahlášených případů syfilis v letech 2006 – 2010 u mužů a u žen v porovnání s rokem 2011. (zdroj: ÚZIS 2012)

Onemocnění syfilis bylo nejčastěji zjištěno náhodně, a to až 63 % případů (78 % u žen a 54 % u mužů). Typické potíže byly důvodem vyhledání lékařské pomoci u 30 % případů mužů, ale pouze u 7 % případů žen. Poměrně vysoký podíl 14 % případů syfilis byl dále zjištěn prostřednictvím depistážního šetření kontaktů nemocného. Na rozdíl od syfilis byla kapavka nejčastěji diagnostikována na základě typických obtíží, a to až v 70 % případů. Avšak u mužů činí tento podíl více než 85 % a u žen pouze 29 %. U žen byla kapavka nejčastěji diagnostikována v rámci depistážního šetření (37 %) nebo zcela náhodně (29 %). Depistáž byla důvodem zjištění pouze v 7,4 % případů mužů a náhodně byla u nich diagnostikována necelá 4 % případů. Atypické obtíže, jako důvod zjištění, se týkají pouze 3,7 % onemocnění, a to 3,8 % u kapavky a 1,6 % u syfilis. V souvislosti s porodem bylo v roce 2011 zjištěno 5 případů vrozené syfilis u novorozenců. Příčinu výskytu vrozené syfilis představuje onemocnění matky. V roce 2011 bylo u

gravidních žen zjištěno 59 případů syfilis a 9 případů kapavky, z toho se u 24 případů syfilis a 3 případů kapavky jednalo o cizinky.

Epidemiologie pohlavně přenosných nemocí je v úzké souvislosti se sociálním chováním a postavením jedince. Z tohoto důvodu Registr pohlavních nemocí sleduje vybrané sociální i ekonomické charakteristiky. Mezi hlavní faktory ovlivňující pravděpodobnost nákazy je považováno sexuálně rizikové chování a sexuální orientace. Více než 28 % hlášených onemocnění u mužů se týkalo osob s homosexuálním zaměřením a dalších 7 % případů bylo hlášeno u bisexuálů. Oproti tomu u žen byla heterosexualita uvedena ve více než 90 % hlášených pohlavních onemocnění a bisexualita pouze ve 3 % případů. Celkem ve 4 % případů nebyla sexuální orientace uvedena. Ve více než 64 % případů u mužů byl uveden náhodný styk oproti 27 % případů u žen. U mužů byla dále v 11 % případů přiznána promiskuita. U žen to bylo sice pouze 7 %, ale dalších 6 % případů u nich souviselo s prostitucí. Celkem u 80 % případů byl uveden nechráněný sexuální styk a u 13 % styk s cizincem. Dále 7 % případů se týkalo vězňů, 5 % injekčních uživatelů drog a 2 % bezdomovců.

Mezi ostatní nepřímé socioekonomické faktory související s výskytem pohlavně přenosných onemocnění patří rodinný stav, vzdělání a ekonomická aktivita. Více než 71 % případů u mužů se týkalo svobodných, u žen to bylo 55 %. Rozvedených bylo 12 % (11 % u mužů a 15 % u žen). Ovdovělých se týkalo pouze 2 % hlášených onemocnění a ve 4 % případů nebyl rodinný stav zjištěn. Po přepočtu na obyvatelstvo dle rodinného stavu vycházel nejvyšší výskyt pohlavních nemocí na svobodné muže, a to 30,3 případů na 100 tisíc svobodných mužů oproti 13,5 případům u svobodných žen. Další nejvyšší úroveň intenzity dosahující 22,2 případů na 100 tisíc obyvatel byla zaznamenána u rozvedených mužů, u rozvedených žen to bylo 11,4 případů. Nejnižší incidence připadá na osoby žijící v manželství (5,1) a vzhledem k vyšší věkové struktuře ještě méně na ovdovělé (3,5) (ÚZIS 2012).

Tabulka 5 Hlášené onemocnění syfilis podle měsíce hlášení (zdroj: ÚZIS 2012).

| Měsíc hlášení | Syfilis | | | | |
|---------------|----------------|--------------|---------------|---------------------------|-------------------|
| | vrozená A50 | časná A51 | pozdní A52 | jiná a neurčená A53 | celkem A50–A53 |
| leden | - | 28 | 5 | 9 | 42 |
| únor | - | 31 | 7 | 13 | 51 |
| březen | 1 | 51 | 9 | 15 | 76 |
| duben | 1 | 47 | 10 | 11 | 69 |
| květen | - | 32 | 12 | 17 | 61 |
| červen | - | 30 | 11 | 25 | 66 |
| červenec | - | 31 | 2 | 9 | 42 |
| srpen | 2 | 38 | 10 | 18 | 68 |
| září | 1 | 38 | 12 | 16 | 67 |
| říjen | - | 35 | 7 | 15 | 57 |
| listopad | - | 38 | 7 | 23 | 68 |
| prosinec | - | 38 | 9 | 23 | 70 |
| Celkem | 5 | 437 | 101 | 194 | 737 |

