

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



RIGORÓZNÍ PRÁCE

**Srovnání subjektivního a automatického odečtu přímé aglutinace
antikardiolipinových protilátek při diagnostice syfilis**

Comparison of subjective and instrumental evaluation of direct agglutination of
anticardiolipin antibodies in the diagnosis of syphilis

Mgr. Monika Ryšavá

Vedoucí rigorózní práce: PharmDr. Jana Rathouská, Ph.D.

Konzultant: MUDr. Hana Zákoucká

HRADEC KRÁLOVÉ, 2023

Poděkování

Velké poděkování patří MUDr. Haně Zákoucké za cenné odborné rady, vstřícný přístup, pomoc při získávání potřebných dat a poskytnutí laboratorních prostor. Poděkování patří také RNDr. Marku Malému, CSc, za ochotu a pomoc se zpracováním statistických dat. Dále patří velké poděkování vedoucí práce, PharmDr. Janě Rathouské, PhD., za ochotu, velmi milý přístup a odborné vedení. Také bych chtěla poděkovat manželovi za podporu při psaní této práce.

„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, 2023

Mgr. Monika Ryšavá

OBSAH

1.	ABSTRAKT	6
2.	ABSTRACT	8
3.	ÚVOD	10
4.	ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	11
5.	TEORETICKÁ ČÁST	12
5.1	Syfilis	12
5.1.1	Původce a přenos	12
5.1.2	Patogeneze	14
5.1.3	Průběh	14
5.1.4	Léčba	19
5.1.5	Diagnostika	21
5.2	Netreponemové testy	26
5.2.1	Manuální provedení netreponemových testů	27
5.2.2	Automatické provedení netreponemových testů	30
6.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
6.1	Výběr vzorků	33
6.2	Použité diagnostické metody	34
6.2.1	Manuální netreponemový test	34
6.2.2	Automatický netreponemový test	35
6.2.3	Hodnocení opakovatelnosti	37
6.2.4	Hodnocení reprodukovatelnosti	37
6.3	Použité statistické metody	38
7.	VÝSLEDKY	39
7.1	Porovnání automatického a manuálního hodnocení v celkovém souboru vzorků	39
7.2	Porovnání automatického a manuálního hodnocení u léčených pacientů	40
7.3	Porovnání automatického a manuálního hodnocení u negativních pacientů	41
7.4	Porovnání automatického a manuálního hodnocení u pacientů s čerstvým záchytem	42
7.5	Shoda rozřazení na negativní a pozitivní	43

7.6	Opakovatelnost.....	45
7.7	Reprodukovatelnost.....	45
8.	DISKUSE	46
9.	ZÁVĚR	49
10.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	50
11.	SEZNAM TABULEK	53
12.	SEZNAM OBRÁZKŮ	54
13.	POUŽITÁ LITERATURA.....	55

1. ABSTRAKT

Cíl práce: Práce byla tvořena teoretickým souhrnem informací o onemocnění syfilis a jeho diagnostice. Dále byla tvořena experimentální částí, jejímž cílem bylo porovnat výsledky hodnocení manuálního a automatického provedení netreponemového testu. Hodnocení bylo porovnáváno ve třech skupinách pacientů. První skupinu tvořili pacienti s čerstvým záchytem syfilis, druhou pacienti již léčení se syfilis a třetí skupinu tvořili pacienti s negativním nálezem syfilis. Dalším cílem bylo zhodnotit shodu rozřazení vzorků na negativní a pozitivní, bez ohledu na titer protilátek. Cílem bylo také zhodnotit opakovatelnost a reprodukovatelnost automatického hodnocení RPR pomocí analyzátoru AIX1000.

Metody: Studie byla uskutečněna v Národní referenční laboratoři pro syfilis se vzorky zaslanými ke confirmaci. Do studie bylo zařazeno 170 vzorků, z nichž 50 vzorků bylo od léčených pacientů, 20 od negativních a 100 od pacientů s čerstvým záchytem. Pro manuální hodnocení byla použita metoda VDRL (Dialab s.r.o.), pro automatické hodnocení byl použit analyzátor AIX1000 (Gold Standard Diagnostics). Test opakovatelnosti automatického hodnocení byl proveden měřením vzorku ve dvou těsně po sobě jdoucích bězích za stejných podmínek. Test reprodukovatelnosti byl proveden měřením jednoho vzorku, různými pracovníky a v různé dny.

Výsledky: V souboru všech 170 vzorků byl zjištěn statisticky významný posun ($p < 0,001$), titry automatického hodnocení vykazovaly nižší hodnoty než manuální hodnocení. Posun byl patrný ve skupině léčených pacientů ($p < 0,001$) i pacientů s čerstvým záchytem ($p < 0,001$). Ve skupině negativních pacientů byla absolutní shoda. Při hodnocení rozřazení na negativní/pozitivní, bez ohledu na titer, byl zjištěn statisticky významný posun v celkovém souboru vzorků ($p = 0,006$). Ve skupině léčených pacientů byl posun patrný, ale nebyl statisticky významný ($p = 0,063$), ve skupině negativních vzorků byla absolutní shoda, ve skupině pacientů s čerstvým záchytem nebyl zjištěn statisticky významný posun ($p = 0,125$). Shoda při hodnocení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti automatického hodnocení za použití analyzátoru AIX1000 byla 100 %.

Závěr: Automatické hodnocení netreponemových testů vykazovalo nižší titry než hodnocení manuální v celkovém souboru vzorků, ve skupině léčených pacientů a ve skupině pacientů s čerstvým záchytem. Ve skupině negativních vzorků byla absolutní shoda. Hodnocení rozřazení na negativní/pozitivní bez ohledu na titer bylo shodné ve skupině negativních pacientů a pacientů s čerstvým záchytem. Patrný, nikoli však statisticky významný, posun byl rovněž u pacientů již léčených. Hodnocení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti AIX1000 vykazovalo 100 % shodu. Obě metody jsou plnohodnotně využitelné pro diagnostiku, jelikož odrážejí škálu rozložení titru v průběhu léčby.

Klíčová slova: syfilis, VDRL, RPR, automatický analyzátor, netreponemové testy, AIX1000

2. ABSTRACT

Background: The thesis consisted of a theoretical summary of information about the syphilis disease and its diagnosis. Furthermore, it consisted of an experimental part, the aim of which was to compare the evaluation results of manual and instrumental performance of the nontreponemal test. The evaluation was compared in three groups of patients. The first group consisted of patients with a recent diagnosis of syphilis, the second group consisted of patients already treated for syphilis, and the third group consisted of patients with a negative test for syphilis. Another aim was to evaluate the agreement of sorting the samples into negative and positive, regardless of the antibody titer. The aim was also to evaluate the repeatability and reproducibility of the automatic RPR assessment using the AIX1000 analyzer.

Methods: The study was performed at the National Syphilis Reference Laboratory with samples sent for confirmation. 170 samples were included in the study, of which 50 samples were from treated patients, 20 from negative and 100 from patients with a recent diagnosis of syphilis. The VDRL method (Dialab s.r.o.) was used for manual evaluation, the AIX1000 analyzer (Gold Standard Diagnostics) was used for automatic evaluation. The repeatability test of the automatic evaluation was performed by measuring the sample in two closely consecutive runs under the same conditions. The reproducibility test was performed by measuring one sample, by different workers and on different days.

Results: A statistically significant shift ($p < 0.001$) was detected in the set of all 170 samples, the titers of the instrumental evaluation showed lower values than the manual evaluation. The shift was evident in the group of treated patients ($p < 0.001$) as well as patients with a recently diagnosed syphilis ($p < 0.001$). There was absolute agreement in the group of negative patients. When evaluating the negative/positive classification, regardless of the titer, a statistically significant shift was detected in the total set of samples ($p = 0.006$). In the group of treated patients, the shift was noticeable, but not statistically demonstrable ($p = 0.063$), in the group of negative

samples there was absolute agreement, in the group of patients with a recent diagnosis, no statistically significant shift was detected ($p=0.125$). Agreement in repeatability and reproducibility assessment using AIX1000 was 100%.

Conclusions: Instrumental evaluation of non-treponemal tests showed lower titers than manual evaluation in the total sample set, in the group of treated patients and in the group of patients with recent syphilis. There was absolute agreement in the group of negative samples. The evaluation of negative/positive classification, regardless of titer, was the same in the group of negative patients and patients with a recently diagnosed syphilis. A noticeable, but not statistically significant, shift was also seen in patients already treated. The repeatability and reproducibility test of AIX1000 showed 100 % agreement. Both methods are fully usable for diagnosis, as they reflect the range of titer distribution during treatment.

Key words: syphilis, VDRL, RPR, automatic analyzer, nontreponemal tests, AIX1000

3. ÚVOD

Syfilis, neboli lues či příjice, je dlouho známé sexuálně přenosné onemocnění. První epidemie se v Evropě vyskytla na konci 15. století. Historicky první konkrétní popis nemoci, včetně sexuálního způsobu přenosu, byl publikovaný v roce 1547. [1,2]

Po období snižování počtu případů syfilis incidence tohoto onemocnění v posledních letech opět stoupá. Zatímco v roce 1990 bylo v České republice hlášeno 164 případů, v roce 2019 již bylo hlášeno 879 případů syfilis. [3, 4]

Onemocnění syfilis může vést, pokud není léčeno, k významnému ohrožení zdravotního stavu jedince. Infekce přenesená z matky na plod může způsobit vážné poškození plodu, které končí často fatálně, nebo narozením dítěte s vrozenou syfilis. Život dospělého nebo dítěte tak může být v ohrožení, proto je včasná a přesná diagnostika onemocnění velmi důležitá. Diagnostika se provádí kombinací vícero metod, mezi nimiž mají netreponemové testy nezastupitelné místo. V případě pozitivního nebo hraničního výsledku vzorku je nutná jeho confirmace v Národní referenční laboratoři pro syfilis, která sídlí ve Státním zdravotním ústavu.

Stejně jako v jiných oblastech laboratorní diagnostiky, také v oblasti diagnostiky syfilis dochází k rozvoji automatizace. Hlavním důvodem je eliminace chyb způsobených vlivem lidského faktoru, redukce času potřebného pro provedení analýzy a zamezení subjektivního vlivu na hodnocení. Automatizace tak může v mnoha případech vést k zefektivnění práce a k objektivnějším výsledkům.

4. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

V prvním úseku teoretické části práce jsou shrnuty základní informace o onemocnění syfilis. Zejména informace o původci nemoci a průběhu syfilis. Druhý úsek teoretické části je zaměřen na diagnostiku tohoto onemocnění a popis jednotlivých metod. Detailněji jsou pak popsány netreponemové testy s manuálním a automatickým provedením.

Primárním cílem této práce je porovnat manuální a automatické hodnocení netreponemových testů u tří různých skupin pacientů. Cílem je porovnat výsledky ve skupině pacientů bez prokázané syfilis, ve skupině pacientů s čerstvým záchytem onemocnění a ve skupině již léčených pacientů. Dalším cílem je určit, jak se obě hodnocení shodnou v rozřazení vzorků na negativní a pozitivní, bez ohledu na titr. Pro manuální hodnocení je použit test VDRL (Dialab s.r.o.), pro automatické hodnocení RPR je použit analyzátor AIX1000 (Gold Standard Diagnostics, Davis, Kalifornie, USA). Součástí experimentu je také hodnocení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti automatického hodnocení pomocí analyzátoru AIX1000. Výsledné hodnoty jsou statisticky zpracovány a uvedeny v tabulkách.

