

Mikrobiologický ústav uvádí

# NA STOPĚ PACHATELE



Díl devátý:

Pachatelé stočení do spirály

# Úvod: Z medické hymny „Diabetes mellitus, icterus et vomitus“

(Druhá sloka)

*Treponema pallidum*

*Gonococcus ruber*

*Ulcus molle*, *ulcus durum*

Molle est reparaturum

Nos curabit ...

(doplní se jméno  
vhodného urologa či  
dermatovenerologa)

Původce syfilis

Starý název původce  
kapavky (*N. gonorrhoeae*)

Měkký vřed – choroba  
způsobovaná *Haemophilus  
ducreyi*



[www.med.sc.edu](http://www.med.sc.edu)

Tvrdý vřed – jeden  
z typických příznaků syfilis

(Zpívá se jako  
*Gaudeamus igitur,  
iuvenes dum sumus*)

# Přehled témat

Klinická charakteristika spirálních bakterií

Mikrobiologická charakteristika a dg. spirochet

*Bonus: Rozšířené povídání o mikroskopii*

Klinická  
charakteristika  
spirálních  
bakterií

# Příběh první

- **Růžence Flekové** naskákaly po těle růžové skvrny. Vzpomněla si, že by to mohla být... No ano, to by odpovídalo, před několika týdny byla na táboře a **několikrát během tábora měla klíště.**
- **Obvodní lékař** ji poslal na **dětskou infekční kliniku**, kde **zkušená infekcionista** potvrdila, že opravdu s největší pravděpodobností jde o to, co si myslela Růženka. Pro jistotu ještě odebrala **sérum na průkaz protilátek...**



[www.med.sc.edu](http://www.med.sc.edu)

[www.borrelia.de](http://www.borrelia.de)

# Erythema migrans

- Toto je obrázek erythema migrans studenta M. M., který laskavě souhlasil s využitím ve výuce





# Viníkem byla

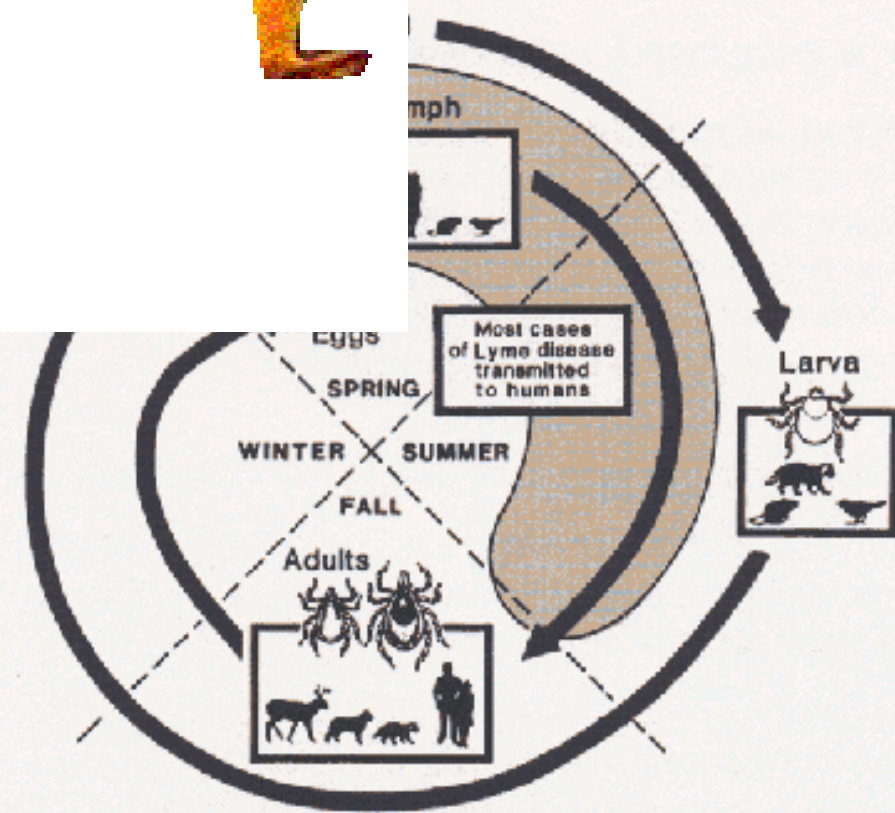
- *Borrelia afzelii*, jedna z borrelií, vyvolávajících Lymeskou nemoc a patřících do skupiny *Borrelia burgdorferi sensu lato* (= „v širším slova smyslu“)
- Tento druh „v širším slova smyslu“ se rozpadá na řadu „v užším slova smyslu“. Nejvýznamnější jsou *B. garinii*, *B. afzelii* a *B. burgdorferi sensu stricto*
- Zatímco v USA se vyskytuje zejména třetí z oněch borrelií a typické jsou kloubní příznaky, v Evropě jsou častější první dvě borrelie a typická je neuroborrelióza
- Kromě lymeské nemoci vyvolávají borrelie (jiné druhy) návratnou horečku (*B. duttoni*, *B. recurrentis*)