Z hlediska vzdělání osob starších 15ti let se nejvíce případů pohlavních nemocí týkalo středoškolsky vzdělaných osob (62 %). Dalších 21 % případů bylo hlášeno u osob se základním vzděláním, 12 % případů u vysokoškoláků a u 6 % případů vzdělání nebylo uvedeno. Zatímco podíl pohlavních nemocí u osob se základním vzděláním dosáhl 30 % u žen oproti 17 % u mužů, u vysokoškolsky vzdělaných mužů bylo hlášeno 14 % případů oproti 7 % u žen. Po přepočtu na vzdělanostní strukturu obyvatel připadala nejvyšší intenzita výskytu hlášených pohlavně přenosných nemocí na osoby se základním vzděláním, a to 32,4 na 100 tisíc mužů oproti 14,6 na stejný počet žen. Následují pak středoškolsky vzdělané osoby s 20,3 případy u mužů a 8,2 případy u žen. Rozdíl mezi výskytem pohlavních nemocí u vysokoškolsky (19,7) a středoškolsky (20,3) vzdělaných mužů je minimální. Zatímco u žen se základním vzděláním je incidence pohlavních nemocí oproti mužům poloviční u vysokoškolsky vzdělaných žen je téměř na čtvrtinové úrovni (5,1).

Intenzita výskytu pohlavně přenosných onemocnění souvisí následně také s ekonomickou aktivitou obyvatel. V roce 2011 bylo hlášeno přes 46 % případů u zaměstnaných osob včetně

příslušníků policie a vojáků (51 % u mužů a 36 % u žen). Druhou největší skupinou jsou nezaměstnaní, jejichž podíl dosáhl včetně osob v domácnosti 21 % (27 % u žen a 17 % u mužů). Následují děti, žáci a studenti (8 %) a starobní či invalidní důchodci (6 %). Jiná nebo nezjištěná ekonomická aktivita byla uvedena celkem u 19 % případů. Po přepočtu na obyvatelstvo dle ekonomické aktivity vycházel největší výskyt opět na nezaměstnané muže, avšak výrazně méně než v minulém roce, a to 68 případů na 100 tisíc nezaměstnaných mužů ve srovnání s 42 případy u žen. Nadprůměrný výskyt připadá dále na zaměstnané muže, tj. 19 hlášení oproti 8,5 u žen. U žáků a studentů ve věku nad 16 let činila incidence pohlavních chorob 10 případů u žen oproti 16 případům u mužů. Na studující ženy vycházel tedy vyšší výskyt pohlavních nemocí než u zaměstnaných žen. Nejmenší incidencí pohlavních nemocí se vyznačují osoby v domácnosti (2,8) a starobní či invalidní důchodci (3,2).

Ve více než 81 % případů bylo onemocnění syfilis léčeno v rámci hospitalizace, v 13 % ambulantně a v necelých 6 % zůstalo bez léčení.

Nejvyšší výskyt pohlavně přenosných onemocnění byl z hlediska bydliště zaznamenán v přepočtu na 100 tisíc obyvatel v Hlavním městě Praze, a to 21,2 případů kapavky a 18,5 případů syfilis. Vysokým počtem onemocnění syfilis se dále opět vyznačuje Ústecký kraj s necelými 11 případy na 100 tisíc obyvatel. Nadprůměrná incidence onemocnění syfilis byla dále evidována v Plzeňském (8,2) a Jihomoravském (7,6) kraji. Tyto kraje se vyznačují také vysokým podílem cizinců mezi nemocnými, tj. až 47 % v Jihomoravském a 36 % v Plzeňském kraji. V Jihomoravském kraji byl dále zaznamenán druhý nejvyšší výskyt onemocnění kapavkou (6,9). Výpočty incidence pohlavních nemocí v krajích nezahrnují hlášené případy u bezdomovců a osob bez trvalého bydliště v ČR, tj. zejména cizinců s krátkodobým pobytem. První skupina zaujímá 29 a druhá 27 hlášení (ÚZIS 2012).

Tabulka 6 Hlášené onemocnění syfilis podle měsíce hlášení (zdroj: ÚZIS 2012).