5. TEORETICKÁ ČÁST

5.1 Syfilis

Syfilis je závažné sexuálně přenosné onemocnění, které se vyskytuje celosvětově. V České republice tato infekce podléhá povinnému hlášení Krajské hygienické stanici, která vkládá příslušná data do Národního registru pohlavních nemocí (RPN). Hlavním účelem je monitorování syfilis a dalších vybraných nemocí na území ČR, sledování zdravotního stavu obyvatel a posuzování epidemiologické situace. [5,6]

Přesto, že se během posledních desetiletí 20. století incidence syfilis ve světě snižovala, dochází nyní v mnoha zemích opět k vzestupu. Proti tomuto onemocnění neexistuje vakcinace. Jedinou prevencí je bezpečné sexuální chování, které zahrnuje používání ochrany během pohlavního styku a vyhýbání se promiskuitě. Zvláště ohroženi jsou muži mající sex s muži, toxikomani a lidé s HIV. Onemocnění je dobře léčitelné, při zanedbání léčby však může končit fatálně. [7, 8]

5.1.1 Původce a přenos

Původcem syfilis je bakterie *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* (TPP) (viz Obrázek 1). Jedná se o patogenní gramnegativní spirochetu, která je 5–15 nm dlouhá; 0,09–0,18 nm široká a má tvar pravidelných závitů. TPP se liší od jiných gramnegativních bakterií uspořádáním zevní membrány. Specifické treponemové antigeny jsou zakotveny ve vnitřní fosfolipidové vrstvě a zevně jsou exponovány jen velmi zřídka. Nízká frekvence povrchově lokalizovaných proteinů může pomáhat treponemám unikat imunitní odpovědi organismu. Antigenní variace také mohou vést k subpopulaci spirochet, které jsou odolné vůči fagocytóze makrofágů. Mikroorganismus se pohybuje rotací a vývrtkovým pohybem. Pro TPP je typický vlnitý a lomivý pohyb kolem středu, což je charakteristický rys pro odlišení TPP od jiných nepatogenních treponem při mikroskopování v temném poli. Charakter pohybu je však do značné míry závislý na okolním prostředí (vazkost tekutiny, mikroskopické překážky apod.). Přirozeným hostitelem této bakterie je pouze člověk. Pro laboratorní účely se může provádět intratestikulární inokulace králíka, křečka nebo subhumánního

primáta. Treponema je velmi citlivá na vysychání, zvýšenou teplotu, UV záření a okolní tenzi kyslíku. Tyto vlastnosti snižují pravděpodobnost přežití bakterie mimo organismus, proto je k přenosu potřebný těsný kontakt. [2, 9, 10]



Obrázek 1 - *Treponema pallidum subsp. pallidum* [11]

K přenosu dochází primárně pohlavním stykem. Při sexuálním kontaktu pronikne bakterie malými oděrkami na kůži a na sliznici do těla. V místě vstupu infekce se poté vytváří nebolestivá indurovaná léze. Treponemata mají také schopnost procházet placentou, v důsledku čehož dochází k přenosu infekce z matky na plod. Z tohoto důvodu je těhotným ženám prováděn screeningový test na syfilis během první prenatalní prohlídky a v 28. týdnu těhotenství. Možný je také přenos kontaktem s aktivními lézemi či krevní transfúzí. Toto riziko je ovšem značně eliminováno pravidelným laboratorním vyšetřením dárců a také tím, že tato bakterie není schopna za podmínek v krevní bance přežít déle než 24 až 48 hodin. U zdravotnického personálu je také možná nákaza při poranění jehlou nebo při zacházení s infikovaným materiálem, pokud nedodrží základní pravidla BOZP. [2, 12, 13, 14, 15]

5.1.2 Patogeneze

V rozmezí hodin až dnů po tom, co *TPP* překoná neporušenou sliznici nebo projde přes porušenou kůži, vstupuje do lymfatického a krevního oběhu. V první fázi dochází k lokálnímu množení *TPP*, které je velmi pomalé. V případě dosažení dostatečné kvantitativní hodnoty se následně šíří po celém těle a téměř všechny orgány, zvláště CNS, mohou být napadeny. Počet mikroorganismů, který vede k rozvoji infekce, se u každého pacienta liší. U králíků lze ale obecně říci, že už 4 až 8 spirochet vede k rozvoji infekce. Klinická léze se objeví, pokud je dosaženo koncentrace přibližně 10^7 bakterií/mg tkáně. Za rozvoj chronické infekce je zodpovědný, stejně jako u jiných chronických infekcí, přesmyk z dominantní Th_1 odpovědi na Th_2 odpověď. [2]

V prvních dvou týdnech po infekci se tvoří antikardiolipinové protilátky, kterým se také říká reaginy. Tyto nespecifické protilátky jsou namířené proti kardiolipinu, který je obsažen v membráně *TPP*. Kardiolipin se také ve velkém množství vyskytuje v mitochondriální membráně lidských buněk a při probíhajícím zánětu je uvolňován. Hladiny antitreponemových protilátek narůstají přibližně 5. týden po infekci. IgG protilátky přetrvávají v organismu po celý život, nezajišťují však dlouhodobou ochrannou funkci proti reinfekci syfilis. [2, 16, 17]

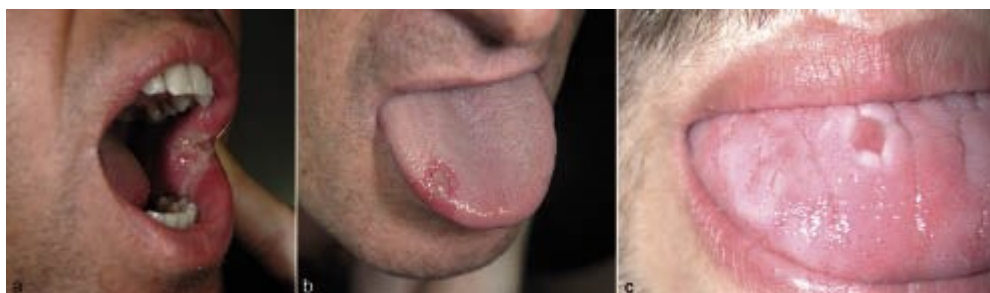
5.1.3 Průběh

Onemocnění syfilis má velmi mnohotvárnou škálu projevů, které jsou typické pro určité fáze onemocnění. Díky variabilním klinickým projevům, připomínajícím jiné klinické jednotky, získala tato infekce přezdívku „velký imitátor“. Můžeme rozlišovat syfilis získanou a syfilis vrozenou. Z hlediska časového průběhu infekce můžeme dělit syfilis na časnou formu a pozdní formu. Fáze časných forem probíhají během prvního roku onemocnění. [2, 18]

5.1.3.1 Primární stádium

Přibližně po 3 týdnech od nákazy vzniká v místě vstupu infekce tvrdý vřed (*ulcus durum*). Vřed se může vyskytovat samostatně, nebo jich může být více. Nejčastěji se vyskytuje v oblastech genitálií, úst nebo rekta a dosahuje velikosti 1 mm až 2 cm

(viz Obrázek 2). Jelikož je vřed většinou nebolestivý a může se objevovat na skrytých místech, jako je například děložní čípek, pacient ho nemusí zaznamenat. Přibližně pátý týden od infekce dochází k nebolestivému zduření uzlin. Tyto projevy mohou být snadno zaměněny s jinou infekcí. V této době již dochází k pozitivitě sérologických testů. Jestliže nedojde k zahájení léčby, onemocnění přechází do sekundárního stádia. [10, 18, 19, 20, 21]



Obrázek 2 – Ulcus durum [22]

5.1.3.2 Sekundární stádium

Sekundární stádium se rozvíjí přibližně desátý týden od nákazy. Organismus je v tuto chvíli zaplaven treponematy a objevuje se únava, subfebrilie a artralgie. Typické jsou kožní exantémy a enantémy, které mohou mít různou podobu a vyskytovat se na různých částech těla, včetně plosek nohou a dlaní rukou. Příkladem podob exantému a enantému u syfilis je makulózní forma (*roseola syphilitica*), papulózní forma nebo *condylomata lata*, projevující se zejména na vlhkých a teplých místech. Exantém je většinou nesvědivý a neolupuje se. Vzniklé erose jsou velmi nakažlivé. V této fázi jsou pozitivní specifické i nespecifické sérologické testy. Závažnou formou sekundární syfilis je *lues maligna*, která se velmi vzácně objevuje u imunosuprimovaných pacientů. Léze mají ulceronodulární vzhled a nejčastěji postihují trup a končetiny. [18, 20, 21, 23, 24, 25]

5.1.3.3 Latentní stádium

I při neléčení dochází po sekundárním stádiu k vymizení příznaků a nastává období latence. V tuto chvíli je diagnostika možná pouze sérologicky, specifické testy zůstávají pozitivní. Můžeme rozlišovat latenci časnou a pozdní. Dle Centers for Disease

Control and Prevention (CDC) časná latence nastává do 1 roku od nákazy, později je již považovaná za pozdní latenci. Dle Mezinárodní klasifikace nemocí, která vychází z klasifikace Světové zdravotnické organizace (WHO), je jako časná latence považované období do dvou let od nákazy. Později už hovoříme o latenci pozdní, která může trvat i více než 20 let. Podle této klasifikace se řídí také Česká republika. Zatímco v období časně latence může být pacient infekční, v období pozdní latence již není považován za nakažlivého. Až 90 % relapsů se objevuje během prvního roku. V případě, že je v latentní fázi těhotná žena, může dojít k nákaze plodu. Pozdní latentní syfilis může, ale nemusí, vyústit v terciární syfilis. [2, 18, 19, 20, 21, 26]

5.1.3.4 Terciární stádium

Terciární stádium může nastoupit 5-30 let po infekci a manifestuje se v jedné formě nebo v kombinaci vícero forem. V této fázi již není pacient infekční, zátěž patogeny je nízká, ale je přítomna silná imunitní reakce. Terciární syfilis se může projevat jako gumma, neurosyfilis nebo kardiovaskulární syfilis. V současné době je výskyt terciární formy velmi vzácný, důvodem je užívání antibiotik, důsledná péče a lepší imunokompetentnost populace ve vyspělých zemích. [10, 18, 21, 27]

Gumma je charakteristické granulomatózním postižením kůže, lebky a dlouhých kostí, kdy dochází k tvorbě zánětlivých ložisek vzácně rezultující do otevřených vředů. Tato ložiska se mohou vytvářet také na vnitřních orgánech. V současné době se vyskytuje jen zřídka. [18, 20]

Kardiovaskulární syfilis se před zavedením antibiotik do běžné praxe objevovala až u 10 % pacientů s neléčenou syfilis. Postiženy mohou být všechny cévy, ale v největším ohrožení je aorta a koronární arterie. Následkem může být až ruptura aneuryzmat. [20]

Neurosyfilis se může projevit jak v primárním a sekundárním stádiu, tak v terciární fázi onemocnění, a je jednou z nejnebezpečnějších forem syfilis. Treponemata jsou schopna proniknout do CNS již v prvních hodinách po vstupu do organismu. Podstatnou roli v patogenezi hraje jak neuroinvazivita kmene *TPP*, tak imunoreaktivita pacienta. Neurosyfilis můžeme dělit na časnou (asymptomatickou, meningeální, meningovaskulární) a pozdní (parenchymatózní progresivní paralýza,

tabes dorsalis). Až u 40 % pacientů může neurosyfilis probíhat asymptomaticky, kdy dochází pouze k abnormálnímu nálezu v likvoru. Tento nález může do dvou let spontánně vymizet. Pouze přibližně v 5 % přechází v manifestní neurosyfilis, a to zejména u imunodeficitních jedinců a pacientů s infekcí HIV. Syfilitická meningitida je charakterizovaná přítomností meningeálních příznaků s poruchou mozkových nervů. V likvoru i v krvi se nachází velké množství protilátek namířených proti virulentním spirochétám, v likvoru je přítomna lymfocytární pleocytóza. Meningovaskulární syfilis se projevuje vznikem trombóz, aneuryzmat a hemoragií. Typickým obrazem je cévní mozková příhoda u relativně mladé osoby. Parenchymatózní progresivní paralýza nastává až u 5 % neléčených syfilitiků. Klinicky dominují psychopatologické projevy, halucinace, změna osobnosti a rozvoj demence. Onemocnění během 3-5 let končí fatálně. Tabes dorsalis se objevuje přibližně 10 až 15 let po infekci. Dochází při ní k pomalé degeneraci nervových buněk a nervových vláken, které přenášejí senzorické informace do mozku. To se projevuje například ataxií, sníženými reflexy dolních končetin a degenerací kloubů. Pro diagnostiku neurosyfilis je nezbytné současně vyšetřit krev a likvor. [8, 18, 21, 28, 29,]