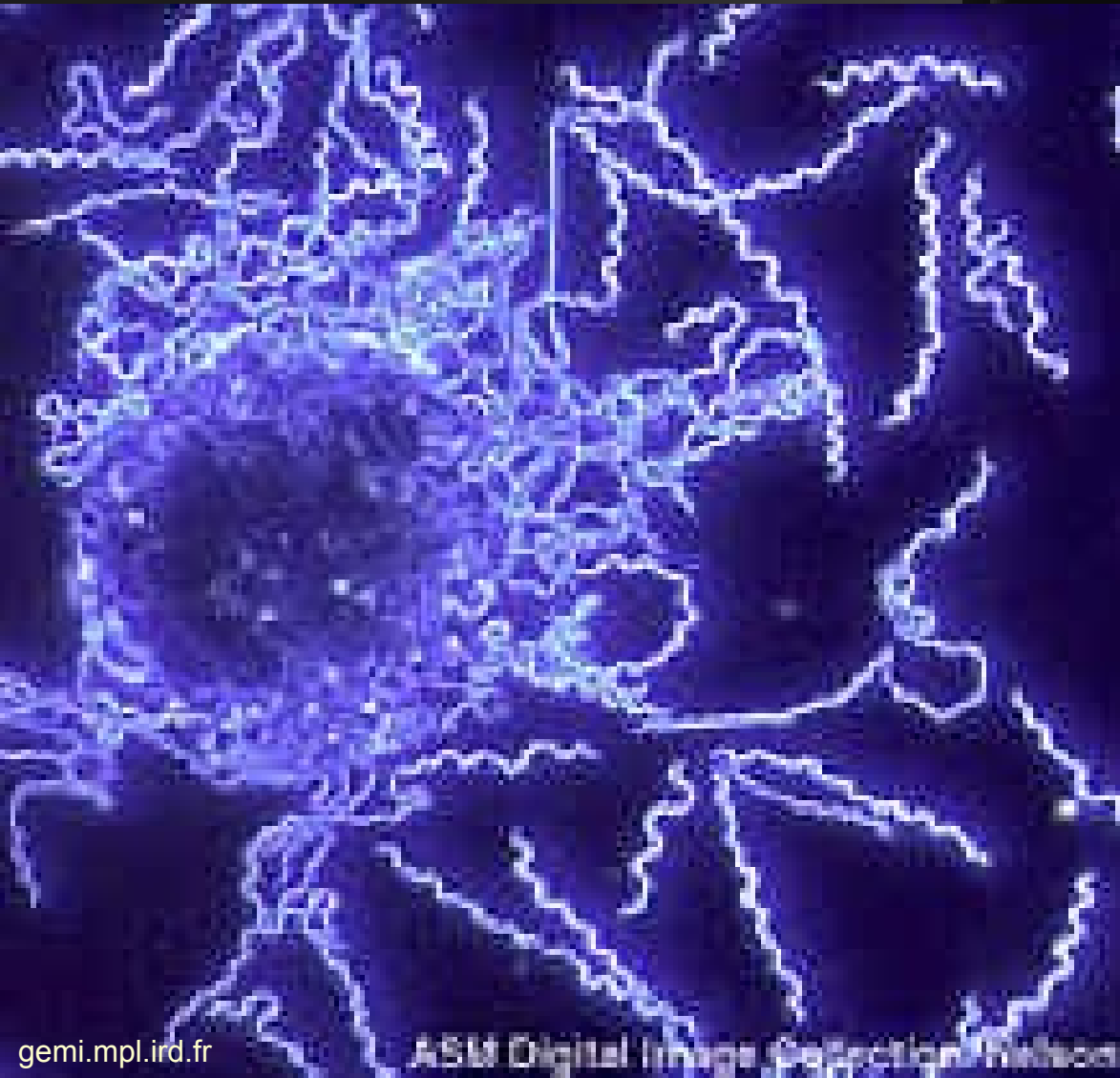


# Lymeská nemoc – zoonóza, přenášena klíšťaty

## The disease ticks

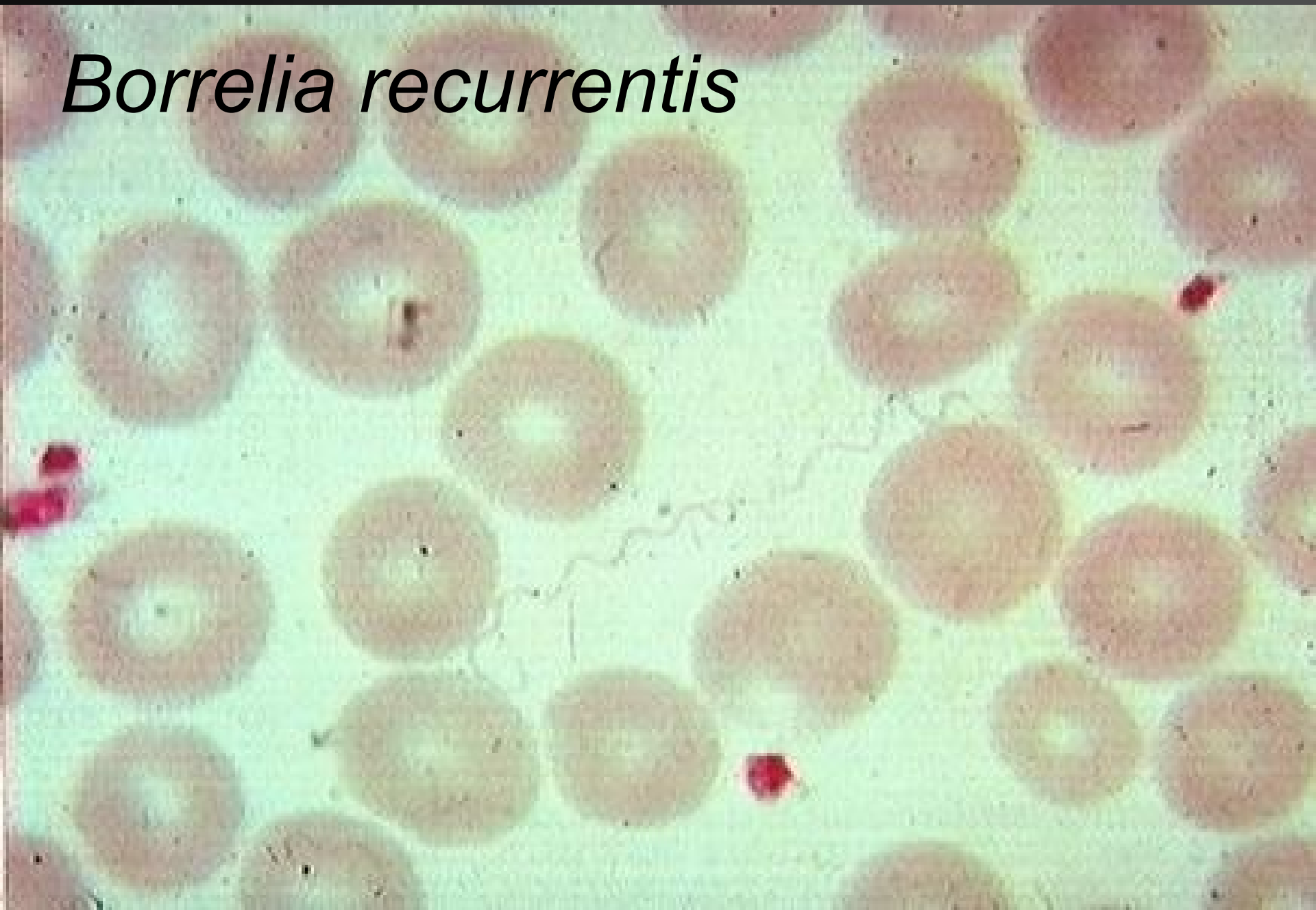


# *Borrelia burgdorferi*



<http://www.presse.uni-wuppertal.de>

# *Borrelia recurrentis*



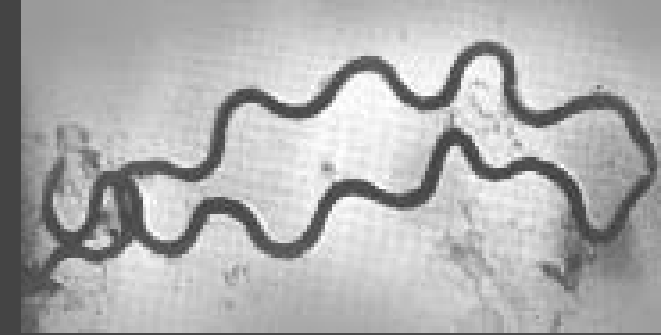
# Příběh druhý (vymyšlený, ale základ vychází ze skutečného příběhu)

- Když Lou zjistila, že „perník“ opravdu potřebuje, a čím dál víc, nebylo pro ni daleko k rozhodnutí **vydělávat si vlastním tělem**. Konec konců, sex měla vždycky ráda.
- Když si zákazník připlatil, **vyspala se s ním i bez kondomu**, brala přece antikoncepci a samotné jí to víc vyhovovalo...
- Pak se ale zamilovala a **rozhodla se mít dítě**. Vysadila antikoncepci a byla celá šťastná, Helmut bude určitě ten pravý otec...

# Příběh druhý – pokračování

- A tak tedy Lou byla těhotná. Zároveň si ale našla vředy na genitáliích a gynekoložka jí odebrala krev na serologické vyšetření. To vyšlo pozitivní. Lou odmítla interrupci ze zdravotních důvodů, jednak se na vše přišlo dost pozdě, jednak touha po dítěti byla silnější.
- Lou byla léčena, bohužel nevhodně zvoleným antibiotikem. Dítě se narodilo nemocné a po dvou týdnech zemřelo na sekundární klebsielovou sepsi

# Viníkem zde bylo



- *Treponema pallidum*, původce syfilis (lues) www.primer.ru
- Syfilis je klasická pohlavní nemoc. Přenáší se výhradně sexuálně. Jde ovšem o systémové onemocnění – v pokročilých stádiích postihuje celé tělo postiženého člověka (gummata, disekce aorty, neurolues, psychické příznaky)
- Některé poddruhy *T. pallidum* a některá jiná treponemata způsobují jiné, jinak přenášené choroby (framboesie – yaws, *T. pertenue*)
- Některá treponemata jsou i nepatogenní

# Gramatická poznámka

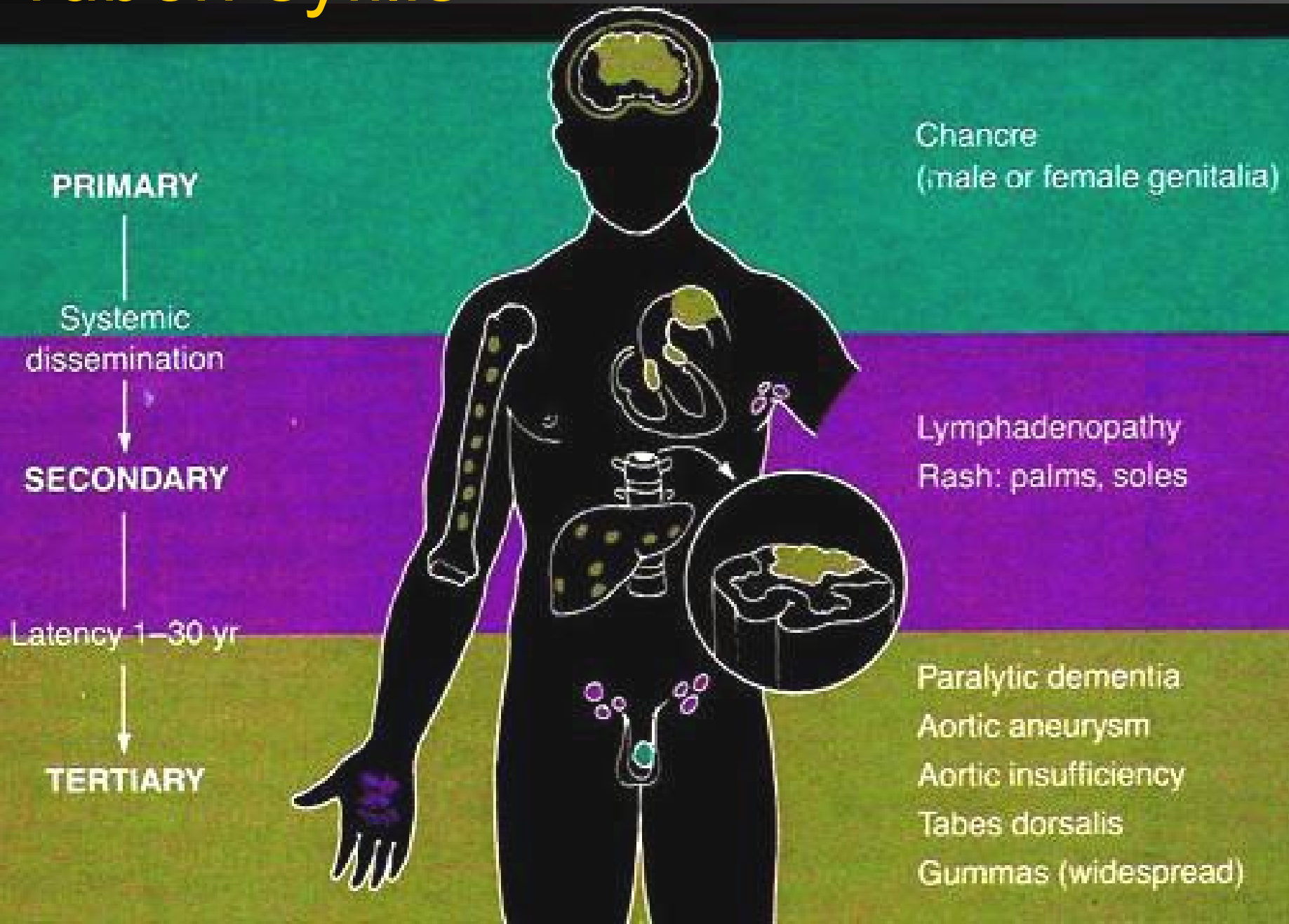
- *Treponema* je slovo řeckého původu. V řečtině je středního rodu a leží vedle slov jako je aróma, magma, sperma, smegma, miasma.
- Ovšem současnost slovo *Treponema* (ale i třeba slovo plasma) rozkolísala, a proto se často používá i ženský rod (ta *Treponema*)
- *Slovenčina urobila všetkým historickým reminiscenciám dôrazný koniec, a preto všetky tieto slová sú v slovenčine ženského rodu.*