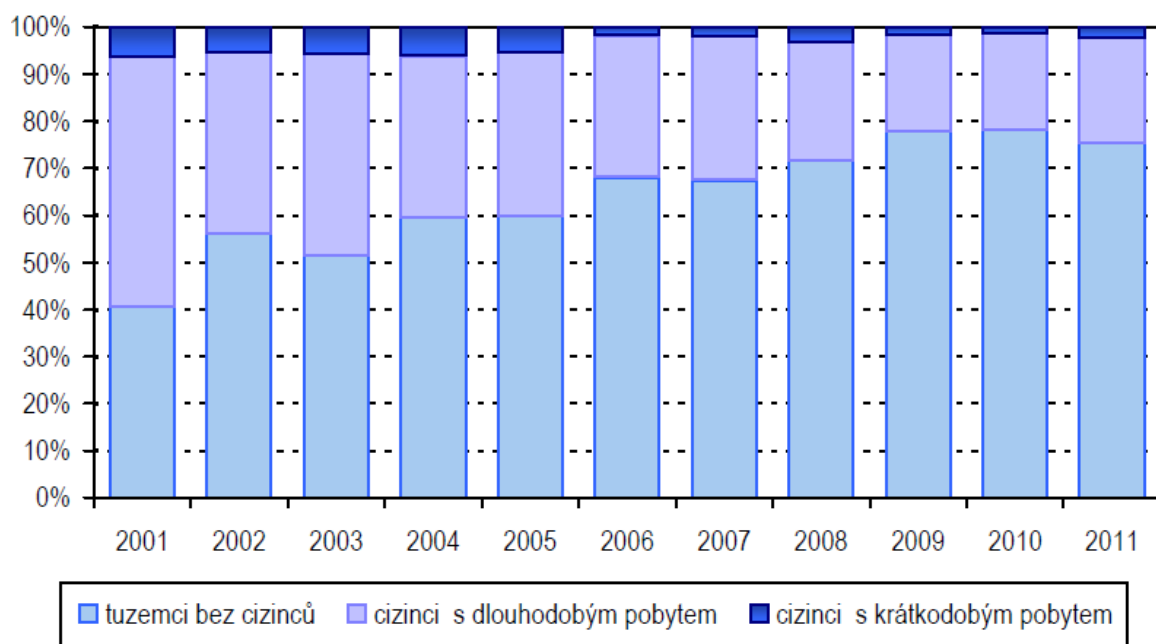
| Měsíc hlášení | Syfilis | | | | |
|---------------|----------------|--------------|---------------|---------------------------|-------------------|
| | vrozená A50 | časná A51 | pozdní A52 | jiná a neurčená A53 | celkem A50–A53 |
| leden | - | 28 | 5 | 9 | 42 |
| únor | - | 31 | 7 | 13 | 51 |
| březen | 1 | 51 | 9 | 15 | 76 |
| duben | 1 | 47 | 10 | 11 | 69 |
| květen | - | 32 | 12 | 17 | 61 |
| červen | - | 30 | 11 | 25 | 66 |
| červenec | - | 31 | 2 | 9 | 42 |
| srpen | 2 | 38 | 10 | 18 | 68 |
| září | 1 | 38 | 12 | 16 | 67 |
| říjen | - | 35 | 7 | 15 | 57 |
| listopad | - | 38 | 7 | 23 | 68 |
| prosinec | - | 38 | 9 | 23 | 70 |
| Celkem | 5 | 437 | 101 | 194 | 737 |

Z hlediska vzdělání osob starších 15ti let se nejvíce případů pohlavních nemocí týkalo středoškolsky vzdělaných osob (62 %). Další 21 % případů bylo hlášeno u osob se základním vzděláním, 12 % případů u vysokoškoláků a u 6 % případů vzdělání nebylo uvedeno. Zatímco podíl pohlavních nemocí u osob se základním vzděláním dosáhl 30 % u žen oproti 17 % u mužů, u vysokoškolsky vzdělaných mužů bylo hlášeno 14 % případů oproti 7 % u žen. Po přepočtu na vzdělanostní strukturu obyvatel připadala nejvyšší intenzita výskytu hlášených pohlavně přenosných nemocí na osoby se základním vzděláním, a to 32,4 na 100 tisíc mužů oproti 14,6 na stejný počet žen. Následují pak středoškolsky vzdělané osoby s 20,3 případy u mužů a 8,2 případy u žen. Rozdíl mezi výskytem pohlavních nemocí u vysokoškolsky (19,7) a středoškolsky (20,3) vzdělaných mužů je minimální. Zatímco u žen se základním vzděláním je incidence pohlavních nemocí oproti mužům poloviční u vysokoškolsky vzdělaných žen je téměř na čtvrtinové úrovni (5,1).

Intenzita výskytu pohlavně přenosných onemocnění souvisí následně také s ekonomickou aktivitou obyvatel. V roce 2011 bylo hlášeno přes 46 % případů u zaměstnaných osob včetně příslušníků policie a vojáků (51 % u mužů a 36 % u žen). Druhou největší skupinou jsou nezaměstnaní, jejichž podíl dosáhl včetně osob v domácnosti 21 % (27 % u žen a 17 % u

mužů). Následují děti, žáci a studenti (8 %) a starobní či invalidní důchodci (6 %). Jiná nebo nezjištěná ekonomická aktivita byla uvedena celkem u 19 % případů. Po přepočtu na obyvatelstvo dle ekonomické aktivity vycházel největší výskyt opět na nezaměstnané muže, avšak výrazně méně než v minulém roce, a to 68 případů na 100 tisíc nezaměstnaných mužů ve srovnání s 42 případy u žen. Nadprůměrný výskyt připadá dále na zaměstnané muže, tj. 19 hlášení oproti 8,5 u žen. U žáků a studentů ve věku nad 16 let činila incidence pohlavních chorob 10 případů u žen oproti 16 případům u mužů. Na studující ženy vycházel tedy vyšší výskyt pohlavních nemocí než u zaměstnaných žen. Nejmenší incidencí pohlavních nemocí se vyznačují osoby v domácnosti (2,8) a starobní či invalidní důchodci (3,2).