5.1.3.5 Další typy projevů syfilis

Mezi další projevy syfilis může být řazeno postižení oka infekcí. K tomu může dojít ve všech třech stádiích onemocnění. Dle studie probíhající v Tel Aviv Medical Center, byla syfilis oka zjištěna u jedné čtvrtiny pacientů přijatých s infekcí syfilis. Výskyt tohoto příznaku souvisel s vyšším věkem pacientů. Syfilis může napadnout jakoukoliv oční strukturu, nejčastěji se však vyskytuje zadní uveitida nebo pan-uveitida. Primární syfilis oka se projevuje jako vřed na očním víčku a spojivce, velmi vzácně také v slzné žláze. K infekci dojde většinou buď přímým kontaktem se sekretem, nebo pomocí kontaminovaných prstů. Syfilitická vyrážka, projevující se u sekundární syfilis, může postihnout oční víčka a vést k blefaritidě. U sekundární syfilis lze také zaznamenat konjunktivitidu, episkleritidu, keratitidu nebo iridocyklitidu. Terciární syfilis oka se může projevit jako gumatózní postižení očního víčka nebo gumatózní dakryoadenitida či difúzní periostitis. Při výskytu terciární neurosyfilis je typická tzv. Argyll-Robertsonova zornice, která se projevuje areflektořickým ztuhnutím zornic bez

reakce na světlo a zneokrouhlenými zornicemi. Při kongenitální syfilis je nejčastější oboustranná intersticiální keratouveitida. [2, 30, 31, 32, 33]

Méně známou komplikací je syfilis ucha, která může vést k irreverzibilní ztrátě sluchu. Jelikož není tento projev běžný, často dochází k odhalení příčiny ztráty sluchu, až ve chvíli, kdy už je poškození nevratné. [34]

5.1.3.6 Vrozená syfilis

Vrozená syfilis je charakterizována přenosem patogenních treponemat z matky na plod během těhotenství, případně může dojít k infekci kontaktem infikovaných lézí matky během porodu. Pravděpodobnost přenosu infekce na dítě se snižuje s rostoucí délkou doby od primární infekce matky, závisí však především na bakteriémii matky. V období primární infekce matky se riziko přenosu udává 70 – 100 %, během sekundární syfilis 90 %, v latentní fázi 30 % (zejména v časně fázi latence). Neléčená aktivní syfilis v graviditě končí ve čtvrtině případů porodem mrtvého plodu. Dojde-li k nákaze při početí a infekce matky není léčená, dochází k přenosu na plod, což má za následek potrat nebo porod těžce postiženého dítěte, které se rodí mrtvé nebo do jednoho roku umírá. Tento typ vrozené syfilis nazýváme *sypphilis congenita praecox*. *Sypphilis congenita recens* se, v případě, že nedojde k abortu, klinicky projevuje do dvou let od narození. Dítě se rodí se známkami sekundární syfilis. Projevy jsou intrauterinní retardace růstu, hepatosplenomegalie s ikterem nebo bez ikteru, nebo například kostní abnormality. *Sypphilis congenita tarda* je typická absencí časných projevů infekce, dítě se po porodu jeví jako zdravé. Jestliže není proveden novorozenecký screening, bývá syfilis rozpoznána až po dvou letech života dítěte, kdy dojde k prvním projevům často již ve formě stigmat (v místech původního specifického zánětu). Typickým příznakem je Hutchinsonova triáda, která zahrnuje hluchotu, slepotu, způsobenou zakalením rohovky, a soudkovité řezáky. Dále se může také objevit sedlovitý nos. [18, 20, 35, 36, 37, 38, 39]

Diagnostika je založena na sérologickém průkazu IgM protilátek, které, na rozdíl od IgG protilátek, nepronikají přes placentu. Diagnóza novorozence je určena na základě anamnézy matky, klinického stavu dítěte a výsledku sérologických metod.

Finální diagnostika je možná až po 18. měsíci, kdy u zdravého dítěte dojde k úplnému vymizení IgG protilátek od matky. [29]

5.1.3.7 Koinfekce s HIV

Koinfekce syfilis a HIV je velmi běžná. Infekce se mohou navzájem ovlivňovat mnoha způsoby. Výskyt vředů zlepšuje podmínky pro vstup infekce HIV. Syfilis také reguluje expresi koreceptoru CCR5, čímž dojde k lokální imunitní aktivaci. Tím se zvýší pravděpodobnost získání infekce HIV. Přirozený průběh infekce syfilis může být ovlivněn tak, že dochází k malignějšímu průběhu a tvoří se mnohočetné vředy. Sérologické testy pro syfilis mohou být modifikované a projevují se extrémně vysokými titry protilátek. Při koinfekci syfilis se mohou častěji vyskytnout syfilitické oftalmologické a otologické manifestace. Syfilis naopak může ovlivnit progresi chronické infekce HIV. Doporučené je sérologické testování ve 3., 6., 12. a 24. měsíci po léčbě. Sérologické testy pro diagnostiku syfilis mohou být u HIV pozitivních pacientů často falešně pozitivní nebo falešně negativní, diagnostika se ovšem řídí standardními kritérii. [2, 40]

5.1.4 Léčba

Každý pacient, u kterého je diagnostikována syfilis, je povinen podrobit se léčbě a zdržet se sexuálního kontaktu. Lékem volby pro syfilis je penicilin podaný parenterálně. Penicilin narušuje zevní membránu treponemat a ničí je v jejich růstové fázi. Dobře prochází přes hematoencefalickou bariéru (krystalický-PNC-G) a snadno prochází také placentou. Jeho podání je možné i v graviditě. Pacientům v časně fázi syfilis je jednorázově aplikován benzatin penicilin G s dlouhotrvajícím účinkem (2,4 MIU v jedné dávce). Pacientům v pozdních stádiích onemocnění jsou doporučovány tři dávky v týdenních intervalech benzatin penicilinu G s dlouhotrvajícím účinkem (2,4 MIU v jedné dávce, celkem 7,2 MIU ve třech dávkách). Benzatin penicilin G se podává intramuskulárně, jeho koncentrace v séru zůstává dostatečná po dobu až 2 týdnů. U pacientů alergických na penicilin lze podat tetracyklin. V roce 2002 byla popsána rezistence TPP k azithromycinu. Rezistence je způsobená mutací A->G v pozici 2058 genu 23S rRNA *T. pallidum*. Léčba azithromycinem či jinými makrolidy je tedy riziková

z hlediska růstu rezistence. V současné době je cca 70 % kmenů *TPP* zachycených na území ČR rezistentních. [8, 18, 41, 42, 43]

U pacientů se spirochetovým onemocněním se po léčbě antibiotiky může objevit tzv. Jarisch Herxheimerova reakce. Příčina je, že z rozpadajících se treponemat jsou uvolňovány endotoxiny, které se uvolňují do krevního řečiště, kde vyvolají akutní zánětlivou reakci. Následkem je horečka, třesavka, bolest těla, vyrážka, nevolnost a zvracení. Příznaky obvykle nastoupí do 2 hodin od podání antibiotik a ustoupí do 24 hodin. Jejich rozvoj je možné zastavit jednorázovým podáním kortikoidů (např. hydrokortisonu i.m.) Z tohoto důvodu je vhodné provádět léčbu za současné hospitalizace pacienta. [44]

Všichni nemocní zůstávají v dispenzární péči venerologického oddělení a je u nich prováděno pravidelné sérologické a klinické vyšetření. Pacienti jsou sérologicky kontrolováni za 3, 6, 12 a 24 měsíců. Od dvou let po léčbě mohou být intervaly kontrol pětileté, ovšem s ohledem na sexuální aktivitu pacienta. Ženy ve fertilním věku je doporučováno kontrolovat častěji. U diagnostikovaného pacienta je nutné vyhledat všechny sexuální partnery, se kterými měl sexuální kontakt méně než 90 dní před diagnózou u primární syfilis nebo méně než 2 roky při sekundární syfilis. Sexuální partneři mohou podstoupit léčbu penicilinem i v případě, že výsledky jejich testů na syfilis jsou negativní. Jde o formu postexpoziční profylaxe. Partneři, se kterými došlo k sexuálnímu kontaktu před více než 90 dny, se nemusí podrobit léčbě, pokud jsou negativní. Těhotné ženy, které byly léčeny pro syfilis, se musejí podrobit tzv. zajišťovací léčbě. Zajišťovací léčba se provádí v 1. a 3. trimestru u infekce zachycené v aktuální graviditě. [18, 45]

5.1.5 Diagnostika

Diagnostika syfilis je ztížena tím, že bakterii *Treponema pallidum* nelze kultivovat *in vitro*. V posledních letech se již objevila možnost kultivace, není ale doposud rutinně používanou metodou. Pro diagnostiku se proto využívají především metody nepřímého stanovení, které jsou založeny na průkazu protilátek. Pro specifitu a citlivost diagnostiky se používá kombinace nescifického screenigového testu, doplněného specifickým testem. V případě pozitivního nebo hraničního nálezu screeningových testů je vzorek zaslán do Národní referenční laboratoře pro syfilis ke konfirmaci. Vyšetření pacientů je součástí povinných schémat. Celková diagnostika je výsledkem mezioborové spolupráce, výslednou diagnózu určí klinický lékař na základě klinických projevů a laboratorního vyšetření. Vyšetření se provádí v rámci prenatalní péče, při hospitalizaci, v rámci předoperačního vyšetření, u dárců krve či orgánů a u každé ženy v těhotenství či před provedením interrupce. Nejčastějším biologickým materiálem pro vyšetření je sérum, plazma, likvor a stěry z infikovaných lézí. Méně časté jsou pak tkáně, plná krev, amniová tekutina a biopsie. [29, 46, 47]

5.1.5.1 Metody přímého stanovení

Přímou detekci lze využít pouze v prvním a druhém stádiu onemocnění, kdy se nemoc manifestuje a biologický materiál s treponematy je přístupný k odběru. Mezi metody přímého stanovení patří:

- **Mikroskopie v zástinu** – zástinová mikroskopie umožňuje průkaz syfilis již v raném stádiu. Její využití je především při podezření na specifickou lézi na sliznici, či na kůži. Mikroskopii je možné použít pro likvor, exudát z lézí, amniovou tekutinu apod. Nelze ji použít pro vyšetření tkání. Mikroskopie v zástinu vyžaduje zkušeného odborníka, jelikož je možné zaměnit patogenní treponemata s nepatogenními (*Treponema denticola* v dutině ústní). Hodnotí se morfolgie a motilita.
- **Přímá imunofluorescence** – metoda, při níž se na treponemata vážou protilátky značené fluorescenčním barvivem (FITC). Výsledný preparát se poté hodnotí pod fluorescenčním mikroskopem. Výhodou je, že zde není problém

morfologické schody mezi spirochetami a fixovaný preparát lze hodnotit s časovým odstupem. Nevýhodou je nedostupnost komerčních sad pro diagnostiku.

- **PCR** (polymerase chain reaction, polymerázová řetězcová reakce) – amplifikační metoda, kterou se prokazují specifické konzervativní úseky genomu *TPP*. Pro průkaz se využívají primery specifické pro *TPP*. Výhodou je vysoká specifická vyšetření a možnost vyšetření více patogenů současně. Nevýhodou je vysoká cena. PCR nepatří mezi rutinní vyšetření v diagnostice syfilis. Tuto metodu lze využít pro průkaz treponemat v likvoru a pro diagnostiku kongenitální syfilis, kdy nedochází k interferenci s protilátkami přenesenými z organismu matky. Dále se dá využít ke zjištění některých typů rezistence *TPP* na antibiotika (makrolidy).
- **Přímá hybridizace** – metoda, při níž se specificky značená sonda váže na definovaný úsek genetického materiálu. Pro její nízkou citlivost se při diagnostice syfilis téměř nepoužívá.
- **Inokulace zvířecímu hostiteli** – pouze pro experimentální použití, dříve využívaná k odlišení nevenerických treponematóz. [8, 10, 48, 49]

5.1.5.2 Metody nepřímého stanovení

Nepřímé stanovení je založeno na detekci protilátek a je důležité pro diagnostiku všech stádií onemocnění, především pak tam, kde nelze použít metody přímého stanovení. Jde také o jediný možný přístup vhodný ke kontrole úspěšnosti léčby a případných reinfekcí nebo relapsů. Sérologické vyšetření se provádí přibližně 4 týdny po nákaze. Používané metody dělíme na treponemové (specifické) a netreponemové (nespecifické, blíže popsané v kapitole 5.2). [8, 29]

Treponemové testy prokazují přítomnost specifických protilátek proti antigenům *TPP* (lipoproteinům). Treponemové testy zůstávají pozitivní dlouhodobě i po léčbě. Řadíme sem testy screeningové i konfirmační. Je možné také samostatně stanovit IgM protilátky, jestliže chceme sledovat účinnost léčby či aktivitu syfilis. U 2 % IgG testů a u 30 % IgM testů se vyskytuje falešně negativní reakce, a to především v inkubační době a na počátku I. stádia onemocnění. U 1-2 % případů se vyskytuje falešně pozitivní reakce. Příčinou falešně pozitivní reakce může být například autoimunitní onemocnění, očkování, malignity, hepatitidy, borelióza a další. Mezi treponemové testy patří:

- **TPPA** (*Treponema pallidum* particle agglutination) – jedná se o screeningový aglutinační test, ve kterém jsou jako nosiče antigenu použity inertní želatinové částice, které vykazují vyšší stabilitu, než krvinky. Sérum obsahující protilátky proti *TPP* reaguje s želatinovými částicemi sensibilizovanými antigenem (Nicholsův kmen *TPP*). V případě positivity se v jamce mikrotitrační destičky vytvoří souměrná vrstva aglutinovaných částic. V případě negativity se neaglutinované částice usadí na dně jamky.
- **MHA-TP** (microhemagglutination *Treponema pallidum*) – screeningový aglutinační test, fungující na obdobném principu jako TPPA. Test probíhá v mikrotitrační destičce a jako nosič antigenu jsou využívány zvířecí krvinky. Výhodou je minimální spotřeba vzorku.

