

## Laboratórna diagnostika syfilisu

RNDr. Tatiana Kopilcová

Medirex, a. s., Bratislava

Syfilis je systémové infekčné venerické ochorenie vyvolané fragilnou špirálovitou baktériou *Treponema pallidum*. Cesta prenosu je vo väčšine prípadov sexuálnym kontaktom s infekčnými léziami – získaný syfilis. Podľa údajov Európskeho centra pre prevenciu a kontrolu chorôb (ECDC) takmer dve tretiny prípadov so známym spôsobom prenosu sa týkajú mužov, ktorí majú sex s mužmi. Nebezpečná je možnosť prenosu z matky na plod *in utero* – kongenitálny syfilis – a transfúziou krvných derivátov. Sú tri dôležité aspekty stanovenia diagnózy syfilisu: epidemiologická analýza, klinické vyšetrenie a laboratórna diagnostika. V našom laboratóriu používame na skríning netreponémové RPR (Rapid Plasma Reagin) a špecifické treponémové TPPA (*Treponema* Passive Particle Agglutination Assay) testy alebo CMIA (Chemiluminiscent Microparticle ImmunoAssay). Všetky reaktívne vzorky confirmujeme metódou imunoblot IgM a IgG.

**Kľúčové slová:** *Treponema pallidum*, získaný syfilis, kongenitálny syfilis, netreponémové testy, treponémové testy

### Laboratory diagnosis of syphilis

Syphilis is a systemic infectious venereal disease caused by the fragile spiral bacterium *Treponema pallidum*. The route of transmission is mostly by sexual contact with infectious lesions – acquired syphilis. According to the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), almost two-thirds of the syphilis cases with information on transmission category were reported in men who have sex with men (MSM). Dangerous is the possibility of transmission from mother to foetus *in utero* – congenital syphilis and by blood products transfusion. There are three aspects of syphilis diagnosis: clinical history, physical examination and laboratory diagnosis. In our laboratory, we use for screening non-treponemal RPR (Rapid Plasma Reagin), and specific treponemal TPPA (*Treponema* Passive Particle Agglutination Assay) tests or CMIA (Chemiluminescent Microparticle Immuno-Assay). All reactive samples we confirm with immunoblot IgM and IgG test.

**Keywords:** *Treponema pallidum*, acquired syphilis, congenital syphilis, non-treponemal tests, treponemal tests

NewsLab, 2017; roč. 8 (2): 91 – 93

### Úvod

Syfilis (lues) je historicky známe chronické multisystémové pohlavne prenosné infekčné ochorenie spôsobené baktériou *Treponema pallidum*. Uvažuje sa o možnosti, že do Európy sa dostal s námorníkmi Christophera Columba po návrate z Nového sveta. Pomerne rýchlo zachvátil mnoho európskych krajín a prepukol do rozsiahlej epidémie. Predpokladá sa, že mnoho významných osobností trpelo týmto ochorením, napríklad Beethoven, Karol VIII., Ivan Hrozný, Shakespeare, Vincent Van Gogh, Oscar Wilde, Adolf Hitler a Abraham Lincoln. Napriek súčasným možnostiam diagnostiky a liečby je to stále aktuálny problém zdravotníctva na celom svete. V SR má od roku 1990 alarmujúco stúpajúci trend. S ochorením sa stretávame hlavne u sexuálne aktívnych dospelých, keď sa infekcia akviruje sexuálnym kontaktom s infekčnými léziami. Podľa údajov Európskeho centra pre kontrolu chorôb (ECDC) takmer dve tretiny novodiagnostikovaných prípadov tvoria muži majúci sex s mužmi. Veľké nebezpečenstvo spočíva v prieniku *T. pallidum* cez placentu na novorodencov u neliečených alebo nedostatočne liečených séropozitívnych matiek, čo je, žiaľ, u nás aktuálny problém najmä v sociálne slabších vrstvách. Možný je aj prenos transfúziou krvných derivátov. Veľmi príležitostne sa stretávame so získaním infekcie cez porušený kožný kryt. Jediný známy prirodzený hostiteľ je človek.