Ve více než 81 % případů bylo onemocnění syfilis léčeno v rámci hospitalizace, v 13 % ambulantně a v necelých 6 % zůstalo bez léčeni.



Graf 2 Struktura hlášených onemocnění syfilis podle typu pobytu v letech 2001 – 2011 (zdroj: ÚZIS 2012)

Nejvyšší výskyt pohlavně přenosných onemocnění byl z hlediska bydliště zaznamenán v přepočtu na 100 tisíc obyvatel v hlavním městě Praze, a to 21,2 případů kapavky a 18,5 případů syfilis. Vysokým počtem onemocnění syfilis se dále opět vyznačuje Ústecký kraj s necelými 11 případy na 100 tisíc obyvatel. Nadprůměrná incidence onemocnění syfilis byla dále evidována v Plzeňském (8,2) a Jihomoravském (7,6) kraji. Tyto kraje se vyznačují také vysokým podílem

cizinců mezi nemocnými, tj. až 47 % v Jihomoravském a 36 % v Plzeňském kraji. V Jihomoravském kraji byl dále zaznamenán druhý nejvyšší výskyt onemocnění kapavkou (6,9). Výpočty incidence pohlavních nemocí v krajích nezahrnují hlášené případy u bezdomovců a osob bez trvalého bydliště v ČR, tj. zejména cizinců s krátkodobým pobytem. První skupina zaujímá 29 a druhá 27 hlášení (ÚZIS 2012).

14. Závěr

I přes rozsáhlou škálu klasických přímých i nepřímých testů, vhodných pro diagnostiku syfilis, zůstává řada situací, ve kterých mohou být výsledky vyšetření problematické a neumožňují rychlé a spolehlivé stanovení diagnózy, jedná se zejména o syfilis congenita a neurosyfilis.

Nemožnost kultivovat *T. p. pallidum in vitro* je významným nedostatkem při objektivním průkazu syfilis. S rozvojem molekulární biologie a diagnostiky se nabízí nové možnosti. Standardní test odpovídající správné laboratorní praxi (včetně vnitřní kontroly falešně negativních výsledků) vhodně doplní sérologické testy, které v diagnostice syfilis mají klíčovou a nezastupitelnou roli. PCR lze použít k typizaci kmenů (epidemiologie syfilis a nevenerických treponematóz) na základě specifických sekvencí, ale i ke kvantifikaci mikroorganismů, dále k rozlišení živých a mrtvých buněk a k průkazu DNA *T. p. pallidum* v biologických archivních materiálech atd..

Zásadním aspektem diagnostiky syfilis je nutná mezioborová spolupráce. Definitivní diagnózu může stanovit pouze klinický lékař na základě anamnézy, klinických projevů a laboratorního vyšetření, které je ovšem nezastupitelné.

15. Souhrn

Autor: Lenka Branská

Název: Diagnostika syfilis

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní obor: Zdravotní laborant, kombinovaná forma

Cíl práce: Bakalářská práce je psána formou literární rešerše. Hlavním cílem je shrnutí poznatků o diagnostice syfilis jejíž původcem je patogenní bakterie rodu *Treponema pallidum subsp. pallidum*.

Hlavní poznatky: Patogenní bakterie *Treponema pallidum subsp. pallidum* (*T. p. pallidum*) je původcem syfilis, sexuálně přenosného onemocnění, které postihuje každý rok více než 12 milionů lidí po celém světě, ale je dobře léčitelná antibiotiky na bázi penicilínu. Neléčená syfilis je progresivní onemocnění s primárním sekundárním, latentním a terciárním stadiem, infekce může přetrvávat po celý život pacienta.

Diagnostika syfilis je založena především na nepřímé diagnostice, kterou lze rozdělit dle povahy použitého antigenu na netreponemové (nespecifické) a reakce treponemové (specifické). Netreponemové testy detekují nespecifické protilátky případně kardiolipin, což je fosfolipid tvořící součást buněčných membrán. Nespecifické protilátky po účinné léčbě během několika týdnů až měsíců vymizí, ale specifické IgG zůstávají detekovatelné dlouhodobě. Mezi tyto reakce můžeme zahrnout VDRL (Venereal Diseases Research Laboratory) a RPR (Rapid Plasma Reagin) test.