- **ELISA** (enzyme-linked immunosorbent assay) – tato metoda je vhodná ke screeningovému semi-kvantitativnímu vyšetření séra. Umožňuje prokázat všechny třídy protilátek. Funguje na principu reakce antigenu a protilátky, kdy antigen je imobilizován na povrchu jamky mikrotitrační destičky. Pokud jsou v séru přítomny protilátky, navážou se na antigen a vytváří komplex. Takto vzniklý komplex je detekován protilátkou proti lidskému imunoglobulinu, značenou enzymem. Intenzita vniklé barevné reakce je měřena na fotometru. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci protilátek proti *TPP*.
- **Imunochromatografické testy** – rychlý screeningový test, využívající antigen imobilizovaný v nitrocelulóзовé membráně. Barevnou reakcí lze prokázat přítomnost všech tříd protilátek společně. Využívá se zejména v urgentních případech nebo v terénních studiích. Vykazuje nízkou citlivost na počátku onemocnění a při vyhasínající syfilis.
- **Latex-aglutinační test** – určen pro rychlé vyhledávací testování, umožňují detekovat protilátky všech tříd společně bez rozlišení. Test obsahuje latexové částice, které nesou navázaný specifický antigen. V případě přítomnosti protilátky dochází k aglutinaci.
- **Chemiluminiscenční testy** (CLIA, chemiluminescent immunoassay) – specifický antigen navázaný na jamce destičky reaguje s protilátkou přítomnou v séru. Po inkubaci s konjugátem se měří kvantum vyzážené světelné energie. Výhodou této metody je schopnost automatizace a tím eliminace lidské chyby.
- **Western blot IgG, IgM** – konfirmační test, který umožňuje stanovit protilátkovou odpověď proti jednotlivým antigenům, což pomáhá k lepšímu posouzení vývoje onemocnění. Klíčovými jsou proteiny o molekulové hmotnosti 15,5 kDa, 17 kDa a 47 kDa získané z virulentního kmene Nichols. Antigeny jsou rozděleny elektroforézou a přeneseny na membránu. Výsledná pozitivita po inkubaci se vzorkem se projevuje jako tmavý proužek na membráně.

- **19S SPHA IgM** (19S IgM solid phase hemadsorption) – konfirmační test, který je založen na vychytávání IgM ze séra, pomocí konjugátem potažených jamek mikrotitrační destičky, a následné vizualizaci pomocí zvířecích krvinek nebo syntetických partikulí. Vychytávání IgM před vizualizací zvyšuje citlivost metody. Tento test je vhodný k určení titru protilátek a jeho sledování během dispenzární péče.
- **FTA-ABS IgG, IgM** (fluorescent treponemal antibody absorption) – konfirmační test s vysokou citlivostí a specifitou, založený na nepřímé imunofluorescenci. Jako antigeny jsou využívány usmrcené bakterie *TPP* kmene Nichols. Pomocí sorbentu, připraveného z *Treponema phagedensis* Reiter, se provede vysycení protilátek společných s rody *Borrelia*, *Leptospira* a ostatními z rodu *Treponema*. To vede ke značnému zvýšení specifičnosti testu. Vzorek je inkubován s bakteriemi *TPP*, které jsou imobilizované na sklíčku. Výsledný komplex je vizualizován pomocí fluorescenčně značeného anti-lidského imunoglobulinového konjugátu. Následně se provádí hodnocení fluorescenčním mikroskopem.
- **TPI** (Nelson-Mayerův *Treponema pallidum* imobilizační test) – první specifický test zavedený do praxe v roce 1949, který se v současné době již nepoužívá. Vyžaduje zkušený personál a dostupnost živého virulentního kmene *TPP*. Na přelomu primárního a sekundárního stádia syfilis se tvoří protilátky (imobiliziny), které za přítomnosti komplementu způsobují imobilizaci a rozpad buněk *TPP*. Po delší době dochází u pacientů ke spontánnímu vymizení imobilizinů, proto není test pozitivní celoživotně. [10, 29, 50, 51, 52, 53, 54]

5.2 Netreponemové testy

Netreponemové testy slouží k průkazu nespecifických antikardiolipinových protilátek. Kardiolipin je součástí membrány treponemat, ale i součástí mitochondriální membrány lidských buněk. Tyto testy vykazují vysokou citlivost, ale vzhledem k tomu, že je kardiolipin součástí i jiných struktur, nejsou tyto testy specifické. Jsou nezbytnou součástí posouzení účinnosti léčby a sledování průběhu nemoci. Netreponemové testy vykazují často falešnou pozitivitu, a to až v 2-10 % testů. Nejčastější příčiny falešně pozitivní reakce jsou uvedeny v tabulce (viz Tabulka 1).

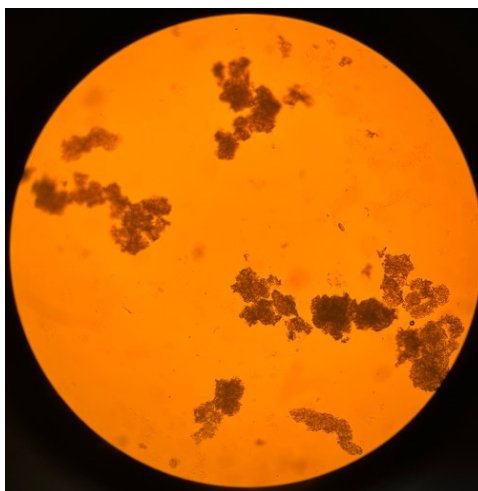
U sér s vysokým titrem specifických a nespecifických protilátek při akutní syfilis může také dojít k falešně negativnímu výsledku, který se projevuje jako tzv. zonální fenomén. Ten je charakteristický tím, že v neřaděném stavu vyazuje sérum negativní výsledek a při řaděném se stává čím dál více pozitivním. Vzhledem k vysoké falešné pozitivitě i riziku falešně negativního výsledku v akutním stadiu (zonální fenomén) je základem screeningu treponemový test. Mezi netreponemové testy řadíme VDRL test (Venereal disease research laboratory) a RPR test (Rapid plasma reagin). [8, 10, 46, 55]

Akutní příčiny (trvání méně než 6 měsíců)	Chronické příčiny (trvání déle než 6 měsíců)
virové hepatitidy	Hepatitidy
Příušnice	Příušnice
infekční mononukleóza	infekční mononukleóza
plané neštovice	plané neštovice
ostatní virové infekce	ostatní virové infekce
Malárie	Malárie
rozsáhlý infarkt myokardu	rozsáhlý infarkt myokardu
rozsáhlé poškození tkáně (popáleniny, crush syndrom)	autoimunitní onemocnění
Očkování	
Gravidita	
užívání drog	

Tabulka 1 – Příčiny falešně pozitivní reakce u netreponemových testů [Převzato 29]

5.2.1 Manuální provedení netreponemových testů

Test VDRL se hodnotí mikroskopicky a je vhodný pro posouzení účinnosti léčby. Netreponemový test může také sloužit k detekci reinfekce a je vhodný k testování séra, plazmy i likvoru. VDRL obvykle vykazuje pozitivitu během prvních několika týdnů po infekci, vrchol pak nastává během prvního roku a poté pomalu klesá. Jeho výhodou je rychlost a snadnost provedení testu. Test je založen na principu, že lidské tělo produkuje protilátky namířené proti kardiolipinu, který je součástí membrány treponemat. Na podložním sklíčku se testované sérum, plazma či likvor smísí s antigenem, který je složen z bezbarvého alkoholového roztoku hovězího kardiolipinu, cholesterolu a lecitinu. Po krátké inkubaci se vzorek na podložním sklíčku pozoruje pod mikroskopem. V případě positivity lze vidět zřetelné shluky antigenu a protilátky (viz Obrázek 3). V případě negativity nedochází k žádnému shlukování (viz Obrázek 4). Test VDRL je možné semi-kvantifikovat provedením série ředění. Ředění se provádí v poměrech 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 a 1:1024. Pro základní screening je potřeba 50 μ l vzorku, pro následnou titraci dalších 50 μ l. Citlivost testu je dle výrobce 78 % pro primární syfilis a 100 % pro sekundární syfilis. [56, 57, 58]



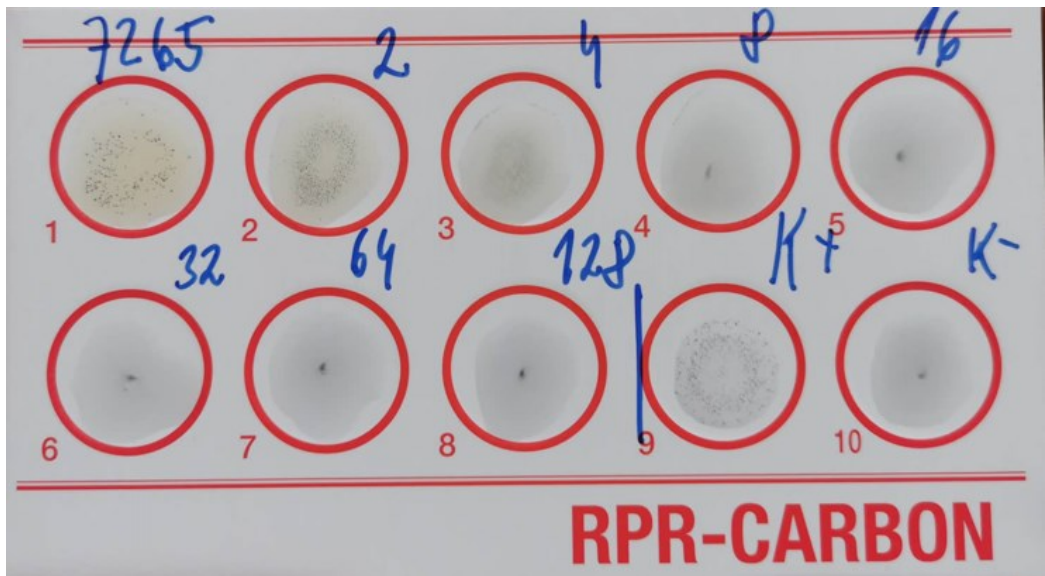
Obrázek 3 – Pozitivní vzorek VDRL [Autor]



Obrázek 4 – Negativní vzorek VDRL [Autor]

RPR je test, který funguje na obdobném principu jako test VDRL. Rozdíl je v provedení testu. RPR se provádí na plastem potažené kartě a vyhodnocení se provádí makroskopicky. Po osmiminutové inkubaci za stálého míchání je nutné výsledky bez prodlevy odečíst. Antigen je v tomto případě adsorbovaný na karbonových částicích, což zajišťuje vizuální detekovatelnost. Antigen se skládá z kardiolipinu, lecitinu, cholesterolu, 10% cholinchloridu, EDTA a aktivního uhlí v pufru. Výsledná pozitivita se projevuje jako shluk částic, v případě negativity ke shlukování nedochází (viz Obrázek 5). Stejně jako u VDRL i zde se může provádět semi-quantitativní hodnocení v sérii ředění. Sensitivita testu se pohybuje okolo 73 % u latentní syfilis, 100 % u sekundární syfilis a 86 % u primární syfilis. Pro základní screening je potřeba 50 μ l vzorku, pro následnou titraci dalších 50 μ l. [29, 59, 60]

Jedná se o levný a rychlý test, existuje však studie o vysoké mezilaboratorní variabilitě výsledků. Report vytvořený skupinou Gupta a kol. v roce 2009 ukázal 58,7 % odchylku v testování RPR 138 sérologickými panely mezi 26 laboratořemi. Tato variabilita byla přisuzována několika faktorům. Mezi ně patří opožděné hodnocení, nedostatečná laboratorní teplota, použití různých RPR karet a zkreslená interpretace výsledků. [61]