# *Treponema pallidum*





# Průběh syfilis





primární syfilis  
(„šánkr“)

uhavax.hartford.edu (2x)

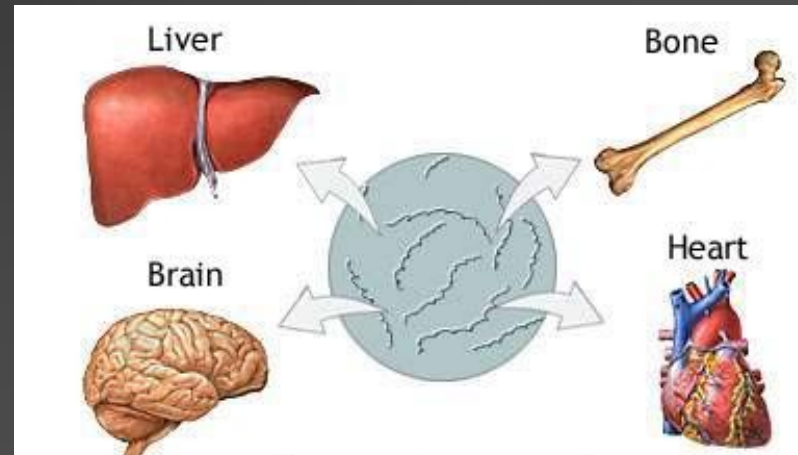
## Průběh syfilis

sekundární  
syfilis



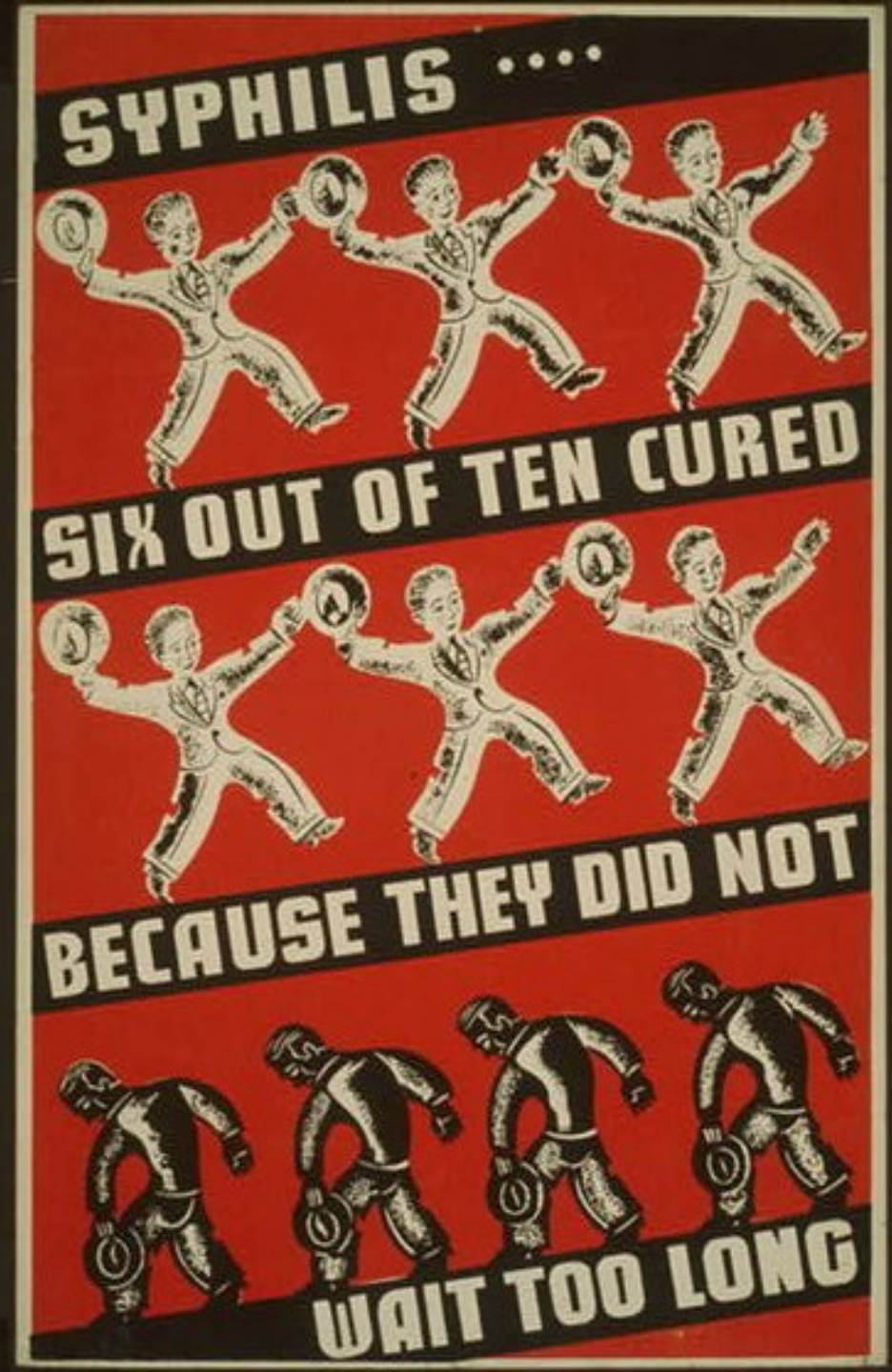
# Terciární syfilis

www.geocities.com



The organisms spread to various organs causing lesions or gummas

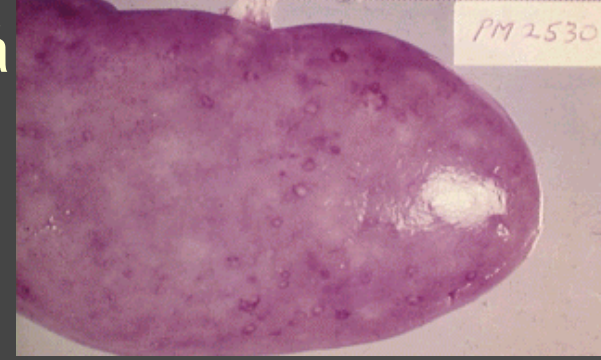
# Syphilis



# Yaws (framboesie)



Ledvina postižená  
příslušnou  
chorobou



www.med.sc.edu

# Příběh třetí

- **Pan Krysařík** byl pracovníkem firmy KVAK (Kocourkovské vodovody a kanalizace, a. s.)
- Jeho denním chlebem byla **údržba kanálů**. Nebylo kanálu, který by neznal. Znal i **zvyky potkanů**, měl je docela rád a rozuměl si s nimi.
- Přesto jednou došlo mezi ním a vůdcem tlupy potkanů k jakémusi nedorozumění a **pan Krysařík byl kousnut do lýtka**
- Netrvalo dlouho, a pan Krysařík ležel se **žloutenkou a krvácivými stavy v nemocnici...**

Tohle sice není pan Krysařík, ale  
jeden jeho venezuelský kolega  
s podobným osudem



# Viníkem je...



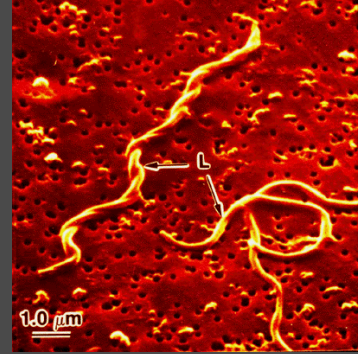
- *Leptospira interrogans* ser. *Icterohemorrhagiae*
- Dříve se jednotlivé serovary leptospir považovaly za samostatné druhy, nyní se všechny patogenní považují za součást druhu *Leptospira interrogans* (druhý druh *Leptospira biflexa* je nepatogenní)
- **Příznaky mohou být různé**, od „chřipkotyfových“ příznaků serovaru **Grippotyphosa** (blatácká horečka) až po žloutenku a krvácivé stavy (Weilova choroba, jako u pana Krysaříka) serovaru **Ictero-hemorrhagiae**.