Treponemové testy detekují specifické protilátky proti *T. p. pallidum*. Do těchto testů můžeme zahrnout např. TPHA (Treponema Pallidum Hemagglutination), FTA-Abs (Fluorescent Treponemal Antibody – Absorbet) a v neposlední řadě EIA (Enzyme Immuno Assay) testy.

Závěr: Nemožnost kultivovat *T. p. pallidum* in vitro je významným nedostatkem při objektivním průkazu syfilis. S rozvojem molekulární biologie a diagnostiky se nabízí nové možnosti. Zásadním aspektem diagnostiky syfilis je nutná mezioborová spolupráce. Definitivní diagnózu může stanovit pouze klinický lékař na základě anamnézy, klinických projevů a laboratorního vyšetření, které je i nadále nezastupitelné.

16. Abstract

Author: Lenka Branská

Title: Diagnostic of syphilis

Bachelor work

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Field of study: Medical laboratory technician, combined study form

Background: The thesis is written in a literary review. The main objective is to summarize knowledge of the diagnosis of syphilis which is caused by a pathogenic bacterium of the genus *Treponema* *Treponema pallidum subsp. Pallidum*.

Main findings: *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* (*T. p. pallidum*) is the causative agent of syphilis, a sexually transmitted disease affecting more than 12 million people worldwide each year and it can be effectively treated with penicillin. Untreated syphilis has primary (local), secondary (disseminated), and tertiary (chronic) stages, and infection can persist for the lifetime of the patient.

Diagnosis of syphilis is based primarily on indirect diagnostics, it can be divided according to the origin of the antigen non-treponemal (non-specific) and treponemal reactions (specific). Non-treponemal tests detect nonspecific antibody optionally cardiolipin, a phospholipid component constituting the cell membranes. Nonspecific antibodies after the effective treatment disappear over several weeks to months but specific IgG remain detectable for a long time. These reactions can include VDRL (Venereal Diseases Research Laboratory) a RPR (Rapid Plasma Reagin) test.

Treponemal tests detect specific antibodies *T. p. pallidum*. These tests can include eg. TPHA (Treponema Pallidum Hemagglutination), FTA-ABS (Fluorescent Antibody Treponemal - Absorbent) and EIA (Enzyme Immuno Assay) tests.

Conclusions: The inability to culture *T. p. pallidum* in vitro is a major lack of a laboratory diagnosis of syphilis. With the development of molecular biology and diagnostics offers new possibilities.

A fundamental aspect of the diagnosis of syphilis requires interdisciplinary cooperation. Definitive diagnosis can only be made clinician based on history, clinical signs and laboratory tests, which remains irreplaceable.

17. Použité zkratky

| zkratka | význam zkratky | český význam |
|-----------------------|--|---|
| CSF | <i>Cerebro-Spinal Fluid</i> | cerebrospinální tekutina |
| DFA-TP | Direct fluorescent antibody test for <i>T. pallium</i> | přímý fluorescenční test na protilátky proti <i>T. pallidum</i> |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid | deoxyribonukleová kyselina |
| EIA | Enzyme Immuno Assay | enzymatická imuno-metoda |
| ELISA | Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay | Imunoenzymatické stanovení protilátek |
| FTA-ABS | Fluorescent Treponemal Antibody – absorbed | Značení <i>T. p. pallidum</i> fluorescenční protilátkou |
| HIV | Human Immunodeficiency Virus | lidský virus imunitní nedostatečnosti |
| IgG | Imunoglobulin G | Imunoglobulin třídy G |
| IgM | Imunoglobulin M | Imunoglobulin třídy M |
| NK | Nukleová Kyselina | |
| PCR | Polymerase Chain Reaction | polymerázová řetězová reakce |
| RIT | Rabbit Infectivity Testing | izolace na králíkovi |
| RPR | Rapid Plasma Reagin | rychlá plasmatická reakce |
| RRR | Rapid Reagin Reaction | rychlá reaginová reakce |
| SZÚ | Státní Zdravotní Ústav | |
| TPHA | <i>T. Pallidum</i> HemAgglutination | <i>T. pallidum</i> hemagglutinační test |
| TPPA | <i>T. Pallidum</i> Particle Agglutination | |
| <i>T. p. pallidum</i> | <i>Treponema pallidum pallidum</i> | |
| VDRL | Venereal Disease Research Laboratory | |
| WHO | <u>World Health Organization</u> | Světová zdravotnická organizace |
| WB | Westernblot | |

18. Seznam obrázků

| | |
|---|----|
| Obrázek 1 Spirálky treponemat v zástinu (zvětšeno) | 8 |
| Obrázek 2 Příklad LightCycler 2.0 sloužící k provádění rychlé PCR | 17 |
| Obrázek 3 Novozélandský bílý králík - plemeno používané pro RIT | 18 |
| Obrázek 4 Rychlá reaginová reakce | 21 |
| Obrázek 5 RPR (Rapid Plasma Reagin) test | 23 |
| Obrázek 6 TPPA (Treponema Pallidum Particle Agglutination) | 26 |
| Obrázek 7 Schéma ELISA metody | 27 |
| Obrázek 8 Pozitivní výsledek FTA-ABS - ostře zelená fluorescence spirálek treponemat | 28 |
| Obrázek 9 Westernblot - detail proužků s pozitivní reakcí | 29 |