Obrázek 5 – RPR [Autor]

5.2.2 Automatické provedení netreponemových testů

Automatické provedení RPR testu lze provést pomocí plně automatizovaného analyzátoru AIX1000, který je schválený FDA a má rovněž CE certifikaci. Jedná se o analyzátor, který provádí kvalitativní i semi-kvantitativní hodnocení RPR. Analyzátor provádí všechny kroky zpracování, včetně ředění, dávkování a pipetování. AIX1000 je řízen vlastním softwarovým programem. Reakce probíhá na stejném principu jako manuální RPR. K séru se přidává antigen navázaný na karbonových částicích, v přítomnosti antikardiolipinových protilátek dochází k aglutinaci, která je detekovaná CCD kamerou. Reakce probíhá v 48 jamkové mikrotitrační destičce s plochým dnem. Pro titraci hladiny protilátek je používána 96 jamková destička s plochým dnem. Kapacita přístroje je 192 vzorků. Spotřeba vzorku je 105 μ l pro základní screening, 93,75 μ l pro nízký titr a 20 μ l pro vysoký titr. Dohromady s mrtvým objemem je potřeba na všechny analýzy 500 μ l séra. [62, 63, 64]

Séra se řadí do stojanu určeného pro vzorky na určené pozice. Součástí přístroje je také čtečka čárových kódů. V případě, že laboratoř nedisponuje systémem čárových kódů, lze identifikaci vzorků zavést do systému ručně nebo importem z předem připraveného souboru. Přístroj je vybaven automatickým rozpoznáním lokace vzorku pomocí inteligentního stojanu. [65, 66]

Reagencie jsou umístěny ve stojanu na předem určených místech a během procesu je kontrolována jejich hladina. Antigen je během procesu míchán magnetickým míchadlem pro zajištění homogenity. Přístroj automaticky pipetuje vzorky do příslušných míst v mikrotitrační destičce. Destičky jsou během inkubace promíchávány pomocí integrované orbitální třepačky, která je navržena tak, aby nedošlo k rozlití a kontaminaci vzorků. Nosič je vybaven prostorem pro čtyři mikrotitrační destičky (viz Obrázek 6). Pokud je prováděna titrace, jedna z pozic bude obsazena 96 jamkovou destičkou pro ředění vzorků. [65, 66]



Obrázek 6 – Prostor pro mikrotitrační destičky analyzátoru AIX1000 [67]

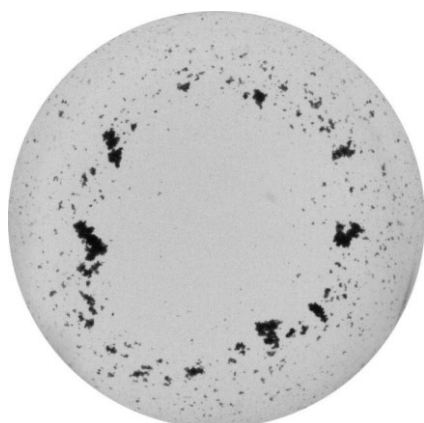
AIX1000 využívá systém s jednou sondou a duálními jehlami. Nejsou zde využívány jednorázové hroty, jehly jsou dekontaminovány pomocí speciálního dekontaminačního roztoku. Tento systém je schopný přesného dávkování v rozmezí množství $1\mu\text{--}300\mu$. Detekce hladiny kapalin je prováděna prostřednictvím vodivosti. Systém může pracovat jak se separovaným sérem/plazmou, tak i s originálním materiálem obsahujícím sraženinu nebo erythrocyty. Vyhodnocení se provádí pomocí CCD kamery, která je namontovaná na sondě. Kamera nejdříve pořídí vysoce kvalitní snímky každé jamky mikrotitrační destičky pomocí odrazu světla. Konečný výsledek je analyzován pomocí algoritmu pro zpracování obrazu ze snímků pořízených CCD kamerou. Snímky jednotlivých jamek destičky jsou k dispozici společně s výsledkem měření (viz Obrázek 7). [65, 66]



Obrázek 7 – Zobrazení výsledků na analyzátoru AIX1000 [68]

Součástí přístroje je počítač s integrovaným softwarem, který zajišťuje mimo jiné také archivaci všech dat. V prvním kole analyzátor provede screening s neřaděnými vzorky. V případě positivity vzorku pokračuje prvním řaděním v poměrech 1:2 až 1:16. Jestliže je vzorek pozitivní při řaděním 1:16, provádí se vyšší řaděním, a to do poměru 1:256. [65, 66]

Na obrázku (viz Obrázek 8) lze vidět pozitivní výsledek a negativní výsledek (viz Obrázek 9), který je jednou z forem výstupu výsledku z analyzátoru.



Obrázek 8 – Pozitivní výsledek na analyzátoru AIX1000 [69]



Obrázek 9 – Negativní výsledek na analyzátoru AIX1000 [70]

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 Výběr vzorků

Experiment byl proveden ve Státním zdravotním ústavu, v Národní referenční laboratoři pro syfilis. Srovnávací studie byla uskutečněna se vzorky zaslanými ke confirmaci od ledna 2022 do srpna 2022. Do studie bylo zařazeno celkem 170 vzorků od pacientů. Jedním z kritérií pro výběr vzorku bylo jeho dostatečné množství pro automatické i manuální hodnocení. Soubor pacientů byl rozdělen do tří skupin, rozdělení bylo provedeno na základě výsledků confirmačních testů. V potaz byly brány výsledky testu TPPA, TPHA, FTA-ABS IgG (příp. IgM) a 19SPHA IgM. Pacienti byli ženského i mužského pohlaví z různých věkových skupin. Ke všem pacientům byla dostupná celková anamnéza, včetně přítomnosti klinických příznaků.

První skupinu tvořili pacienti s negativním nálezem pro syfilis. Skupina byla tvořena 20 vzorky, jednalo se převážně o dětské pacienty. U těchto pacientů nebyla prokázána pozitivita v žádném z provedených testů. Druhou skupinu tvořily čerstvé záchyty. Jednalo se o pacienty, u kterých byla poprvé prokázána časná syfilis, nebo se jednalo o relaps či reinfekci. V této kategorii bylo celkem 100 pacientů. Třetí skupinu tvořili již léčení pacienti, kteří byli na základě confirmačních testů pozitivně diagnostikováni již dříve. Tuto skupinu tvořilo 50 vzorků. Toto rozdělení je velmi důležité z hlediska volby léčby, volby přístupu k jednotlivým pacientům a zvolení vhodné péče. Vzorky byly postupně otestovány manuálním netreponemovým testem a následně automatickým netreponemovým testem.

Pro hodnocení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti testu byl vybrán vzorek jednoho séra, u kterého se provedlo opakované automatické hodnocení pomocí analyzátoru AIX1000.

6.2 Použité diagnostické metody

6.2.1 Manuální netreponemový test

Pro manuální analýzu vzorku byl použit test VDRL od společnosti Dialab s r.o. Jedná se o panelový aglutinační test pro kvalitativní a semi-quantitativní detekci reaginů. Antigenní částice po smíchání aglutinují s reaginy ve vzorku. Reaginy jsou tvořeny v průběhu syfilitické infekce. Interferující látkou je především hemoglobin, lipidy a bilirubin. Při každé analýze je potřeba provést kontrolu kvality k posouzení účinnosti testu. Ta se provádí použitím pozitivní a negativní kontroly.

Pomůcky a reagensie

VDRL kit obsahuje antigenní reagensii tvořenou suspenzí lipidových komplexů, pozitivní kontrolu a negativní kontrolu. Pozitivní kontrola je tvořena umělým sérem s ředěním reaginů $\geq 1:8$. Negativní kontrola je tvořena zvířecím sérem. Reagensie jsou připraveny k okamžitému použití. Dále je potřeba fyziologický roztok na titraci vzorku, mechanický rotátor, pipety s jednorázovými špičkami, sklíčka a světelný mikroskop.

Pracovní postup

Vzorky a ostatní reagensie bylo nutné přivést na laboratorní teplotu (18-25°C). Při nižších teplotách může být ovlivněna citlivost testu. Kvalitativní metoda se provedla aplikací 50 μ l vzorku a 20 μ l antigenu na sklíčko. Následně se sklíčko umístilo na mechanický rotátor, který provádí rotaci při 160-180 rpm/min po dobu 4 minut. Výsledek byl odečten pomocí světelného mikroskopu do 4 minut po ukončení inkubace. Při pozdějším odečtu by mohlo docházet k výskytu falešně pozitivního výsledku. Pro pozitivní vzorky se povedlo semi-quantitativní hodnocení sériovým ředěním fyziologickým roztokem. Postup zpracování byl stejný jako při kvalitativní metodě.

Výsledek

Přítomnost nebo nepřítomnost aglutinace se hodnotila při zvětšení 100x ve světelném mikroskopu. Titr se definuje jako převrácená hodnota nejvyššího ředění, při kterém reakce ještě vykazuje pozitivní výsledek.

6.2.2 Automatický netreponemový test

Pro automatickou analýzu byl použit analyzátor AIX1000 Agglutination Analyzer (Gold Standard Diagnostics, USA) a GSD RPR reagensie.

Pomůcky a reagensie

Součástí kitu je antigenní suspenze, pozitivní kontrola (reaktivní lidské sérum) a negativní kontrola (nereaktivní lidské sérum). Všechny reagensie jsou připraveny k okamžitému použití. Další potřebnou reagensií je fosfátový pufr (PBS), dekontaminační roztok, fyziologický roztok pH 6 - 7,5 a destilovaná voda. Dalším potřebným materiálem je 48 jamková destička s plochým dnem, 96 jamková destička s plochým dnem pro ředění vzorků a magnetické míchadlo. Pro ředění do vysokých titrů je nutné si připravit roztok nereaktivního séra smíchaného s fyziologickým roztokem v poměru 1:50.

Pracovní postup

Před začátkem měření byly všechny reagensie a vzorky vytemperovány na laboratorní teplotu. Pro promývání přístroje byl využit roztok PBS, který byl umístěn v určené láhvi vedle přístroje. Po spuštění systému provedl přístroj 10 cyklů promytí. Důležitým krokem přípravy bylo odstranit veškeré nečistoty z podsvíceného nosiče destiček pomocí alkoholového ubrousku. Následně se v programu postupně procházelo záložkami *Worklist*, kde se zapisoval název analýzy a šarže kitu. Dále záložkou *Samples*, kde se provedlo zanesení identifikačních čísel vzorků do systému. Identifikační čísla byla do systému zadána importem z předem připraveného souboru. Po umístění vzorků na příslušná místa se pokračovalo záložkou *Microtiter Plates*. Dle indikace systému se vložil potřebný počet destiček na příslušný nosič. Jamky, které již byly použity v předchozích analýzách, bylo možné označit a dále již nebyly použity v procesu. V záložce *Racks* bylo možné vidět rozložení vzorků a reagensií. Dle znázornění na obrázku bylo nutné vložit reagensie do příslušných pozic. Nezbytné bylo umístit do lahvičky s antigenem magnetické míchadlo. Následně se mohlo přejít ke spuštění analýzy. Po spuštění analyzátoru bylo ve vyskakovacích oknech potřeba potvrdit správné množství a pozici reagensií a dalšího vybavení. V určité fázi cyklu, kdy si přístroj napipetoval vzorky do jamek, bylo možné zkumavky se vzorky vyjmout

z přístroje a použít pro další analýzu v laboratoři. Každý vzorek nejdříve prošel screeningem a v případě positivity byla provedena nízká titrace. Jestliže byl vzorek pozitivní při ředění 1:16, bylo provedeno ředění do vyšších titrů.

Výsledek

Po skončení běhu bylo možné v záložce *Evaluation* vidět veškeré výsledky měření. Dle výsledku přístroj předurčil, zda se bude pokračovat s titrací či nikoliv. Pro jednotlivé vzorky bylo možné v programu kromě výsledku v titrech vidět také snímky jamky.