*(Tyhle dva serovary se dají celkem logicky zapamatovat, tak když ne jiné, tak si hled'te zapamatovat aspoň je 😊)*



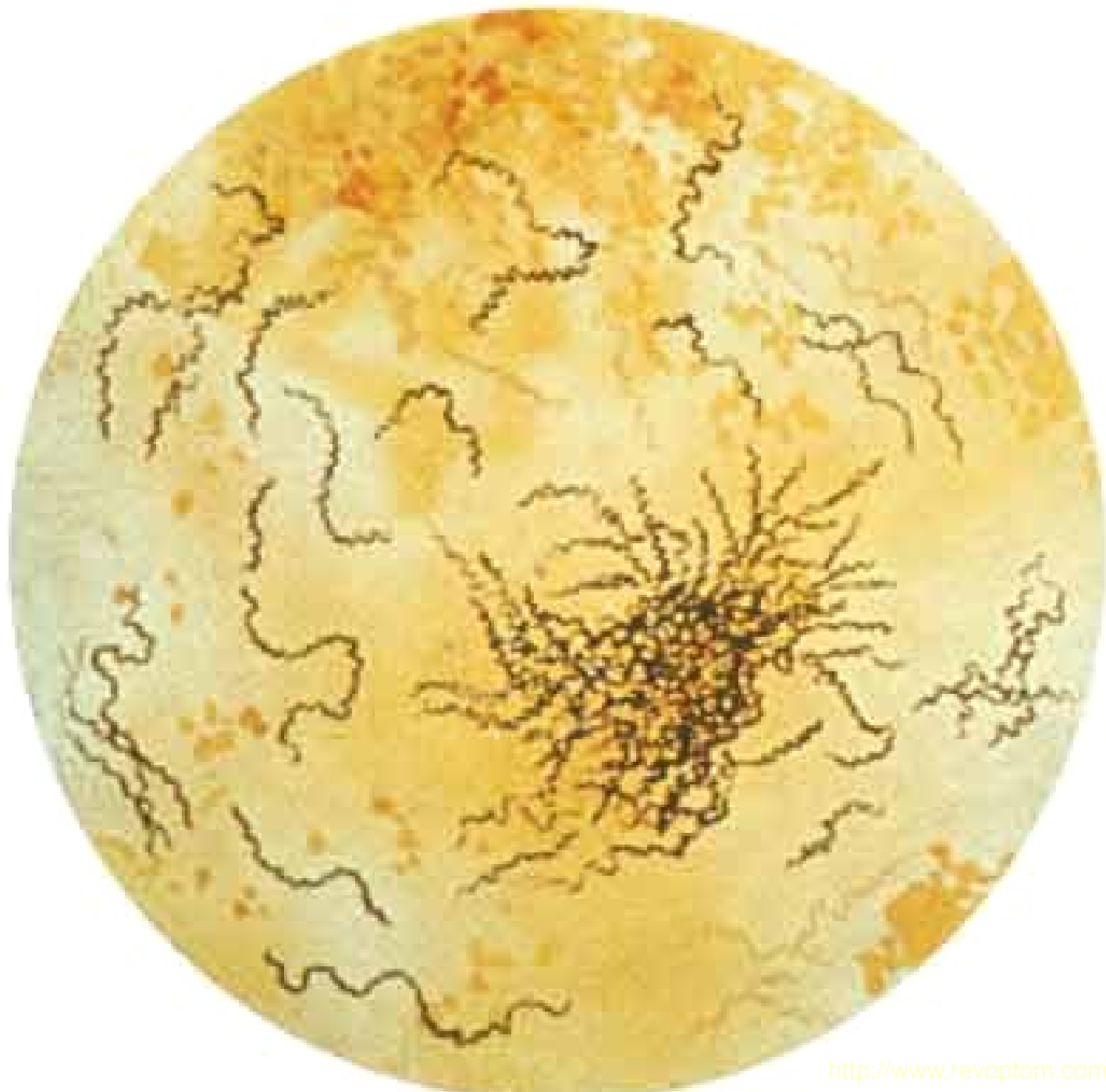
# Mikrobiologická charakteristika a diagnostika spirochet

# Spirochety



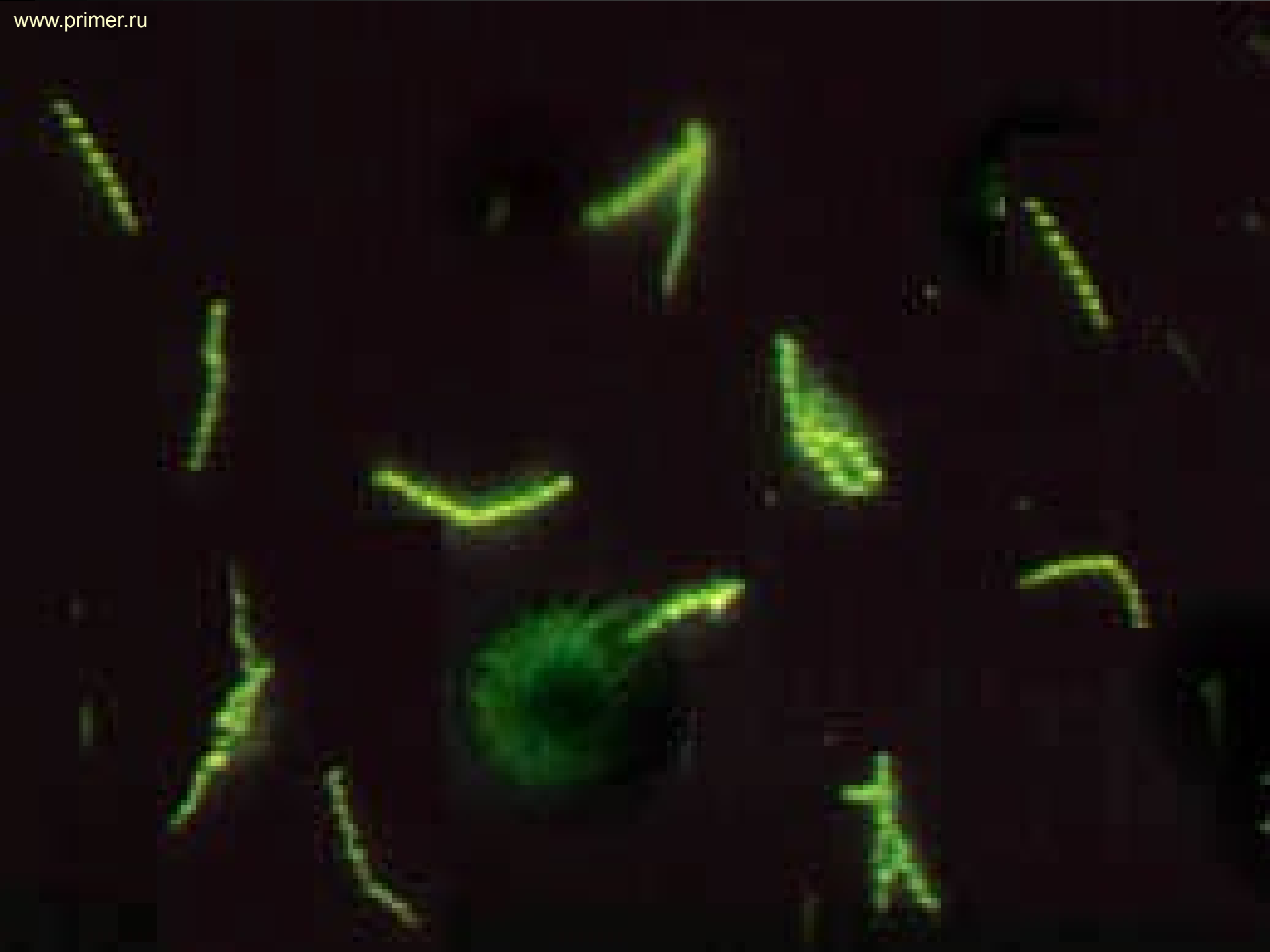
- Borrelie (ale také treponemata a leptospiry) jsou **spirochety**, tedy **spirální bakterie**.
- Jejich buněčná stěna je blízká gramnegativní, **ale podle Grama se nebarví** už proto, že jsou hrozně tenoučké. Mikroskopovat je lze pouze pomocí zástinu, fluorescence anebo imunofluorescence (což není totéž!)
- **Spirochety se obecně prakticky nedají kultivovat** (pokud se některé dají kultivovat experimentálně, nemá to praktický význam)