19. Seznam tabulek

| | |
|---|----|
| Tabulka 1 Stadia syfilis | 12 |
| Tabulka 2 Semikvantitativní RPR test – ředění, provedení a interpretace testu | 22 |
| Tabulka 3 Léčba hlášených případů syfilis podle druhů užitých antibiotik | 31 |
| Tabulka 4 Vývoj počtu hlášených onemocnění syfilis dle jednotlivých diagnóz v letech 2001 – 2011 | 34 |
| Tabulka 5 Hlášené onemocnění syfilis podle měsíce hlášení. | 37 |
| Tabulka 6 Hlášené onemocnění syfilis podle měsíce hlášení | 39 |

20. Seznam grafů

| | |
|---|----|
| Graf 1 Incidence syfilis podle věku a pohlaví na 100 000 obyvatel. | 35 |
| Graf 2 Struktura hlášených onemocnění syfilis podle typu pobytu v letech 2001 – 2011 | 40 |

21. Použitá literatura

BACKHOUSE, J.L., NESTEROFF, S.I. *Treponema pallidum* western blot: comparison with the FTA-ABS test as a confirmatory test for syphilis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2001, vol.39, no. 1, str. 9-14.

BARANTON, G., OLD, I. G. The spirochaetes: a different way of life. *Bull. Inst. Pasteur.* 1995, vol. 93, str. 63-95.

BAUGHN, R.E., JORIZZO, J.L., ADAMS, C.B., MUSER, D.M. Ig class and IgG subclass responses to *Treponema pallidum* in patients with syphilis. *J Clin Immunol.* 1988, vol. 8, no. 2, str. 128-139.

Bílý králík. 11.9.2013 dostupné z <http://kchkmp.wz.cz/plemena.html>

BYRNE, R.E., LASKA, S., BELL, M., LARSON, D., PHILLIPS, J., TODD, J. Evaluation of a *Treponema pallidum* western immunoblot assay as a confirmatory test for syphilis. *J Clin Microbiol.* 1992, vol. 30, no. 1, str. 115-122.

BISHOP, N.H., MILLER, J.N. Humoral immune mechanisms in experimental syphilis. In *Pathogenesis and immunology of treponemal infection.* R.F. Schell, D.M. Musher, ed. New York: Marcel Dekker, 1983, str. 241-270.

DANIELS, K. C., FERNEYHOUGH, H.S. Specific direct fluorescent antibody detection of *Treponema pallidum*. *Health Lab. Sci.* 1977, vol. 14, str. 164–171.

DORFMAN, D.H., GLASER, J.H. Congenital syphilis presenting in infants after newborn period. *N Engl J Med.* 1990, vol. 323, str. 1299-1302.

GALI s.r.o., příbalový leták. 8.9.2013 dostupné z http://www.gali.cz/downloads/Ita/Syphilis_RPR-CZ.pdf

GEORGE, R.W., HUNTER, E.F., FEARS, M.B. Direct fluorescent antibody test for *Treponema pallidum* (DFA-TP). In A manual tests for syphilis, Larsen, S., Pope, V., Johnson, R.E., Kennedy, E.J. editors. Washington: American Public health association, 1998, str. 378, ISBN 0-87553-234-9

GREENWOOD D., RICHARD C.B. SLACK, JOHN F. PEUTHERK a kol. Lékařská mikrobiologie. GRADA Publishing, 1999, str. 357-360, ISBN 80-7169-365-0

HAZLETT, K.R.O., SELLATI, T.J., NGUYEN, T.T., COX, D.L., CLAWSON, M.L., CAIMANO, M.J., RADOLF, J.D. The TprK protein of *Treponema pallidum* is periplasmic and is not a target of opsonic antibody and protective immunity. J Exp Med. 2001, vol. 193, str. 1015-1026.

HOLLIER, L.M., HARSTAD, T.W., SANCHEZ, P.J., TWICKLER, D.M., WENDEL, G.D., Jr. Fetal syphilis: clinical and laboratory characteristics. Obstet Gynecol. 2001, vol. 97, str. 947-953.

HUNTER, E. F., RUSSELL, H., FARSHY, C.E., SAMPSON, J.S., LARSEN, S.A. Evaluation of sera from patients with Lyme disease in the fluorescent treponemal antibody-absorption tests for syphilis. Sex. Transm. Dis. 1986, vol. 13, str. 232-236.

ILLANEUVA, A.V., PODZORSKI, R. P., REYES, M. P. Effects of various handling and storage conditions on stability of *Treponema pallidum* DNA in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol. 1998, vol. 36, str. 2117-2119.