6.2.3 Hodnocení opakovatelnosti

Opakovatelnost je měření těsnosti shody mezi výsledky zkoušek za určitých podmínek. Hodnocení opakovatelnosti testu spočívá v provedení opakovaného měření stejnou metodou, ve stejné laboratoři, stejným pracovníkem, se stejným vybavením a v krátkém časovém rozmezí mezi jednotlivými měřeními. Předpokladem je, že při opakovaném měření dosahujeme stejných nebo srovnatelných výsledků. [71]

Postup

Součástí experimentální části práce je měření opakovatelnosti automatického hodnocení RPR pomocí analyzátoru AIX1000. Měření probíhalo stejným postupem jako porovnávání metod hodnocení vzorku. Byl vybrán jeden vzorek, který byl desetkrát změřen ve dvou nezávislých krátce po sobě následujících bězích. Měření probíhalo stejným pracovníkem, v těsném časovém rozestupu. Výsledky hodnocení byly zapsány do tabulky.

6.2.4 Hodnocení reprodukovatelnosti

Měření reprodukovatelnosti je měření těsnosti shody při měnících se podmínkách. Provádí se stejná metoda v různém čase, různými osobami. Předpokladem je, že dojde k těsné shodě mezi výsledky měření. [71]

Postup

Součástí experimentální části práce je měření reprodukovatelnosti automatického hodnocení RPR pomocí analyzátoru AIX1000. Nejdříve se provedlo měření deseti alikvotů jednoho vzorku jedním pracovníkem. V následující den bylo měření zopakováno jiným pracovníkem laboratoře. Výsledky hodnocení byly zapsány do tabulky.

6.3 Použité statistické metody

Statistické zpracování bylo realizováno ve spolupráci s RNDr. Markem Malým, CSc. z Oddělení biostatistiky ve Státním zdravotním ústavě. Statistické výpočty byly provedeny pomocí statistického softwaru Stata 17 (StataCorp LLC, College Station, USA). Použity byly testy symetrie, tzv. Bowkerův test a McNemarův test. McNemarův test pro naše účely vycházel z čtyřpolní kontingenční tabulky a byl použit pro hodnocení shody rozřazení na pozitivní a negativní, bez ohledu na titr. Bowkerův test vycházel z čtvercové kontingenční tabulky a použil se pro srovnání semi-kvantitativního hodnocení v celkové skupině i v jednotlivých skupinách. Testování probíhalo na 95 % hladině významnosti. Opakovatelnost a reprodukovatelnost byla hodnocena na základě procentuální shody v souboru měření s tolerovaným rozdílem ± 1 ředění.

7. VÝSLEDKY

7.1 Porovnání automatického a manuálního hodnocení v celkovém souboru vzorků

Při celkovém porovnání automatického a manuálního hodnocení 170 vzorků byl zjištěn statisticky významný posun. Hodnota p byla menší než 0,001, tedy menší než hladina významnosti 0,05. Hodnoty automatického měření byly posunuty pod diagonálou, vykazovaly tedy nižší titry než při manuálním hodnocení (viz Tabulka 2). Titry v tabulkách jsou zapisovány jako 1, 2, 4, 8 apod. Negativní výsledky jsou označeny 0.

Titry		AIX1000										
		0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	Celkem
VDRL	0	36	1	0	0	0	0	0	0	0	0	37
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	10	15	3	0	0	0	0	0	0	0	28
	4	1	5	6	0	0	0	0	0	0	0	12
	8	0	1	3	10	1	0	0	0	0	0	15
	16	0	0	4	14	5	1	0	0	0	0	24
	32	0	0	0	1	9	5	1	0	0	0	16
	64	0	0	0	0	1	6	12	2	0	0	21
	128	0	0	0	0	1	0	1	8	1	0	11
	256	0	0	0	0	0	0	0	4	1	1	6
Celkem		47	22	16	25	17	12	14	14	2	1	170

Tabulka 2 – Kontingenční tabulka pro celkový soubor vzorků

7.2 Porovnání automatického a manuálního hodnocení u léčených pacientů

Při porovnání automatického a manuálního hodnocení v souboru 50 vzorků léčených pacientů byl zjištěn statisticky významný posun. Hodnota p byla menší než 0,001, tedy menší než hladina významnosti 0,05. Hodnoty automatického měření jsou posunuty pod diagonálou, vykazují tedy nižší titry než manuální hodnocení (viz Tabulka 3).

Titry		AIX1000								
		0	1	2	4	8	16	32	64	Celkem
VDRL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	5	4	1	0	0	0	0	0	10
	4	0	2	2	0	0	0	0	0	4
	8	0	0	1	4	1	0	0	0	6
	16	0	0	4	11	3	0	0	0	18
	32	0	0	0	1	5	2	0	0	8
	64	0	0	0	0	1	2	1	0	4
	Celkem	5	6	8	16	10	4	1	0	50

Tabulka 3 – Kontingenční tabulka pro skupinu léčených pacientů

7.3 Porovnání automatického a manuálního hodnocení u negativních pacientů

Při porovnání automatického a manuálního hodnocení v souboru 20 negativních vzorků došlo k absolutní shodě (viz Tabulka 4). Hodnota p byla rovna 1,00. Byla tedy vyšší než hladina významnosti 0,05. Symetrie nebyla porušena.

		AIX1000	
		0	Celkem
VDRL	0	20	20
	Celkem	20	20

Tabulka 4 – Kontingenční tabulka pro skupinu negativních vzorků

7.4 Porovnání automatického a manuálního hodnocení u pacientů s čerstvým záchytem

Při porovnání automatického a manuálního hodnocení 100 vzorků od pacientů s čerstvým záchytem bylo zjištěno statisticky významné porušení symetrie. Hodnota p byla menší než 0,001, byla tedy menší než hladina významnosti 0,05 (viz Tabulka 5). Hodnoty automatického hodnocení jsou buď stejné, nebo nižší než výsledky manuálního hodnocení. Pouze v jednom případě je hodnota automatického hodnocení pozitivní 1:1, zatímco hodnota manuálního hodnocení je negativní.

Titry		AIX100										
		0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	Celkem
VDRL	0	16	1	0	0	0	0	0	0	0	0	17
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	5	11	2	0	0	0	0	0	0	0	18
	4	1	3	4	0	0	0	0	0	0	0	8
	8	0	1	2	6	0	0	0	0	0	0	9
	16	0	0	0	3	2	1	0	0	0	0	6
	32	0	0	0	0	4	3	1	0	0	0	8
	64	0	0	0	0	0	4	11	2	0	0	17
	128	0	0	0	0	1	0	1	8	1	0	11
	256	0	0	0	0	0	0	0	4	1	1	6
	Celkem	22	16	8	9	7	8	13	14	2	1	100

Tabulka 5 – Kontingenční tabulka pro skupinu pacientů s čerstvým záchytem

7.5 Shoda rozřazení na negativní a pozitivní

Pro doplnění byla v další části data hodnocena bez ohledu na titr, jen v dělení na pozitivní (kódováno 1) a negativní (kódováno 0).

V celkovém souboru 170 vzorků byla symetrie statisticky významně porušena ($p=0,006$), 11x nastala situace, při které bylo ruční hodnocení reaktivní (pozitivní) a automatické negativní. Pouze 1x nastala opačná situace. Ve všech ostatních případech se obě metody ohledně reaktivity/negativity shodly (viz Tabulka 6).

		AIX1000		
		0	1	Celkem
VDRL	0	36	1	37
	1	11	122	133
	Celkem	47	123	170

Tabulka 6 – Shoda rozřazení v celkovém souboru vzorků

V souboru 50 léčených pacientů byl posun patrný, nebyl však statisticky významný ($p=0,063$, viz Tabulka 7).

		AIX1000		
		0	1	Celkem
VDRL	0	0	0	0
	1	5	45	50
	Celkem	5	45	50

Tabulka 7 – Shoda rozřazení v souboru léčených pacientů

V souboru 20 negativních vzorků nebyl žádný rozdíl mezi vyhodnoceními. Obě metody se shodly na negativních výsledcích (viz Tabulka 8).

		AIX1000	
		0	Celkem
VDRL	0	20	20
	Celkem	20	20

Tabulka 8 – Shoda rozřazení v souboru negativních vzorků

V případě skupiny vzorků od 100 pacientů s čerstvým záchytem nebyl zjištěn statisticky významný posun ($p=0,125$, viz Tabulka 9).

		AIX1000		
		0	1	Celkem
VDRL	0	16	1	17
	1	6	77	83
	Celkem	22	78	100

Tabulka 9 – Shoda rozřazení v souboru pacientů s čerstvým záchytem

7.6 Opakovatelnost

Všechna měření se shodla v ředění hladiny protilátek 1:16 (viz Tabulka 10). Shoda v hodnocení opakovatelnosti je tedy 100 %.

1. běh									
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16
2. běh									
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16

Tabulka 10 – Měření opakovatelnosti

7.7 Reprodukovatelnost

Všechna měření se shodla v ředění hladiny protilátek 1:16 (viz Tabulka 11). Shoda v hodnocení reprodukovatelnosti je tedy 100 %.

1. běh									
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16
2. běh									
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16	1:16

Tabulka 11 – Měření reprodukovatelnosti

8. DISKUSE

Počet pacientů s infekcí syfilis v posledních letech velmi stoupá a cílem zůstává eradikace tohoto onemocnění, či snaha zabránit masivnějšímu šíření v populaci. To je důvodem, proč jsou hledány nové směry, které by mohly zpřesnit a zrychlit diagnostiku tohoto onemocnění. Proces automatizace zasahuje téměř do všech odvětví, jeho cílem je zvýšení produktivity, snížení nákladů a zefektivnění práce [4, 72].

Z hlediska praktického posouzení má použitý automatický analyzátor pro RPR výhodu v tom, že je schopný dávkovat minimální objemy s velkou přesností, dokáže zajistit homogenitu antigenu pomocí magnetického míchadla, je schopný analyzovat velké množství vzorků současně a lze ho propojit přímo s laboratorním informačním systémem. Dalším důležitým bodem je zajištění důkladného promíchávání vzorku a antigenu během celé analýzy. Pokud není brána v potaz úvodní a závěrečná údržba přístroje, došlo automatickou analýzou k redukci času stráveného zpracováním materiálu a odečtem výsledku oproti manuální analýze.

Nevýhodou automatické analýzy je větší nárok na personál z hlediska znalosti práce s počítačem, větší prostorová náročnost a velká spotřeba vzorku. Z ekologického hlediska může být použití plastových mikrotitračních destiček větší zátěží pro životní prostředí než používání sklíček u manuálního provedení, při kterém jsou skla po dezinfekci znovu použitelná. To je naopak vyváжено tím, že přístroj používá jehlu, která je dekontaminována, namísto jednorázových plastových špiček, které jsou používané při manuálním zpracování [62].

Manuální provedení může být zatíženo vlivem lidského faktoru. Je zde vyšší riziko záměny vzorku, vyšší riziko nedodržení laboratorních podmínek a určeného času pro odečet testu. Nezbytností je řádně vyškolený personál pro správnou interpretaci dat.

Cílem práce bylo porovnat automatické a manuální hodnocení netreponemových testů při diagnostice syfilis. Dle statistických výsledků můžeme vidět, že v celkovém souboru 170 vzorků byl významný posun mezi automatickým a manuálním hodnocením. Automatické hodnocení vykazovalo nižší titry než hodnocení manuální. Škála rozdělení automatického hodnocení byla zachována, pouze byla posunuta k nižším titrům. Nicméně v případě, že je hodnocení prováděno pouze jedním typem

metody, není tento posun překážkou v použití. Reakce automatického testu na změnu titru protilátek při probíhající léčbě je zachována. Problém by nastal pouze při provedení testování jednou metodou a následnou kontrolou léčby druhým typem testování. V tomto případě by došlo k nesrovnalostem a nemohl by být správně určen účinek léčby a aktivita onemocnění.

Srovnání hodnocení bylo následně prováděno ve třech skupinách vzorků tak, aby byla detailněji zjištěna schopnost analýzy ve vzorcích s různými titry protilátek. Kategorie byly vytvořeny na základě výsledků konfirmačních testů prováděných v laboratoři NRL a na základě jejich anamnézy. Provedené testy byly FTA-ABS IgG, IgM, 19S SPHA IgM, TPPA a MHA-TP. První skupinu tvořili pacienti, kteří již byli léčeni s onemocněním syfilis. V této skupině byl zjištěn statisticky významný posun k nižším titrům při automatickém hodnocení. Rozdílná situace nastala ve skupině vzorků od negativních pacientů. Všechny vzorky byly shodně vyhodnoceny jako negativní. Ve skupině pacientů s čerstvým záchytem syfilis byly výsledky automatického hodnocení opět posunuty k nižším hodnotám titrů než výsledky hodnocení manuálního provedení.