*Treponema pallidum*



# Treponemata: jak pátrat přímo

- **Přímý průkaz** se dělá zřídka už proto, že málokdy je co odebrat. Jen pokud má pacient(ka) zrovna tvrdý vřed, lze provést seškrab z něj.
- **Mikroskopie:** Používá se **nativní preparát – zástin**. Zvláštností je, že ač jde o nativní preparát, používá se imerze (treponemata jsou velmi subtilní). Mimo to lze provést **fluorescenční barvení**
- **Kultivace ani biochemická identifikace** se nepoužívají
- **Průkaz antigenu** lze provést přímou IMF
- **Pokus na zvířeti:** Existuje tzv. RIT – Rabbit infectivity test (test infekčnosti na králíkovi)
- **PCR diagnostika** se stává čím dál důležitější. *Zde je výjimka – kromě seškrabu z vředu lze posílat i plnou krev, i když výtěžnost vyšetření je menší.*



# Přímý průkaz syfilis – přehled

- RIT – Rabbit infectivity test. Z etických důvodů i z důvodu **pracnosti** se použití RIT minimalizuje.
- **Zástin** – hledají se zářící treponemata na tmavém pozadí
- **Přímá IMF** – další, avšak **pracná** přímá metoda
- **PCR** – i z krve

# New Zealand Rabbit užívaný k RIT

[www.rockinjawrabbits.com](http://www.rockinjawrabbits.com)



# Zástinová mikroskopie

www.medmicro.info

\*anglicky dark field, z toho anglický název zástinové mikroskopie „dark field microscopy“

Pouze paprsky lomící se na preparátu dopadají do oka pozorovatele. A proto oko pozorovatele vidí temné pole\* se zářícím(-i) objektem(-y)

A dark field micrograph showing a bright, glowing, comma-shaped bacterium (Treponema pallidum) against a dark background. The bacterium has a distinct hook-like end and a long, thin body. Other smaller, less distinct bright spots are visible in the background.

4B) T.pallidum - zástin



# Poznámky k mikroskopii

- Setkáváme se s různými typy mikroskopie:
- **Nativní preparáty** – používá se krycí sklíčko, nefixuje se, nepoužívá se většinou imerzní systém
- **Barvené preparáty** – fixuje se, po obarvení se zpravidla prohlíží imerzí
- **Zástinová mikroskopie** – jde o zvláštní případ nativního preparátu; většinou se však používá imerzní systém
- **Fluorescenční mikroskopie**; pokud je fluorescenčním barvivem značená protilátka či antigen, nejde o fluorescenci jako takovou, ale o imunofluorescenci; ta už je kombinací mikroskopie a serologie
- *Více najdete v bonusovém materiálu*



# Imunofluorescence

[www.medmicro.info](http://www.medmicro.info)



4c) *T.pallidum*, zv.400x

# Treponemata: jak pátrat nepřímo

- Používají se **netreponemové testy**, kde antigenem je zpravidla kardiolipin z hovězích srdcí, a **treponemové testy**, kde antigen je získán opravdu z *Treponema pallidum*
- Diagnostika se skládá ze **screeningu a konfirmace**. Konfirmuje se vše, co ve screeningu vyšlo pozitivní či aspoň hraniční, a dokonce i to, co bylo negativní, je-li důvod.
- **Screeningově** se zpravidla použije jeden netreponemový a jeden treponemový test
- **Konfirmace** se provádí pomocí velmi spolehlivých treponemových testů

# Přehled nejdůležitějších nepřímých testů na lues

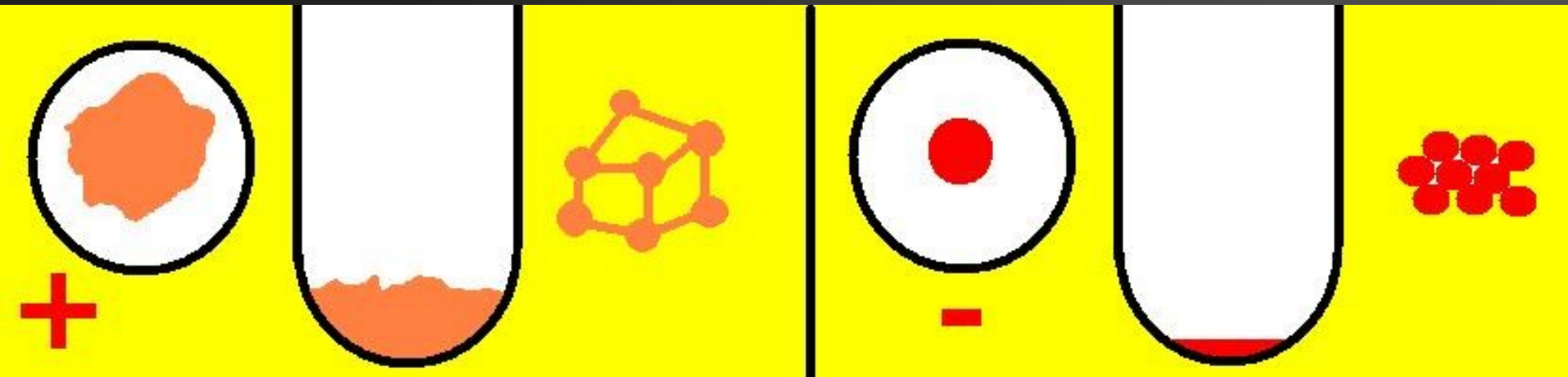
\*TPHA – Tr. pasivní hemaglutinační test  
 TPPA – dtto, místo krvinek polycelulóza

Historický	BWR – Bordet Wassermann	Netr.
Screeningové	RRR – Rapid Reagin Test <i>či RPR nebo VDRL test</i>	
	TPHA/TPPA*	Treponemové
Konfirmační	ELISA	
	FTA-ABS (nepř. imunofluor.)	
	Western Blotting	
<i>Historický, popř. superkonfirmace</i>	<i>TPIT (Treponema Pallidum Imobilizační Test) = Nelson</i>	

# RRR a TPHA

- U **RRR** je pozitivní důlek se zákalem (vypadá podobně jako pozitivní kontrola). Panelem je třeba příliš netřepat a nenaklánět.
- **TPHA**: Jde o aglutinaci na nosičích – červených krvinkách. Bramboře podobný útvar je pozitivní, tečka negativní

# TPHA – připomenutí



- Pozitivní – vzniká aglutinát, při pohledu shora chuchvalec nepravidelného tvaru
- Negativní – krvinky (u TPPA polycelulózové částice) klesají na dno a vytvářejí denzní pravidelnou kulatou tečku při pohledu shora

# Připomenutí

## TPHA II ([www.medmicro.info](http://www.medmicro.info))

Pozitivní kontrola (různá míra positivity)

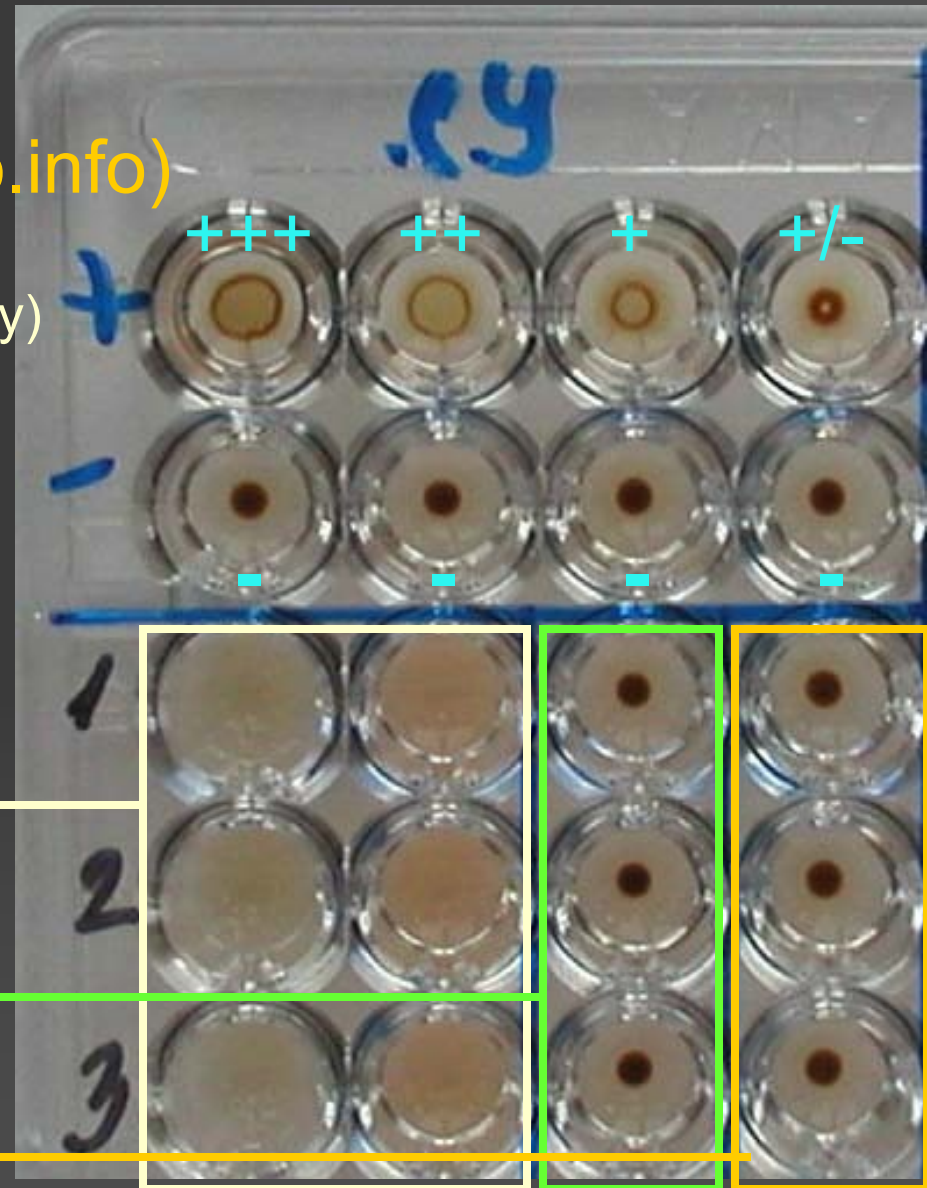
Negativní kontrola

Pacienti (1, 2, 3)