KENNEDY, E.J., CREIGHTON, E.T. Darkfield microscopy for the detection and identification of *Treponema pallidum*. In: A manual tests for syphilis, Larsen, S., Pope, V., Johnson, R.E., Kennedy, E.J. editors. Washington: American Public health association, 1998, str. 378, ISBN 0-87553-234-9

KŘEMENOVÁ, S., ZÁKOUCKÁ, H., KŘEMEN, J. Problematika vrozené syfilis v posledních dvaceti letech II. Klinický obraz. Klinická mikrobiologie infekčního lékařství 2006, roč. 12, č. 2, str. 51-57.

LARSEN, S., STEINER, B., RUDOLPH, A. Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis. Clin. Microbiol Rev. 1995, vol. 1, str. 1-21

LARSEN, S., POPE, V., JOHNSON, R.E., KENNEDY, E.J. A manual tests for syphilis, 9th edition. American Public health association, Washington 1998

LUGER, A.F.H. Serological diagnosis of syphilis: current methods. In: Young H, Mc Millan A, editors. Immunological diagnosis of sexually transmitted diseases. New York: Marcel Dekker, 1988, str. 294-374.

MAGNUSON, H. J., EAGLE, H., FLEISCHMAN, R. The minimal infectious inoculum of *Spirochaeta pallida* (Nichols strain) and a consideration of its rate of multiplication in vivo. Am J Syph Gonorrhea Vener Dis. 1948, vol. 32, str. 1–18.

MARANGONIOVÁ, A., SAMBRI, V., CAVRINI, F., FRABETTI, A., STORNI, A., ACCARDO, S., SERVIDIO, D., FOSCHI, F., MONTEBUGNOLI, L., PRATI, C., CEVENINI, R. *Treponema denticola* infection is not a cause of false positive *Treponema pallidum* serology. New Microbiol. 2005, vol. 28, str. 215-221.

McGOUGH, L.J., ERBELDING, E. Historical evidence of syphilis and other treponemes. In Pathogenic Treponema, molecular and cellular biology, Radolf, J.D., Lukhart, S.A., editors. Wymondham, England: Caister Academic Press, 2006, str. 465, ISBN 1-904455-10-7

MEYER, M.P., EDDY, T., BAUGHN, R.E. Analysis of western blotting (immunoblotting) technique in diagnosis congenital syphilis. J Clin Microbiol, 1994, vol. 32, no. 3, str. 629-633.

NATHAN, L., BOHMAN, V.R., SANCHEZ, P.J., LEOS, N.K., TWICKLER, D.M., WENDEL, G.D. In utero infection with *Treponema pallidum* in early pregnancy. Prenat Diagn. 1997, vol. 17, str. 119-123.

NORRIS, S.J., the *Treponema pallidum* polypeptide research group. Polypeptides of *Treponema pallidum*: Progress toward understanding their structural, functional, and immunologic roles. Microbiol Rev. 1993, vol. 57, no. 3, str. 50-779.

Obrázek ELISA. 9.9.2013, dostupné z <http://www.wikiskripta.eu/index.php/ELISA>

POHLAVNÍ NEMOCI 2011, Zdravotnická statistika ČR. ÚZIS ČR, 2012, str.7-12, 16-18, 33, 34. ISBN 978-80-7472-006-2

POPE, V., FEARS, M.B. Captia Syphilis-G: an enzyme immunoassay for treponemal antibodies. In A manual of tests for syphilis: S. A. Larsen, V. Pope, R. E. Johnson, and E. J. Kennedy, Jr. (ed.). Washington, D.C.: American Public Health Association, 1998, str. 332-345.

POSPÍŠIL, L., HORÁČEK, J. Sérologické vyšetřování syfilis a klinické interpretace výsledků. Brno: LF UJEP 1981, str. 140.

POST J.D., G.C. COONEY: Accidental transmission of syphilis by blood transfusion, JAMA 1933, vol.100, str. 258-259

RADOLF, J.D., SANCHEZ, P.J., SCHULZ, K.F., MURPHY, F.K. Congenital syphilis. In Sexually transmitted diseases, K.K.Holmes et al. editors, 1999, New York: Mc Graw Hill, str. 1165-1189.

RESL, V. Doporučené postupy pro praktické lékaře. Praha: MZ ČR a ČLS JEP, reg. č. a/004/233, 2002

ROCHE-DIAGNOSTICS. 1.9.2013, dostupné z <http://www.roche-diagnostics.cz/produkty/pcr/lightcycler.aspx>

ROMANOWSKI, B., FORSEY, E., PRASAD, E., LUKEHART, S., TAM, M., HOOK, E.W., III. Detection of *Treponema pallidum* by a fluorescent monoclonal antibody test. Sex Transm Dis. 1987, vol. 14, str. 156-159.

ROTSCHILD, B.M., CALDERON, F.L., COPPA, A., ROTSCHILD, C. First European exposure to syphilis: The Dominican Republic at the time of columbian contact. Clin. Infect. Dis. 2000, vol. 31, str. 936-941.