### Pôvodca

*Treponema pallidum* subs. *pallidum* (obrázok 1) z čeľade Spirochetaceae je fragilný špirálovitý mikroorganizmus

0,18 µm široký, 20 µm dlhý so 4 až 14 pravidelnými závitmi. Z oboch koncov vyčnievajúce axiálne fibrily, podobné bakteriálnym bičikom, umožňujú rotáciu v priestore. Protoplazmatický valec je obalený 3-vrstvovou stenou, ktorá obsahuje kyseliny muramové, a udržiava vláknitý tvar. Celé telo je obalené tenkou fragilnou membránou. Virulentné kmene majú na svojom povrchu slizovú vrstvu. Treponémy majú nízku odolnosť a sú citlivé na vplyvy vonkajšieho prostredia, ničia ich aj zriedené roztoky bežných dezinfekčných prostriedkov a kyslík. Pri teplote nad 39,5 °C hynú za 4 hodiny a v krvných konzervách neprežijú 4 dni. Inkubačný čas je od 10 do 90 dní, priemerne asi 3 týždne. Treponémy sú veľmi invazívne, prenikajú kožou alebo sliznicami a špecificky sa viažu na rôzne druhy

**Obrázok 1.** *Treponema pallidum*, elektrónová fotomikrografia zv. 36 000x



**Zdroj:** CDC/NCHSTP/Division of STD Prevention, STD Clinical Slides

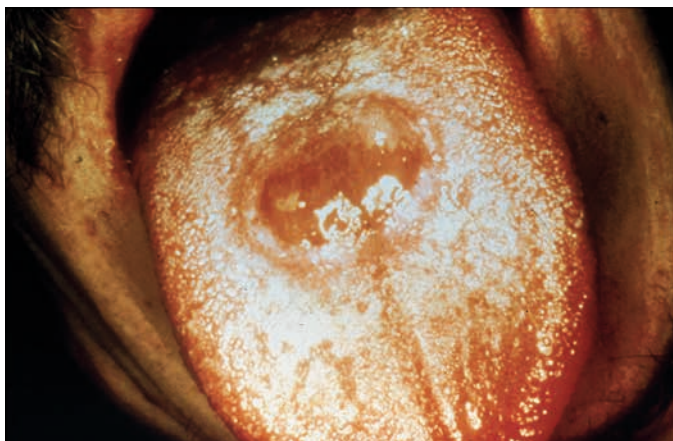
buniek. K diseminácii dochádza relatívne skoro po inokulácii.

Rozmnožujú sa extracelulárne. Ich lipoproteíny indukujú perivaskulárny zápalový proces. Môžu byť fagocytované makrofágmi a endoteliami krvných vlásočníc, poškodzujú kapiláry a zhoršujú ich funkciu. Vďaka unikátnej štruktúre vonkajšej membrány vedú uniknúť hostiteľskej imunitnej odpovedi. Obsahujú enzým degradujúci hyalurónovú kyselinu, čo umožňuje hematogénny rozsev napriek vysokému titru cirkulujúcich protilátok. Následné imunopatologické procesy sú spôsobené komplexmi antigénu s protilátkou. Slizová vrstva chráni baktérie pred účinkom protilátok a komplementu. Špecifická protilátková (IgM, IgG) i bunková obrana môže viesť k spontánnemu uzdraveniu. Imunita sa rozvíja pomaly, asi za 2 roky po infekcii. Napriek komplexnej imunitnej odpovedi v priebehu prvej epizódy syfilisu sú však možné reinfekcie. Umožňuje ich existencia 7 diskretných variabilných (V) regiónov *Treponema pallidum* repeat protein K (TprK). Protilátková odpoveď v priebehu infekcie je namierená práve proti týmto V regiónom. Diverzita proteínu K (TprK) je prekážkou rozvoja účinnej vakcíny.