Technické důlky

Kontrola

Vlastní reakce

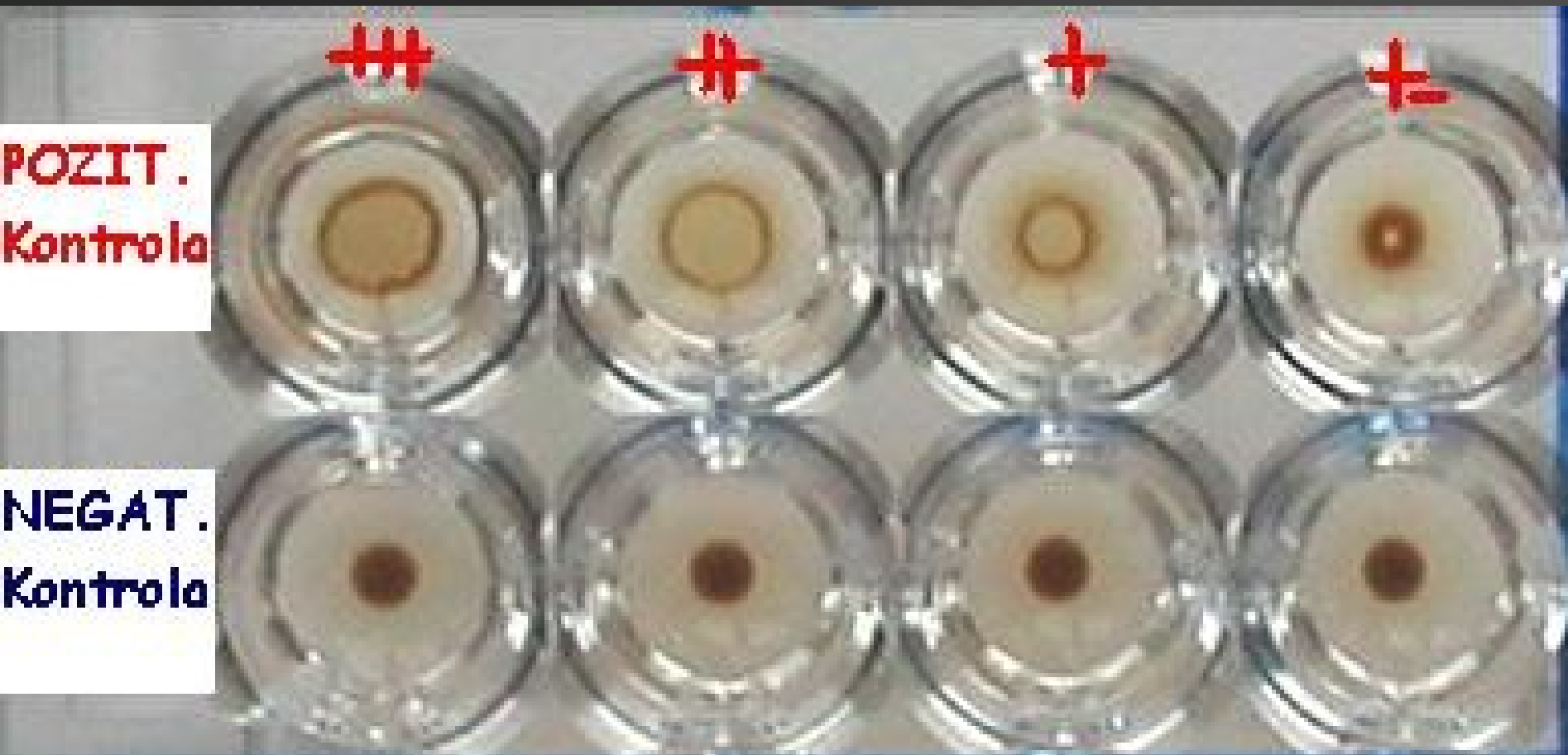


Všimněte si, že máme 1) pozitivní kontroly, 2) negativní kontroly 3) negativní kontroly k jednotlivým důlkům

RRR – hodnocení: zákal =  
pozitivní, není zákal = negativní

TPHA – hodnocení:

[www.medmicro.info](http://www.medmicro.info)





# Indikace ke konfirmaci

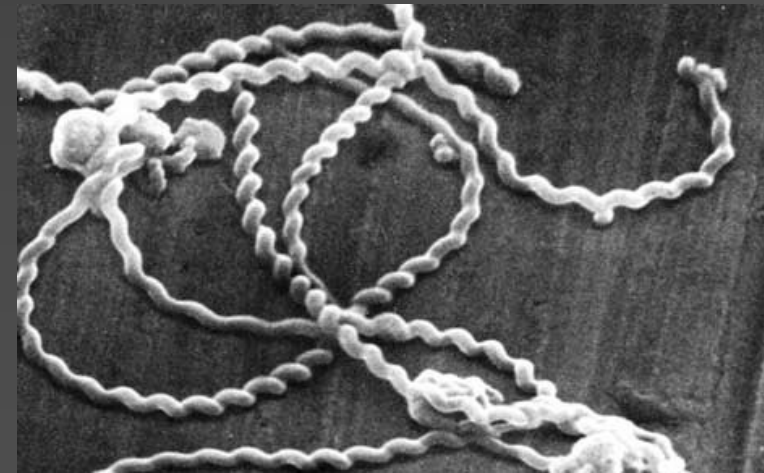
- Screeningové reakce se dělají při každém testování na syfilis (včetně např. těhotných, u kterých vůbec nikdo nepředpokládá, že by měly být pozitivní). Screeningové reakce se provádějí jen kvalitativně či semikvantitativně
- Indikací ke konfirmaci je:
  - jakýkoli pozitivní či alespoň hraniční výsledek reakce RRR a/nebo TPHA, NEBO
  - přítomnost suspektních lézí na těle, nebo anamnéza rizikového sexuálního styku – zde i v případě negativity obou reakcí