SANCHEZ, P.J., McCracken, G.H., Jr., WENDEL, G.D., OLSEN, K., THRELKELD, N., NORGARD, M.V. Molecular analysis of the fetal IgM response to *Treponema pallidum* antigens: implications for improved serodiagnosis of congenital syphilis. *J Infect Dis.* 1989, vol. 159, no. 3, str. 508-517.

SCHMIDT, B.L., EDJLALIPOUR, 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, vol. 38, no. 3, str. 1279-1282.

SCHOBER, P.C., GABRIEL, G., WHITE, P., FELTON, W.F., THIN, G.N. How infectious is syphilis? *Br J Vener Dis.* 1983, vol. 59, str. 217-219.

SCHROETER, A.L., TURNER, R.H., LUCAS, J.B., BROWN, W.J. Therapy for incubating syphilis. Effectiveness of gonorrhoea treatment. *JAMA.* 1971, vol. 218, str. 711-713.

SCHULZ, K.F., CATES, W., O'MARA, P.R. Pregnancy loss, infant death, and suffering: legacy of syphilis and gonorrhoea in Africa. *Genitourin Med.* 1987, vol. 63, str. 320-325.

SHEFFIELD, J.S., SANCHEZ, P.J., WENDEL, G.D., Jr., FONG, D.W., MARGRAF, L.R., ZERAY, F., McINTIRE, D.D., BARTON, R.B. Placental histopathology of congenital syphilis. *Obstet Gynecol.* 2002, vol. 100, str. 126-133.

STEINER, G. Modified silver stain for micro-organisms in tissue. *Am J Clin Pathol.* 1950, vol. 20, str. 489-490.

TURNER, T. B., FLEMING, W.J. Prolonged maintenance of spirochetes and filtrable viruses in the frozen state. *J. Exp. Med.* 1939, vol. 67, str. 620-637.

Van VOORHIS, W.C., BARETT, L.K., LUKEHART, S.A., SCHMIDT, B., SCHRIEFER, M., CAMERON, C.E. Serodiagnosis of syphilis: antibodies to recombinant Tp0453, Tp92, and Gpd J Clin Microbiol proteins are sensitive and specific indicators of infection by *Treponema pallidum*. *J Clin Microbiol.* 2003, vol. 41, str. 3668-3674.

VERSALOVIC, J., NASH, Z.D., CARINHAS, R., MUSHER, D.M., BAUGHN, R.E. Immunoglobulin class and subclass restriction to autoimmune responses in secondary syphilis. Clin Exp Immunol. 1990, vol. 80, no. 3, str. 381-386.

WICHER, K., van EMBDEN, J.D., SCHOOLS, L.M., ZABEK, J., JAKUBOWSKI, A., WICHER, V. Immunogenicity of three recombinant *Treponema pallidum* antigens examined in guinea pigs. Int Arch Allergy Appl Immunol. 1989, vol. 89, no. 2-3, str. 128-135.

WICHER, K., HOROWITZ, H. W., WICHER, V. Laboratory methods of diagnosis of syphilis for beginning of the third millenium. Microbes and Infection. 1999, vol. 1, str. 1035 – 1049.

WOZNICOVÁ, V., ŠMAJS, D., WECHSLER, D., MATĚJKOVÁ, P., FLASAROVÁ, M. Detection of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* from Skin Lesions, Serum, and CSF in an Infant with Congenital Syphilis after Clindamycin Treatment in Pregnancy. J. Clin. Microbiol. 2007, vol. 45, no. 2, str. 659-661.

WOZNICOVÁ, V., Laboratorní diagnostika syfilis. 31.8.2013, dostupné z <http://www.medmicro.info/portal/syfilis/lv13/ch01.html>

YOUNG, H. Syphilis: New diagnostic directions. Int J STD. 1992, vol. 3, str. 391-413.

Předpis č. 143/2008 Sb., 1.9.2013, dostupné z <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2008-143>

ZÁKOUCKÁ H., V.POLANECKÝ, V.KAŠTÁNKOVÁ, Syphilis and gonorrhoea in the Czech Republic, Euro Surveill, 2004, vol.9, str.18-20

ZÁKOUCKÁ, H., KŘEMENOVÁ, S., KŘEMEN, J. Problematika vrozené syfilis v posledních dvaceti letech I. Etiologie, epidemiologie a diagnostika. Klin mikrobiol inf lék. 2006, roč. 12, č. 2, str. 44-50.

ZÁKOUCKÁ HANA, Syfilis – tradiční choroba – současný problém II. 8.9.2013, dostupné z <http://www.szu.cz/tema/prevence/syfilis-tradicni-choroba-soucasny-problem-ii>

ZDRAVOTNICKÉ NOVINY, Klinické formy neurosyfilis a jejich diagnostika. 1.9.2013, dostupné z <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/klinicke-formy-neurosyfilis-a-jejich-diagnostika-130615>