### Štádiá syfilisu

**Primárne** po 10 až 90 dňoch od akvizovania infekcie sa vyskytne nebolestivý tvrdý vred (**obrázok 2**) v mieste prenosu. Progreduje od makuly cez papulu do vysokoinfekčného ulcus durum, z ktorého môžu byť treponémy izolované. V infiltráte

**Obrázok 2.** Primárne štádium – lézia na jazyku



**Zdroj:** CDC/NCHSTP/Division of STD Prevention, STD Clinical Slides

**Obrázok 3.** Sekundárny syfilis – generalizovaný raš



**Zdroj:** Cincinnati STD/HIV Prevention Training Center

nachádzame lymfocyty, plazmatické bunky a makrofágy, zápalová reakcia spôsobuje obliteratívnu endoartritídu. Po 3 až 12 týždňoch sa i bez liečby spontánne vyhojí. Celé primárne štádium je sprevádzané regionálnou lymfadenopatiou. V skoršej fáze tohto štádia môžu byť sérologické testy na syfilis negatívne. Protilátková odpoveď nezabráni rozvoju druhého štádia.

**Sekundárne štádium (obrázok 3)** sa rozvinie po 4 až 10 týždňoch od objavenia sa primárnej lézie. Treponémy sa množia a zaplavujú organizmus. Systémová manifestácia zahŕňa nesvrbivý generalizovaný makulopapulózny raš, nevoľnosť, horúčku, myalgie, artralgie, lymfadenopatiu. Objavujú sa condylomata lata a alopecia. Výrazne stúpa koncentrácia protilátok a tvoria sa komplexy antigénu s protilátkou.

Pri prvom i druhom štádiu syfilisu môžu príznaky ustúpiť a v **latentnej** podobe môže pôvodca syfilisu prežívať u infikovaného aj niekoľko rokov alebo až do konca života. Získaný primárny, sekundárny a včasný latentný syfilis sa podľa Európskeho centra pre prevenciu a kontrolu chorôb (ECDC) a Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) definuje ako **včasný syfilis** (infekčný syfilis). Približne 30 % neliečených pacientov v priebehu 1 až 20 rokov progreduje do **terciárneho** štádia. Klinicky sa prejavuje ako gumatózny syfilis, parenchymatózny neurosyfilis a kardiovaskulárny syfilis. Nastávajú orgánové zmeny, poškodenie ciev a centrálnaj nervovej sústavy (CNS). Treponémy sa v tomto štádiu dokazujú iba výnimočne. V ktoromkoľvek štádiu infekcie môže dôjsť k rozvoju **neurosyfilisu**, keď spirochety invadujú CNS. Môže byť asymptomatický, ale aj s veľmi vážnymi klinickými prejavmi. Včasný sa po niekoľkých mesiacoch až rokoch po infekcii prejaví ako syfilitická meningitída, meningovaskulárny alebo okulárny syfilis. Neskorý sa ukáže dekády po infekcii a charakteristické sú parézy a tabes dorsalis. Môže sa končiť úplnou paralýzou, stratou reflexov a demenciou s rozpadom osobnosti. Neskorý latentný a terciárny (gumatózný syfilis, kardiovaskulárny a neurosyfilis) sa definujú ako **neskorý syfilis (obrázok 4)**. **Kongenitálny** syfilis je dôsledok penetrácie *T. pallidum* cez placentu alebo k akvizovaniu dochádza v infikovanom pôrodnom kanáli. Od 70 do 100 % novorodencov matiek s neliečeným včasným syfilisom je infikovaných a v jednej tretine prípadov sa plod narodí mŕtvy. Avšak aj primerane liečeným matkám sa môže narodiť mŕtvy alebo infikovaný novorodenec. Deti s kongenitálnym syfilisom sa rodia predčasne, sú dehydratované, majú nízku pôrodnú

**Obrázok 4.** Neskorý syfilis – ulcerujúce gummy



**Zdroj:** CDC/NCHSTP/Division of STD Prevention, STD Clinical Slides



hmotnosť. Príznaky zodpovedajú sekundárnemu štádiu – exantémové kožné prejavy, zväčšená pečeň. Potom nastáva fáza latencie. Po viac ako dvoch rokoch infekcie hovoríme o neskorom vrodennom syfilise, pri ktorom sa objavujú ťažké poškodenia orgánov – hluchota, intersticiálna keratitída až slepota, perforácie podnebia, nosa, súdkovitý tvar rezákov.