Dle studie, která proběhla v imunologické laboratoři v University of North Carolina Hospitals, vznikla diskrepance mezi manuálním (metoda ASI RPR Card) a automatickým (analyzátor AIX1000) hodnocením pouze u 12 vzorků z 1028. Vliv na tuto skutečnost může mít i to, že velká část vzorků (996 testovaných vzorků) byla negativních. [60] Dle výsledků našeho testování lze vidět, že při hodnocení negativních vzorků nebyl patrný žádný statisticky významný posun.

Podobná studie proběhla také v Jižní Koreji, kde byl porovnáván konvenční RPR test (Macro-Vue RPR Card Tests, USA) a automatický RPR test HiSens Auto RPR LTIA (Jižní Korea). I v tomto případě byly titry protilátek v případě automatického hodnocení nižší než v případě manuálního. Vyšší sérokonverze byla zaznamenána u léčených pacientů pomocí automatického testu. [73] Opačná situace nastala v rámci studie prováděné v Severní Karolíně. Porovnáváno zde bylo automatické hodnocení pomocí analyzátoru AIX1000 a manuální hodnocení pomocí Micro-Vue RPR Card. Automatický analyzátor byl mnohem citlivější než manuální provedení a vykazoval pozitivitu v nízkých titrech i v případě vzorků, u kterých nebyl pozitivní konfirmační test TP-PA [74].

Rozdělení na pozitivní a negativní, bez ohledu na titer protilátek, v celkovém souboru našich vzorků vykazovalo statisticky významný posun. Jedenáctkrát nastala situace, že manuální hodnocení bylo pozitivní a automatické negativní. Pouze jedenkrát byla situace opačná. Při bližším zkoumání v rámci skupin bylo zjištěno, že ve skupině léčených pacientů byl patrný posun, který ale nebyl statisticky významný. Ve skupině negativních vzorků byla absolutní shoda ve výsledcích. Ve skupině vzorků s čerstvým záchytem nebyl zjištěn statisticky významný posun. Rozdílnost rozřazení v rámci skupiny léčených pacientů může být dána tím, že některé vzorky bývají zrnitější nebo ovlivněny shluky fibrinu, či jiných látek, které simulují aglutináty. Tím může dojít k nesprávnému subjektivnímu vyhodnocení. [2, 75]

Měření opakovatelnosti a reprodukovatelnosti hodnocení pomocí analyzátoru AIX1000 vykazovalo naprostou shodu. Analyzátor nebyl ovlivněn změnou pracovníka ani časovým rozptylem. Výsledky byly shodné také při zachování konstantních podmínek.

9. ZÁVĚR

Syfilis patří mezi významná sexuálně přenosná onemocnění, jehož incidence v posledních letech opět narůstá. Metody nepřímého stanovení, tedy detekce protilátek, mají významné postavení nejen z hlediska diagnostiky tohoto onemocnění, ale mají rovněž nezastupitelnou úlohu v rámci kontroly úspěšnosti terapie.

Výsledky dat získaných v této práci ukazují, že i přes znatelný posun v hodnotách titrů při automatickém a manuálním hodnocení je možné obě metody plnohodnotně používat jako součást diagnostického schématu pro diagnostiku syfilis. A to především z důvodu, že zůstává zachována škála rozložení výsledků, která odráží aktuální stav infekce po léčbě. Analyzátor AIX1000 je účinnou volbou pro zautomatizování netreponemových testů, s cílem poskytnout objektivnější výsledky.

10. POUŽITÉ ZKRATKY

BOZP	Bezpečnost a ochrana zdraví při práci
CCR5	Buněčný chemokinový receptor 5
CCD	Charge-coupled device Zařízení s vázanými náboji
CDC	Centres for Disease Control and Prevention Střediska pro kontrolu a prevenci nemocí
CE	z francouz. Conformité européenne Evropská shoda
CLIA	Chemiluminescence immunoassay Chemiluminiscenční analýza
CNS	Centrální nervová soustava
ČR	Česká republika
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid Ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay Enzymově vázaný imunosorbentový test
FITC	Fluorescein isothiocyanate Isothiocyanát fluoresceinu
FDA	Food and Drug administration Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FTA-ABS	Fluorescent treponemal antibody absorption Fluorescenční absorbční test
GSD	Gold Standard Diagnostics

HIV	Human Immunodeficiency Virus Virus lidské imunodeficiency
IgG	Imunoglobulin G
IgM	Imunoglobulin M
kDA	Kilodalton
MHA-TP	Microhemagglutination <i>Treponema pallidum</i> Mikrohemaglutinační <i>Treponema pallidum</i> test
MIU	Mezinárodní jednotka
PBS	Phosphate buffered saline Fosfátový pufr
PCR	Polymerase chain reaction Polymerázová řetězová reakce
PNC-G	Penicilin G
Rpm	Revolutions per minute Otáčky za minutu
RPN	Registr pohlavních nemocí
RPR	Rapid plasma reagin Rychlá reaginová reakce
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid Ribozomální ribonukleová kyselina
SPHA	Solid phase hemadsorption Hemadsorpce na pevné fázi
Th	T pomocný lymfocyt
TPP	<i>Treponema pallidum</i> subs. <i>pallidum</i>

TPPA	<i>Treponema pallidum</i> particle agglutination <i>Treponema pallidum</i> aglutinační test s částicemi
USA	United States of America Spojené státy americké
VDRL	Veneral disease research laboratories test Laboratorní test pro zjišťování pohlavních chorob
WHO	World Health Organization Světová zdravotnická organizace

11. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Příčiny falešně pozitivní reakce u netreponemových testů.....	26
Tabulka 2 – Kontingenční tabulka pro celkový soubor vzorků.....	39
Tabulka 3 – Kontingenční tabulka pro skupinu léčených pacientů.....	40
Tabulka 4 – Kontingenční tabulka pro skupinu negativních vzorků.....	41
Tabulka 5 – Kontingenční tabulka pro skupinu pacientů s čerstvým záchytem	42
Tabulka 6 – Shoda rozřazení v celkovém souboru vzorků	43
Tabulka 7 – Shoda rozřazení v souboru léčených pacientů	43
Tabulka 8 – Shoda rozřazení v souboru negativních vzorků	44
Tabulka 9 – Shoda rozřazení v souboru pacientů s čerstvým záchytem.....	44
Tabulka 10 – Měření opakovatelnosti.....	45
Tabulka 11 – Měření reprodukovatelnosti	45

12. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i>	13
Obrázek 2 – <i>Ulcus durum</i>	15
Obrázek 3 – Pozitivní vzorek VDRL	27
Obrázek 4 – Negativní vzorek VDRL	28
Obrázek 5 – RPR	29
Obrázek 6 – Prostor pro mikrotitrační destičky analyzátoru AIX1000	31
Obrázek 7 – Zobrazení výsledků na analyzátoru AIX1000	32
Obrázek 8 – Pozitivní výsledek na analyzátoru AIX1000.....	32
Obrázek 9 – Negativní výsledek na analyzátoru AIX1000	32

13. POUŽITÁ LITERATURA

1. KUKLOVÁ, Ivana. *Syphilis včera a dnes*. [Online] [Citace 3. 9. 2022] Dostupné z: <https://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2012/03/06.pdf>.
2. TRAMONT, Edmund C. *Treponema pallidum (Syphilis)*. In: MANDELL, Gerald L. a kol. *Principles and practice of infectious diseases*. 7. vydání. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2010, str. 3035-3051. ISBN: 978-0-4430-6839-3.
3. ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH INFORMACÍ A STATISTIKY ČR. *Pohlavní nemoci 2000*. [Online] [Citace 3. 10. 2022] Dostupné z: <https://www.uzis.cz/sites/default/files/knihovna/pohl2000.pdf>.
4. ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH INFORMACÍ A STATISTIKY ČR. *Zdravotnická ročenka České republiky 2019*. [Online] [Citace 3. 10. 2022] Dostupné z: <https://www.uzis.cz/res/f/008381/zdrroccz2019.pdf>.
5. STÁREK, Jiří. *Pohlavně přenosná onemocnění*. [Online] [Citace 2. 9. 2022] Dostupné z: <https://khsstc.cz/pohlavne-prenosna-onemocneni/>.
6. ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH INFORMACÍ A STATISTIKY ČR. *Registr pohlavních nemocí (RPN)*. [Online] [Citace 12. 9. 2022] Dostupné z: <https://www.uzis.cz/index.php?pg=registry-sber-dat--ochrana-verejneho-zdravi--registr-pohlavnich-nemoci>.
7. TUNBÄCK, Petra. *Syphilis, the forgotten disease*. [Online] [Citace 2. 9. 2022] Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34730835/>.
8. VAŇOUSOVÁ, Daniela a kol. *Neurosyphilis*. [Online] [Citace 6. 9. 2022] Dostupné z: <https://www.csnn.eu/casopisy/ceska-slovenska-neurologie/2012-3-8/neurosyphilis-38117>.
9. RADOLF, Justin D. a kol. *Treponema pallidum, the syphilis spirochete: making a living as a stealth pathogen*. *Nat Rev Microbiol*. [Online] [Citace 6. 9. 2022] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5106329/>.

10. WOZNICOVÁ, Vladana. *Původce syfilis – Treponema pallidum subsp. pallidum*. [Online][Citace 2. 9. 2022] Dostupné z: <http://www.medmicro.info/portal/syfilis/lvl3/ch01s02.html>.
11. GENEPROOF. *GeneProof Treponema pallidum PCR Kit*. [Online][Citace 16. 9. 2022] Dostupné z: <https://static.viaaurea.eu/t/geneproofcom/images/2129.png/ow:1620|fit:crop/s-e8a98c8baa02>.
12. SPOLEČNOST PRO TRANSFÚZNÍ LÉKAŘSTVÍ. *Dárci krve*. [Online][Citace 5. 9. 2022] Dostupné z: <https://www.transfuznispolecnost.cz/darci-krve>.
13. SANGESLAND, Anders. *Syphilis with vision loss*. Tidsskr Nor Laegeforen. [Online][Citace 5. 9. 2022] Dostupné z: <https://tidsskriftet.no/en/2021/01/kort-kasuistikk/syphilis-vision-loss>.
14. TSAI, Shelun a kol. *Syphilis in Pregnancy*. Obstetrical & Gynecological Survey. [Online][Citace 10. 10. 2022] Dostupné z: https://journals.lww.com/obgynsurvey/Abstract/2019/09000/Syphilis_in_Pregnancy.20.aspx.
15. CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Congenital Syphilis*. [Online][Citace 16. 10. 2022] Dostupné z: <https://www.cdc.gov/std/treatment-guidelines/congenital-syphilis.htm>.
16. ZÁKOUCKÁ, Hana. *Sexuálně přenosné infekce – moderní přístup k diagnostice – část I*. [Online][Citace 5. 10. 2022] Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/der/2020/01/02.pdf>.
17. NEMOCNICE PRACHATICE. *Anti- Treponema pallidum (netreponemový test, RPR)*. [Online][Citace 5. 10. 2022] Dostupné z: https://www.nempt.cz/files/lab_prirucka/LP_00979-L0000076.htm.
18. POLÁČKOVÁ, Zora. *Pohlavní choroby – I. díl*. [Online][Citace 6. 10. 2022] Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/der/2008/02/06.pdf>.

19. CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Syphilis – CDC Basic Fact Sheet*. [Online][Citace 6. 10. 2022] Dostupné z: <https://www.cdc.gov/std/syphilis/stdfact-syphilis.htm>.
20. VENEROLOGIE. *Syphilis, příjice*. [Online][Citace 4. 10. 2022] Dostupné z: <https://venerologie.cz/onemocneni/syphilis/>.
21. MATTEI, Peter L. a kol. *Syphilis: A Reemerging Infection*. Am Fam Physician. [Online][Citace 4. 10. 2022] Dostupné z: <https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2012/0901/p433.html>.
22. RAMONI, Stefano a kol. *Syphilitic Chancres of the Mouth: Three Cases*. [Online][Citace 14. 10. 2022] Dostupné z: https://www.medicaljournals.se/acta/content_files/files/web/3074-web-images/3074fig1_opt.jpeg.
23. KÚKOLOVÁ, Stanislava a Alena POSPÍŠILOVÁ. *Syphilis secundaria s mnohočetnými projevy condylomata lata*. [Online][Citace 23.11. 2022] Dostupné z: <https://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2010/02/07.pdf>.
24. CARBONE, Peter N. a kol. *Oral Secondary Syphilis*. Head and Neck Pathol. [Online][Citace 28. 9. 2022] Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12105-015-0623-3>.
25. JOHNSON, Russell A. a Adam M. SPIVAK. *Lues Maligna*. Open Forum Infect Dis. [Online][Citace 28. 9. 2022] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6300306/>.
26. CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Latent Syphilis*. [Online][Citace 28. 9. 2022] Dostupné z: <https://www.cdc.gov/std/treatment-guidelines/latent-syphilis.htm>.
27. NEMOCNICE PRACHATICE. *Anti-Treponema pallidum v séru*. [Online][Citace 15. 9. 2022] Dostupné z: https://www.nempt.cz/files/lab_prirucka/LP_14672-L0000075.htm.