# ELISA, Western blot a PCR v diagnostice spirochet

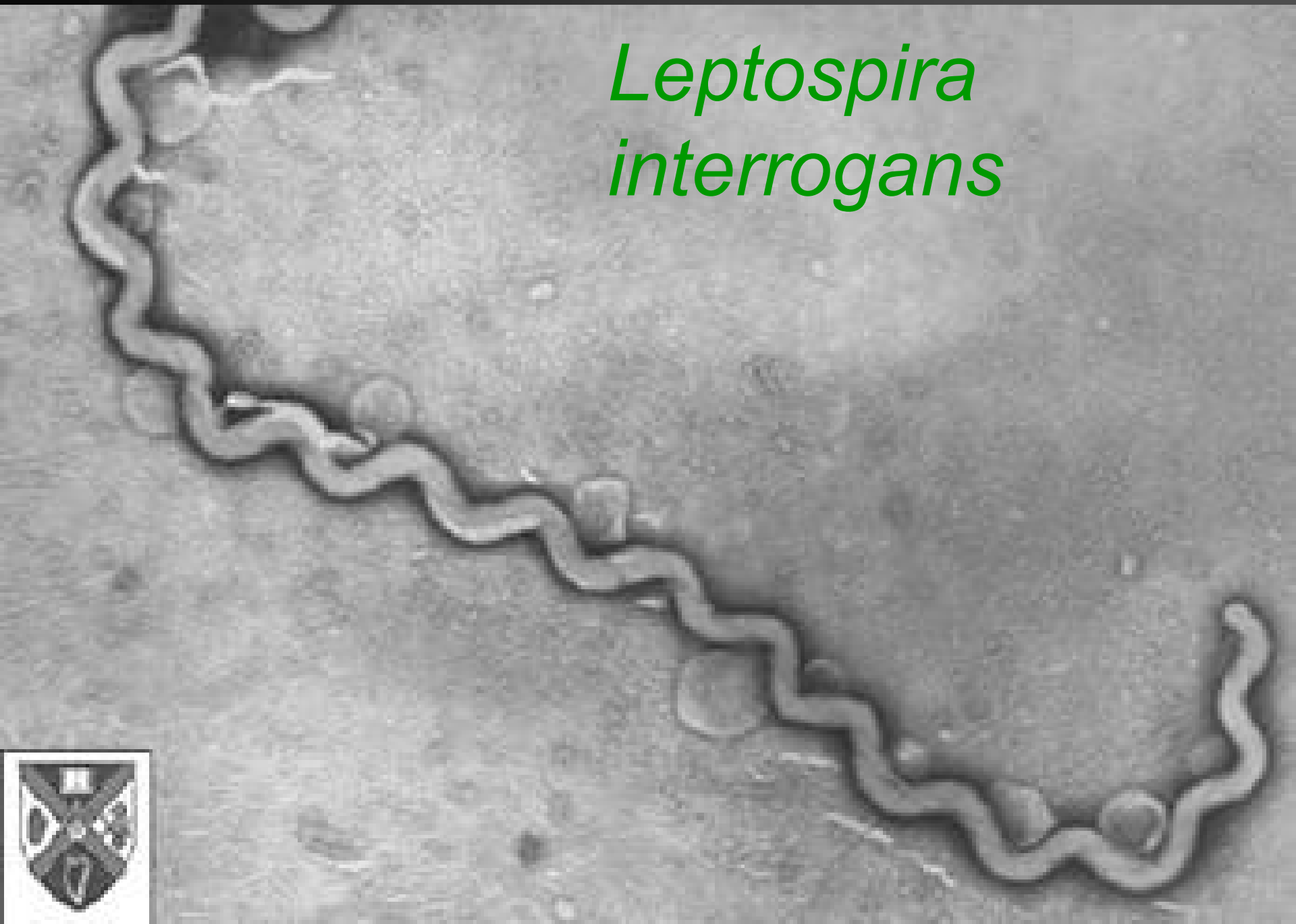
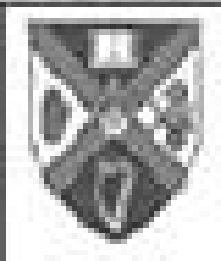
- Jak ELISA, tak i Western blotting a PCR jsou u spirochet používány podobně jako u jiných mikrobů – viz témata J09 a J10 v jarním semestru.
- Pozitivní jsou **pacienti s hodnotami absorbance vyššími než daná hodnota (CAL – kalibrační důlek, cut off a podobně)**
- **Průkaz IgG a IgM** je zásadní, pouhá pozitivita IgG znamená jen důkaz prodělané infekce.
- **PCR se používá v diagnostice syfilis i Lymeské pomoci.** Obvykle je pozitivní dříve, než průkazy protilátek

# Borrelie a leptospiry – průběh pátrání

- **Borrelie:** Především sérologie, popř. PCR. Sérologií se stanovují IgM (svědčí pro časnou infekci) a IgG protilátky metodou ELISA, pozitivní nález se ověřuje Western blotem. Western blot je specifitější metodou.
- **Leptospiry:** Používá se zástinová mikroskopie (viz jarní semestr) a kultivace ve speciálním médiu.