### Terapia

Určená je výhradne dermatovenerológom. Liekom prvej voľby je G penicilín, vhodnejšie je parenterálne podávanie a  $\beta$ -laktámové antibiotiká. Pri alergii na penicilín je vhodný tetracyklín a doxycyklín. V prípade azitromycínu a iných makrolidov narastá podiel rezistencie spôsobený bodovou mutáciou génu pre 23S rRNA. Dobrú penetráciu do mozgovomiechového moku majú tetracyklín, doxycyklín a ceftriaxon.

### Laboratórna diagnostika

Na stanovenie diagnózy syfilisu (Dg. A50 – A53) sú nutné tri základné aspekty: epidemiologická anamnéza, klinické vyšetrenie a laboratórna diagnostika.

Možnosti **priamej laboratórnej diagnostiky** sú pomerne obmedzené. Na umelých kultivačných pôdach treponémy nerastú, nemnožia sa v kuracom embryu ani v tkanivových kultúrach. Metódy molekulárnej biológie sa rutinne nevyužívajú pre viac ako 95 % homológiu DNA patogénnych treponém (*T. pallidum subsp. pallidum*, *T. pallidum subsp. pertenue*, *T. pallidum subsp. endemicum*, *T. carateum*). Užitočné sú iba pri diagnostike z primárne sterilných tekutín, ako je mozgovomiechový mok, amniotická alebo očná tekutina. *T. pallidum* nie je vizualizovateľná Gramovým farbením pre jej minimálnu hrúbku. Možná je identifikácia živých treponém v tkanivovom moku získanom zo spodiny ulcus durum na základe ich rotačného a kývavého pohybu mikroskopiou v tmavom poli. Táto metodika patrí do rúk dermatovenerológov. Je veľmi prácná, zaťažovaná subjektívnou chybou pozorovateľa a možnosťou získania falošne pozitívnych aj negatívnych výsledkov. Striebrnenie podľa Levadetiho je podobne veľmi náročné, priama imunofluorescencia s využitím polyklonálnych protilátok identifikuje treponémy v léziách. Základ laboratórnej diagnostiky tvoria **sérologické testy**. Treba si však uvedomiť, že žiaden z týchto testov nerozlíši venerický syfilis od nevenerických treponematóz (yaws, bejel, endemický syfilis a pinta). Tieto patogény sú morfologicky a antigénne podobné a odlíšiť ich vieme iba na základe spôsobu získania, epidemiológie a klinickej manifestácie a dnes už aj DNA sekvenovaním. Všetky osoby s pozitívnymi sérologickými nálezmi by mali byť liečené na syfilis. Laboratórne sa syfilis diagnostikuje kombináciou netreponémových a treponémových testov. V **netreponémových (nešpecifických) reagínových testoch** dokazujeme v sére po 10 až 15 dňoch, v likvore po 4 – 8 týždňoch po objavení sa tvrdého vredu zmes heterofilných IgM a IgG proti kardiolipínu, lecitínu a cholesterolu, uvoľneného rozpadom tkanív hostiteľa v priebehu ochorenia a naviazaného ako haptén na proteíny treponém. Titre reagínov korelujú s aktivitou ochorenia, monitorujú jeho aktivitu a úspešnosť liečby. Pri absencii terapie kulminujú po 1 až 2 rokoch. V praxi sa stretávame s rôznymi obmenami týchto testov: VDRL (Venereal Disease Research Laboratory), BWR (Bordetova-Wassermanova reakcia), RPR (Rapid Plasma Reagin) a RRR (Rapid Reagin Reaction). V našom laboratóriu používaný RPR test využíva flokuláciu kardiolipínového antigénu naviazaného na uhlíkové častice protilátkami (reagínmi) v patientskom sére. V **treponémových**