28. SLOWIK, Kamil a kol. *Neurosyphilis jako příčina ischemické cévní mozkové příhody*. [Online][Citace 11. 9. 2022] Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/neu/2021/06/09.pdf>.
29. ZÁKOUCKÁ, Hana. *Syphilis – tradiční choroba, současný problém II*. [Online][Citace 11. 10. 2022] Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/syphilis-tradicni-choroba-soucasny-problem-ii>.
30. KOUNDANYA, Vikram V. a Koushik TRIPATHY. *Syphilis Ocular Manifestations*. [Online][Citace 12. 10. 2022] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558957/>.
31. ALQURASHI, Moayad M. a kol. *Ocular Syphilis Presenting As Non-arteritic Anterior Ischemic Optic Neuropathy*. Cureus. [Online][Citace 12. 10. 2022] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8396798/>.
32. KÁŠ, Svatopluk. *Malý slovník jmen lékařů a vědců, jejichž jména jsou spojena s názvy nervových chorob, syndromů, příznaků či částmi nervového systému. (část I.)*. [Online][Citace 15. 10. 2022] Dostupné z: <https://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2006/05/17.pdf>.
33. KLEIN, Alnat a kol. *The great imitator on the rise: ocular and optic nerve manifestations in patients with newly diagnosed syphilis*. Acta Ophthalmol. [Online][Citace 20. 10. 2022] Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/aos.13963>.
34. RAMCHANDANI, Meena S. a kol. *Otosyphilis: A Review of the Literature*. Sex Transm Dis. [Online][Citace 15. 10. 2022] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8530448/>.
35. BOŠTÍKOVÁ, Vanda a kol. *Vybrané virové a bakteriální perinatálně přenosné infekce – pohlavní infekce*. [Online][Citace 16. 10. 2022] Dostupné z: <https://www.solen.sk/storage/file/article/baeae6bd97ff83c8abc5b9960efa5cf3.pdf>.

36. CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Congenital Syphilis – CDC Fact Sheet*. [Online][Citace 1. 10. 2022] Dostupné z: <https://www.cdc.gov/std/syphilis/stdfact-congenital-syphilis.htm>.
37. STAŇKOVÁ, Eliška. *Syphilis congenita recens – kazuistiky*. [Online][Citace 2. 10. 2022] Dostupné z: <https://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2017/03/12.pdf>.
38. HUSSAIN, Syed A. a Ruben VAIDYA. *Congenital Syphilis*. [Online][Citace 3. 10. 2022] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537087/>.
39. RATHOD, Santosh a Bela SHAH. *Early prenatal syphilis* Indian Dermatol Online. [Online][Citace 3. 10. 2022] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3481403/>.
40. ROZEHNALOVÁ, Zuzana a kol. *Koinfekce syfilis a HIV*. [Online][Citace 7. 10. 2022] Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/cesko-slovenska-dermatologie/2009-5/koinfekce-syfilis-a-hiv-15580>.
41. KATZ, Kenneth A. a Jeffrey D. KLAUSNER. *Azithromycin resistance in Treponema pallidum*. Current Opinion in Infectious Diseases . [Online][Citace 29. 9. 2022] Dostupné z: https://journals.lww.com/co-infectiousdiseases/Abstract/2008/02000/Azithromycin_resistance_in_Treponema_pallidum.15.aspx.
42. CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Syphilis Treatment and Care*. [Online][Citace 29. 9. 2022] Dostupné z: <https://www.cdc.gov/std/syphilis/treatment.htm>.
43. MARKOWITZ, Milton. *Long-acting penicillins: historical perspectives*. Pediatric Infectious Disease . [Online][Citace 15. 10. 2022] Dostupné z: https://journals.lww.com/pidj/Citation/1985/09000/Long_acting_penicillins_historical_perspectives.54.aspx.
44. DHAKAL, Aayush a Evelyn SBAR. *Jarisch Herxheimer Reaction*. [Online][Citace 15. 10. 2022] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557820/>.

45. CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021*. [Online][Citace 16. 10. 2022] Dostupné z: <https://www.cdc.gov/std/treatment-guidelines/STI-Guidelines-2021.pdf>.
46. INSTITUT KLINICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY. *Anti-Treponema pallidum v séru*. [Online][Citace 16. 10. 2022] Dostupné z: https://www2.ikem.cz/plm_lp/LP_14672-L0000006.htm.
47. EDMONDSON, Diane G. A Steven J. NORRIS. *In Vitro Cultivation of the Syphilis Spirochete Treponema pallidum*. Curr Protoc. [Online][Citace 9. 10. 2022] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7986111/>.
48. WOZNICOVÁ, Vladana. *Laboratorní diagnostika syfilis*. [Online][Citace 2. 9. 2022] Dostupné z: <http://www.medmicro.info/portal/syphilis/lvl3/ch08.html>.
49. GAYET-AGERON, Angèle a kol. *Use of Treponema pallidum PCR in Testing of Ulcers for Diagnosis of Primary Syphilis*. Emerg Infect Dis. [Online][Citace 27. 9. 2022] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4285282/>.
50. CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Serodia Treponema pallidum particle agglutination test*. [Online][Citace 27. 9. 2022] Dostupné z: https://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/nhanes_01_02/l36_b_met_syphilis_serodia_treponema.pdf.
51. DYNEX. *ELISA Treponema pallidum*. [Online][Citace 27. 9. 2022] Dostupné z: https://www.dynex.cz/files/download/elisa_treponema_pallidum_igg.pdf.
52. MO, Xiaohui a kol. *Evaluation of a new chemiluminescence immunoassay for diagnosis of syphilis*. Eur J Med Res. [Online][Citace 27. 9. 2022] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3352047/>.
53. MAHMOOD, Tahrin a Ping-Chang YANG. *Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting*. N Am J Med Sci. [Online][Citace 30. 9. 2022] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3456489/>.

54. GALI. *Mastafleur™ FTA-ABS*. [Online][Citace 30. 9. 2022] Dostupné z: <http://www.gali.cz/wp-content/uploads/MASTAFUOR-FTA-ABS.pdf>.
55. CENTRES FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Syphilis – CDC Detailed Fact Sheet*. [Online][Citace 30. 9. 2022] Dostupné z: <https://www.cdc.gov/std/syphilis/stdfact-syphilis-detailed.htm>.
56. INSTITUT KLINICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY. *Nespecifické protilátky proti *Treponema pallidum* v séru*. [Online][Citace 30. 9. 2022] Dostupné z: https://www2.ikem.cz/plm_lp/LP_00443-L0000006.htm.
57. NAYAOK, Surajit a Basanti ACHARJYA. *VDRL Test and its Interpretation*. Indian J Dermatol. [Online][Citace 30. 9. 2022] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3312652/>.
58. DIALAB. *Syphilis VDRL*. [Online][Citace 30. 9. 2022] Dostupné z: https://www.dialab.cz/static/dokumenty/1/0/8/0/9/N_Syphilis_VDRL_test_4970_73_75.pdf.
59. ARYAL, Sagar. *Rapid Plasma Reagin (RPR) Test for the diagnosis of Syphilis*. [Online][Citace 1. 10. 2022] Dostupné z: <https://microbiologyinfo.com/rapid-plasma-reagin-rpr-test-for-the-diagnosis-of-syphilis/>.
60. SANFILIPPO, Alan M. a kol. *Comparison of Manual and Fully Automated AIX1000 Rapid Plasma Reagin Assays for Laboratory Diagnosis of Syphilis*. J Clin Microbiol. [Online][Citace 1. 10. 2022] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6062780/>.
61. LUM, Breanna a Shane R. SERGENT. *Rapid Plasma Reagin*. [Online][Citace 1. 10. 2022] Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557732/>.
62. GOLD STANDARD DIAGNOSTICS. *AIX1000 Fully automated RPR for Syphilis Serology*. [Online][Citace 13. 9. 2022] Dostupné z: https://uploads-ssl.webflow.com/5f6a4f28cb498c8cbfe7b639/62e0555b570183e19cdfa45f_GS_DM-0344%20Rev%20B-%20AIX1000%20Brochure.pdf.

63. GOLD STANDARD DIAGNOSTICS. *AIX1000*. [Online][Citace 13. 9. 2022] Dostupné z: <https://www.gsdx.us/aix-1000>.
64. PYDEN, Alexander a kol. *Evaluation of the fully automated AIX1000 rapid plasma reagin system compared to a manual plasma reagin testing method for the diagnosis of syphilis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. [Online][Citace 13. 9. 2022] Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0732889320304582?via%3Dihub>.
65. U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *510(k) Substantial Equivalence Determination Decision Summary*. [Online][Citace 13. 9. 2022] Dostupné z: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K150358.pdf.
66. GOLD STANDARD DIAGNOSTICS. *AIX1000® Agglutination Analyzer (REF 00400) User's Manual*. [Online][Citace 13. 9. 2022] Dostupné z: https://uploads-ssl.webflow.com/5f6a4f28cb498c8cbfe7b639/62e057c1e5d8e0f58b51264b_AIX-0001.2.0%20Rev%20B-%20AIX1000%20Agglutination%20Analyzer%20User%27s%20Manual.pdf.
67. GOLD STANDARD DIAGNOSTICS. *AIX1000*. [Online][Citace 18. 10. 2022] Dostupné z: https://uploads-ssl.webflow.com/5f6a4f28cb498c8cbfe7b639/5f6cf7ca3adcf6ffc57ae62c_AIX1000-orbital-shaker.jpg.
68. GOLD STANDARD DIAGNOSTICS. *AIX1000*. [Online][Citace 18. 10. 2022] Dostupné z: https://uploads-ssl.webflow.com/5f6a4f28cb498c8cbfe7b639/5f6b87f2b3bcb1fb7071b5dc_Software%20Development%20Image.jpg.
69. GOLD STANDARD DIAGNOSTICS. *AIX1000*. [Online][Citace 13. 9. 2022] Dostupné z: https://uploads-ssl.webflow.com/5f6a4f28cb498c8cbfe7b639/5f6d12cfcffdc2aff8e39137_strong-reactive-1-1024x1024-p-500.jpeg.

70. GOLD STANDARD DIAGNOSTICS. *AIX1000*. [Online][Citace 13. 9. 2022] Dostupné z: https://uploads-ssl.webflow.com/5f6a4f28cb498c8cbfe7b639/5f6d12946b68aa5cca8d80f3_non-reactive-1024x1024-p-800.jpeg.
71. ŠEVČÍK, Jiří. *ČSN ISO 5725: Přesnost (správnost a shodnost) metod a výsledků měření*. [Online][Citace 18. 10. 2022] Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~sevcik/csn5725.htm>.
72. ZIMA, Tomáš. *Laboratorní automatizace proč a jak?*. [Online][Citace 19. 12. 2022] Dostupné z: <https://ulbld.lf1.cuni.cz/file/479/automatizace%20FONS%202010%2005.pdf>.
73. LEE, Jong-Han a kol. *Comparison of an automated rapid plasma reagin (RPR) test with the conventional RPR card test in syphilis testing*. [Online][Citace 19. 12. 2022] Dostupné z: <https://bmjopen.bmj.com/content/4/12/e005664>.
74. PALAVECINO, Elizabeth L. a kol. *High Number of Positive Rapid Plasma Reagin With Low Titers Using the Automated AIX 1000 RPR System*. [Online][Citace 19. 12. 2022] Dostupné z: https://journals.lww.com/stdjournal/Fulltext/2022/01000/High_Number_of_Positive_Rapid_Plasma_Reagin_With.21.aspx
75. CASTRO, Arnold R. a kol. *Defibrination of Blood Plasma for Use in Serological Tests for Syphilis*. [Online][Citace 19. 12. 2022] Dostupné z: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CDLI.9.6.1376-1378.2002>.