*Leptospira  
interrogans*

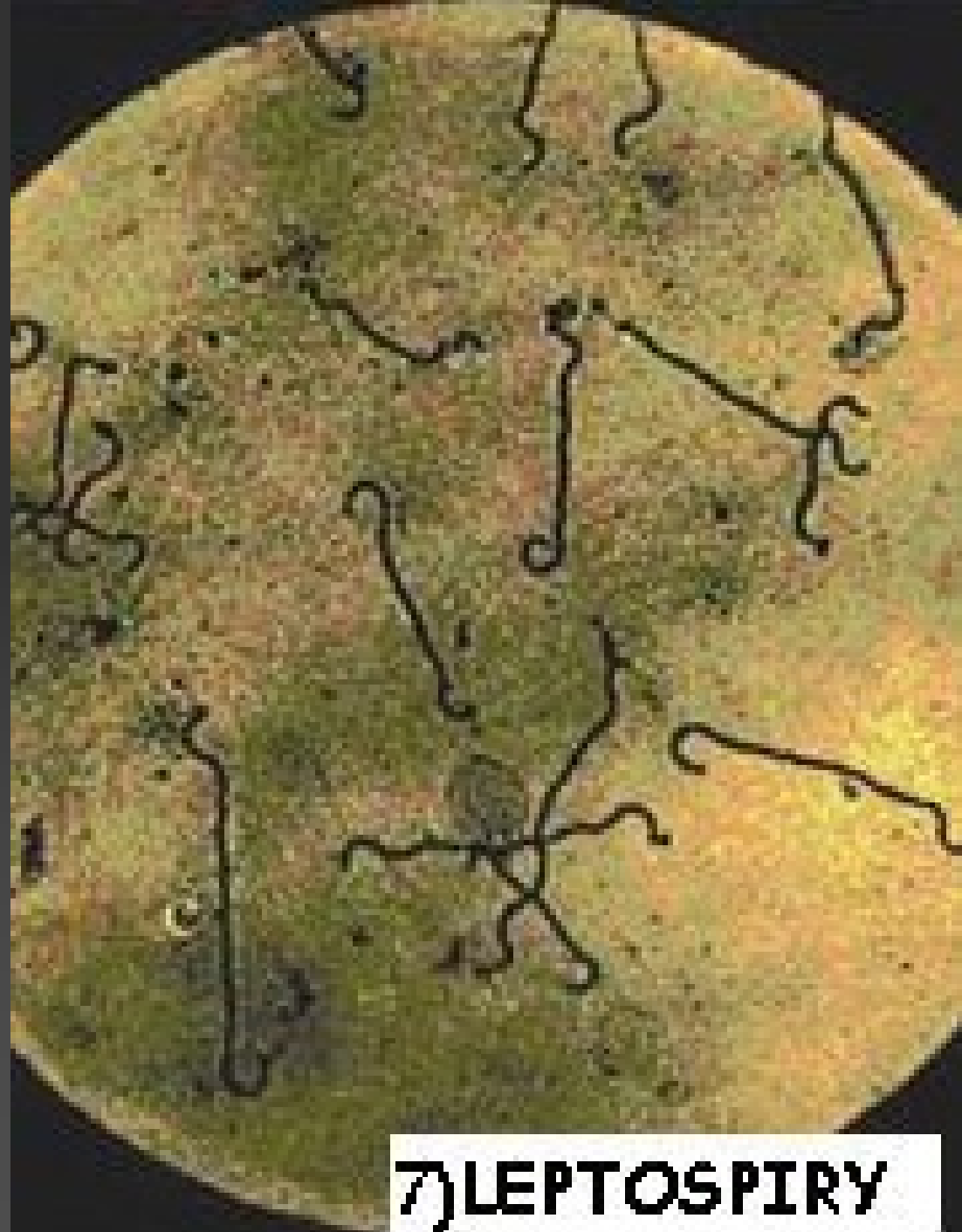


# Leptospira v elektronovém mikroskopu



# Diagnostika leptospir

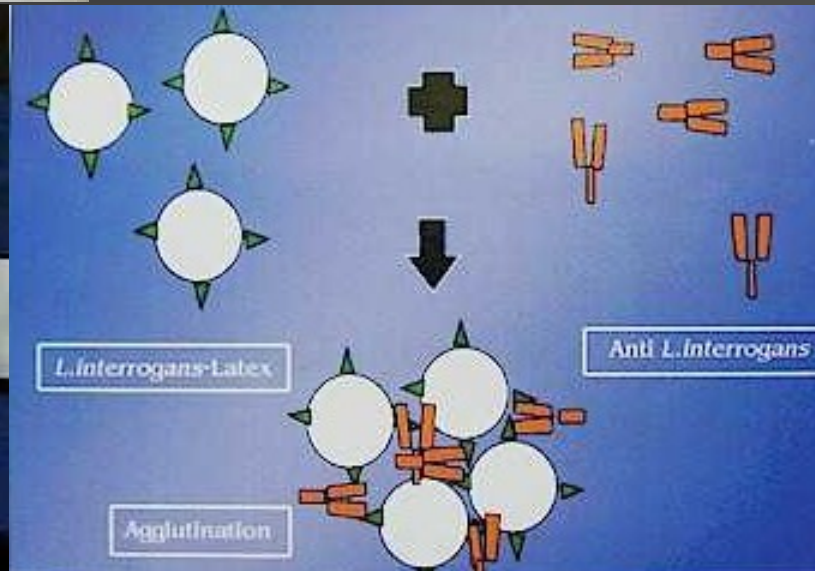
- Mikroskopický průkaz leptospir



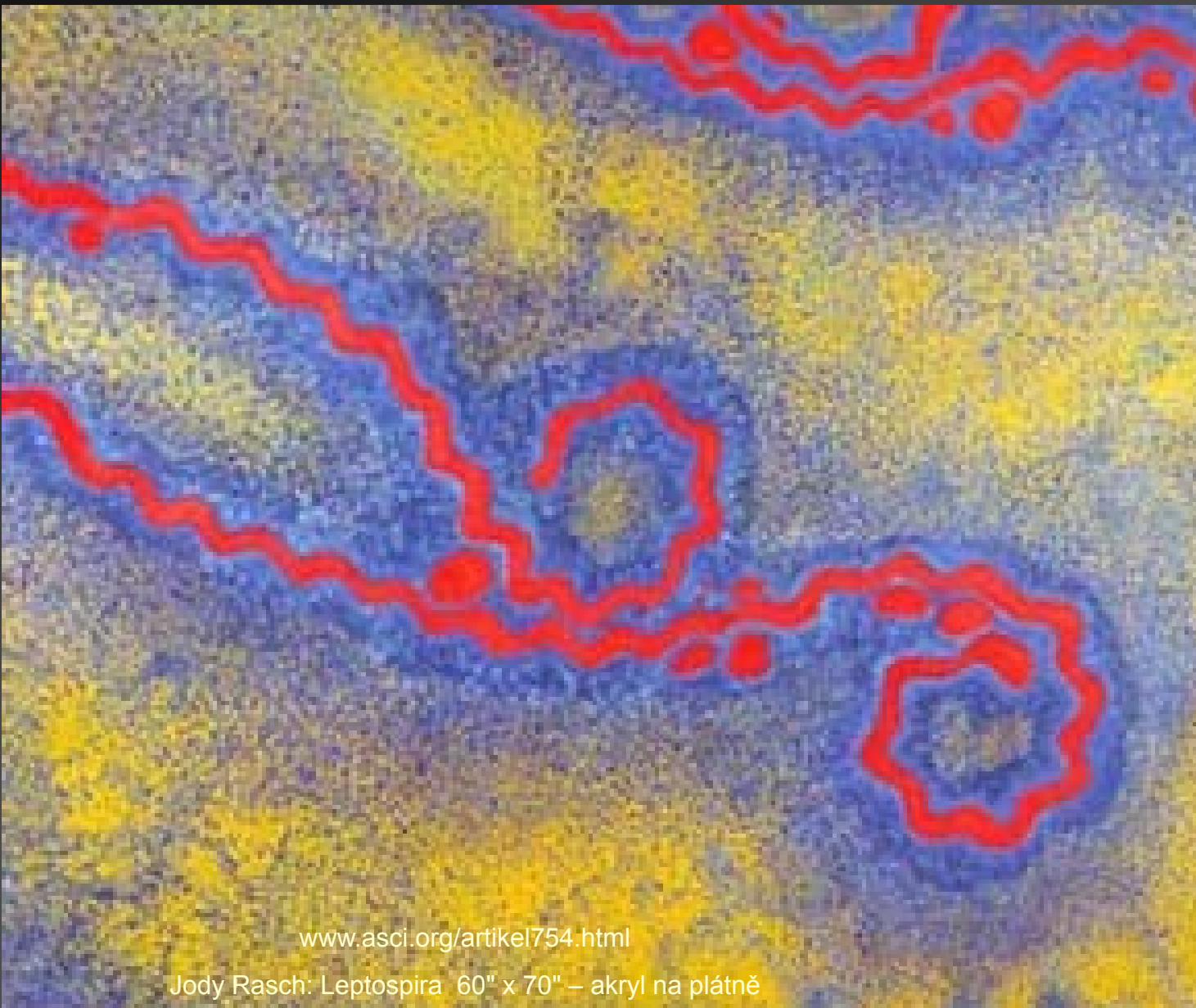
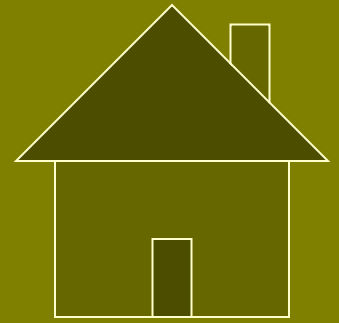
LEPTOSPIRY

# Další diagnostické možnosti u leptospir (latexová aglutinace)

4× www.thailabonline.com



# Konec



[www.asci.org/artikel754.html](http://www.asci.org/artikel754.html)

Jody Rasch: Leptospira 60" x 70" – akryl na plátně



# BONUS: Rozšířené povídání o mikroskopii bakterií

- Bakterie jsou **dobře viditelné v elektronovém mikroskopu**, v praxi se nevyužívá
- **V optickém mikroskopu jsou viditelné mizerně.** Lépe je vidíme, pokud se pohybují
- Nemůžeme však spoléhat na pohyblivost bakterií. Zviditelníme je proto jinak: **fixujeme je a obarvíme některou z barvicích metod**
- **Světlolomné bakterie**, zejména spirochety, s výhodou pozorujeme pomocí **zástinové mikroskopie**

# Příprava preparátu

- Pro zdárné mikroskopování je nutno připravit **kvalitní preparát**.
- Preparát je nutno připravit tak, aby byly bakterie i ostatní objekty **dobře viditelné**. Nátěr nesmí být příliš řídký, příliš hustý, při fixaci se nesmí spálit (ale ani nedostatečně fixovat) aj. U **nativního preparátu** včetně zástinové mikroskopie je třeba zachovat mikroorganismy **životaschopné**.
- Špatně připravený nátěr obsahuje různé artefakty (krystaly barviva, nečistoty...) – ty se mohou vyskytnout ovšem i v nátěru připraveném správně

# Části mikroskopu – dopadající světlo

- **Světlo** prochází ze zdroje světla přes kolektor a kondenzor. Kvalitu a množství paprsků ovlivňuje
  - intenzita napětí zdroje světla
  - irisová clona kolektoru (v dolní části mikroskopu)
  - nastavení výšky kondenzoru
  - nastavení clony kondenzoru (apertura)
- **Výška kondenzoru** se obvykle nastaví při zaclonění. V jednom okamžiku okraj clony přestane být modrý a začne být červený – to je ten správný moment. Pak se clona zase rozevře.
- Je také třeba dbát na správné **centrování obrazu**. Při centrování se používají dva drobné šroubky, které jsou z boku na kondenzoru ve vzájemném úhlu  $90^\circ$

# Kondenzor u normální a zástinové mikroskopie

- U **normálního mikroskopu** je cílem kondenzoru pouze soustředit paprsky tak, aby ideálním způsobem a v ideálním množství dopadaly na preparát
- U **zástinové mikroskopie** je kondenzor uzpůsoben speciálně tak, aby **paprsky dopadaly zešikma**. Paprsky, které by byly rovnoběžné s optickou osou, jsou přitom **zastlony clonou**.

# Zvětšovací optika

- V mikrobiologii používáme zpravidla binokulární mikroskop s vyjímatelnými **okuláry** zvětšujícími 10×
- **Objektivy** se používají 4×, 10×, 20×, 40×, 60× a imerzní objektiv zvětšující 100×. „Imerzní“ znamená, že mezi preparát a objektiv se kápne imerzní olej, jehož index lomu je bližší indexu lomu skla, než v případě vzduchu
- Každý objektiv je u novějších mikroskopů opatřen nejen číslem zvětšení, ale také číslem, které informuje, na jakou hodnotu má být při jeho použití upravena **clona kondenzoru**

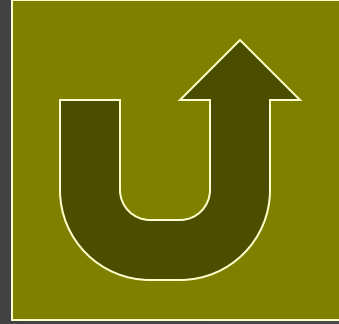
# Zaostřování a vlastní mikroskopie

- Aniž bychom se dívali do okuláru, **přiblížíme** makrošroubem preparát k objektivu na co nejtěsnější vzdálenost
- Nyní, již pod kontrolou zraku preparát **opatrně oddalujeme**, nejdříve makrošroubem, pak i mikrošroubem, až se dostaneme na příslušnou hladinu ostrosti
- V některých případech (hlavně u nativních preparátů) není jedna hladina ostrosti, ale je nutno stále **přeostřovat** na „dno“ a „hladinu“ prostoru vyplněného tekutinou. To je obtížnější, než mikroskopovat jednu rovinu (u fixovaných a barvených preparátů)

# Speciální mikroskopické techniky

- **Mikroskopie v zástinu** – používá se u světlolomných objektů (např. spirochet). Na objekt dopadají paprsky zešikma a do oka dopadnou POUZE ty, které se na něm zlomí
  - Anglicky se jí říká „darkfield microscopy“ – mikroskopie v temném poli. Pozadí je tmavé, bakterie světlá
- **Mikroskopie ve fázovém kontrastu** využívá fázový posun paprsku
- **Fluorescenční mikroskopie** jako taková by se neměla zaměřovat s imunofluorescencí (u klasické fluorescenční mikroskopie nejde vůbec o reakci antigenu s protilátkou)

# Čištění mikroskopu



- Po každém použití imerzního oleje je nutno očistit **objektiv gázou s alkoholéterem** (méně vhodný, leč použitelný, je benzín)
- Občas je nutno očistit **i neimerzní objektivy**, zejména pokud jsou potřísněny např. olejem
- Při potřísnění je také nutno otřít **mikroskopický stolek**, zde stačí čtvereček buničité vaty s benzínem. Nečistota často ulpívá pod zařízením pro uchycení sklíčka, proto je někdy nutno tuto část odmontovat a vyčistit.