(špecifických) testoch sa stanovujú špecifické IgM a IgG protilátky proti pôvodcovi ochorenia *Treponema pallidum*. Väčšina z nich využíva rekombinantné antigény treponém. Najčastejšie sa používajú testy TPPA (*Treponema* Passive Particle Agglutination Assay), TPHA (*Treponema pallidum* Haemagglutination Assay), EIA (Enzyme Immunosorbent Assay), CMLA (Chemiluminescent Microparticle ImmunoAssay) – IgM, IgG, konfirmačný test imunoblot – IgM, IgG a FTA-abs test (Fluorescent Treponemal Antibody absorption test) v referenčnom laboratóriu. Rýchly Point of Care test pre jeho suboptimálnu senzitivitu odporúča ECDC aj WHO iba pre rozvojové krajiny. Treponémové testy začínajú byť reaktívne 1 až 2 týždne po objavení sa tvrdého vredu, i keď z praxe vieme, že je to veľmi individuálne a niekedy to môže trvať až do troch mesiacov. Stanovenie titrov špecifických protilátok v diagnostike a manažmente syfilisu nie je prínosné. Význam stanovenia titrov je len v diagnostike kongenitálneho syfilisu a neurosyfilisu. Špecifické treponémové protilátky zostávajú u väčšiny pacientov pozitívne po celý život a identifikujú osoby úspešne liečené aj osoby s neliečeným syfilisom. Treba si uvedomiť možnosť biologicky falošnej reaktivity sérologických testov, často pri autoimunitných ochoreniach, v gravidite a pri borelióze, preto sa reaktívne vzorky confirmujú. Optimálna je metóda imunoblot, kde stanovujeme IgM a IgG protilátky proti jednotlivým membránovým proteínom *T. pallidum*. Potvrdenie IgM protilátok je zvlášť cenné pri diagnostike kongenitálneho syfilisu.

### Diagnostika v MEDIREX-e

Podľa **odborného usmernenia NRC pre syfilis** (2005) pre skrining syfilisu podliehajú vyhľadávaniu nových prípadov (špecifický + nešpecifický test) všetci dospelí po 50. roku pri prvej hospitalizácii v roku, do 50. roku pri každej hospitalizácii, každý STD chorý, každá tehotná 2x počas gravidity (3.-4.m. a 7.-8.m.), všetci darcovia krvi, kostnej drene, tkanív, orgánov a spermii a novorodenci. Keďže kombinácia testov RRR + TPPA je prácná a časovo náročná a výsledky sú až na 2. deň po doručení vzorky do laboratória, zaviedli sme v našich laboratóriách na skrining syfilisu špecifický test CMLA IgM + IgG. Vďaka detekcii IgM protilátok je reaktívny od 2. týždňa ochorenia, plne automatizovaný a negatívny výsledok je v deň doručenia vzorky do laboratória. Kombináciu testov RRR + TPPA sme ponechali štandardne pre dermatovenerologických pacientov a novorodencov. Každé reaktívne sérum v teste CMLA overujeme testami RRR a TPPA a všetky novodiagnostikované nálezy confirmujeme metódou imunoblot IgM a IgG. Séra nových sérologicky diagnostikovaných suspektných ochorení zasielame na konfirmačné vyšetrenie do RÚVZ – Národného referenčného centra pre syfilis v Košiciach. Špecifickou súčasťou našej činnosti je vyšetrenie z plodovej a očnej tekutiny a diagnostika neurosyfilisu. Intratekálnu produkciu protilátok stanovujeme porovnaním titra TPPA v sére a v likvore.

### Odber biologického materiálu a transport do laboratória

Odoberá sa krv v množstve 5 – 7 ml do špeciálnej odberovej súpravy určenej na odber a transport krvi. Do dvoch hodín sa môže krv transportovať pri izbovej teplote. Plodovú vodu, očnú tekutinu a likvor je vhodné zasielať v množstve min. 1 ml.

Ak transport vyžaduje dlhší čas, je potrebné vzorku transportovať a uchovávať pri 2 – 8 °C.

**Tabuľka 1.** Vyšetrenie špecifických protilátok metódou TPPA alebo CMIA v rokoch 2008 – 2016

Materiál	Celkový počet vyšetrení	Počet pozitívnych	Percento pozitívity
Sérum	753 865	9 367	1,24 %
Likvor	1 258	49	8,39 %
Očná tekutina	16	4	25 %

## Záver

Z prehľadu klinických prejavov syfilisu vyplýva, že nie každý symptóm je typický pre toto ochorenie, štádium latencie je bez klinických prejavov, ale pacient môže byť infekčný, preto skrining a následná liečba sú dôležitým preventívnym opatrením proti šíreniu syfilisu. V **tabuľke 1 a 2** je uvedený celkový počet vyšetrení špecifických protilátok na našom oddelení v rokoch 2008 až 2016 a celkový počet pozitívnych vzoriek

## POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, D.C. 9<sup>th</sup> edition 2003:2904 USA 2009; 987-1003.
2. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. *Lawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*. Lange Medical Books/Mc Graw-Hill 27<sup>th</sup> edition New York 2001; 285-288.
3. Bednář M, Fraňková V, Schindler J, et al. *Lékařská mikrobiologie*, Marvill 1996; 185-188.
4. Baroňáková A. Syfilis, *Via pract* 2005; 2 (3): 138-140.

**Tabuľka 2.** Vyšetrenie špecifických protilátok metódou TPPA alebo CMIA v rokoch 2008 – 2016 u gravidných žien a novorodencov

	Celkový počet vyšetrení	Počet pozitívnych	Percento pozitívity
Gravidné ženy	107 788	486	0,45 %
Novorodenci	53 177	264	0,49 %

séra 9 367 je alarmujúci. Na druhej strane je potešiteľné, že sme nezaznamenali ani jedného novorodenca s reaktivitou špecifických protilátok, ktorý by mal zároveň pozitívitu netreponémových testov a IgM v konfirmačnom teste imunoblot, takže sme nepotvrdili ani jeden kongenitálny syfilis, iba prenesené materské protilátky. Potvrdzuje to správnosť skriningu v gravidite. Menej uspokojivé je zistenie 49 prípadov neurosyfilisu v sledovanom období na našom pracovisku.

5. Martinásková K. Syfilis v detskom veku. *Dermatol Prax* 2015; 9(4): 137-142.
6. European guideline on the management of syphilis, European Academy of Dermatology and Venereology 2014.
7. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION A CONTROL. 2014/07 A. Sexually transmitted infections in Europe 2012: surveillance report. Štokholm: ECDC, 2014; 110 s. ISBN 978-92-9193-579-6.

**RNDr. Tatiana Kopilcová**

Medirex, a. s.

Galvaniho 17/C, Bratislava

e-mail: tatiana.kopilcová@medirex.sk

# GUTTA

GUTTA Slovakia spol. s r. o. je obchodná spoločnosť zameraná na distribúciu, prenájom a servis špeciálnej zdravotníckej techniky a materiálu. Spoločnosť vznikla v januári 1997 a v súčasnosti jej patrí popredné miesto medzi obchodnými spoločnosťami na slovenskom, českom a maďarskom trhu v oblasti denzitometrie a mamografie.

Od roku 2014 sme začali s distribúciou špeciálneho zdravotníckeho materiálu a predajom špeciálneho testu, ktorý zisťuje agresivitu rakovinového nádoru prs na stanovenie optimálnej liečby. V roku 2016 sme začali s distribúciou laboratórneho spotrebného materiálu, ako odberné skúmavky, ihly a iné.

## MOLEKULÁRNA DIAGNOSTIKA

Systém Panther® od spoločnosti HOLOGIC je integrovaný systém pre testovanie nukleových kyselín. Detekcia RNA: HPV, HPV 16 18/45, Chlamydia trachomatis (CT), Neisseria gonorrhoeae (GC), Trichomonas vaginalis (TV), Mycoplasma genitalium, HIV-1 Quant, HCV Quant, HBV Quant, HSV 1 a 2, ZIKA (EUA). V príprave: Bacterial vaginosis, Candida.



## UZATVORENÉ / VÁKUOVÉ ODBEROVÉ SYSTÉMY

VACUSERA® vákuový systém na odber krvi a moču, odberové ihly, systém najvyššej kvality, pohodlia pacienta a vysoká úroveň bezpečnosti.



## LBC - CYTOLÓGIA

HOLOGIC ThinPrep® Integrated Imager a Imaging systém sú automatizované mikroskopy pre cytologické hodnotenie a sú navrhnuté na zobrazovanie gynekologických alebo negynekologických vzoriek.