



Spirochety praktikum č. 9

Lékařská mikrobiologie – cvičení
Mikrobiologický ústav LF MU

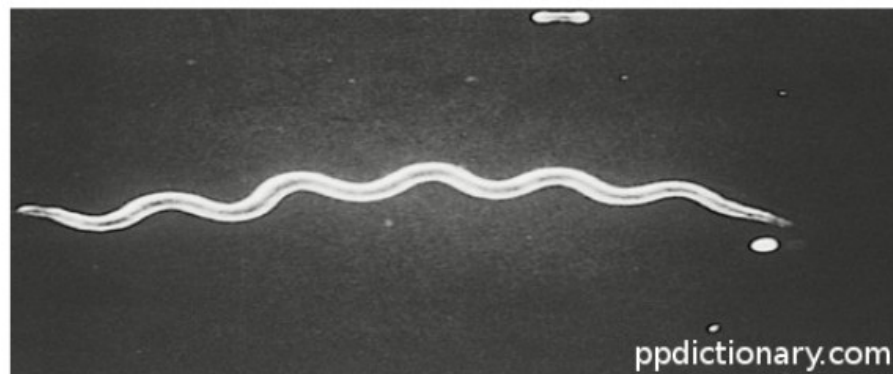
Obsah cvičení

- ▶ Spirochety
- ▶ Rod *Borrelia*
- ▶ Rod *Treponema*
- ▶ Rod *Leptospira*



Spirochety

- ▶ Bakterie tvaru spirály, pohyblivé pomocí axiálních bičků v periplazmatickém prostoru.
- ▶ Jejich buněčná stěna je podobná G- bakteriím, ale Gramovým barvením se nebarví.
- ▶ Velice obtížná kultivace.
- ▶ **Mikroskopie:** v zástinu, fluorescenční.
- ▶ **Rody:** *Borrelia*, *Treponema*, *Leptospira*



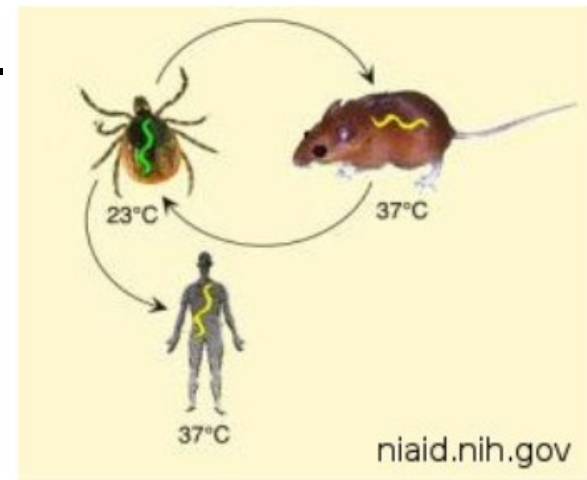
Rod *Borrelia*

- ▶ **Klinický význam:**
- ▶ **Lymfská borelióza – *B. burgdorferi* sensu lato:**
 - *B. burgdorferi* sensu stricto (USA + Evropa; postižení kloubů a myokardu)
 - *B. afzelii* (Evropa + Asie; kožní příznaky)
 - *B. garinii* (Evropa + Asie; neurologické projevy)
- ▶ **Návratné horečky:**
 - *B. recurrentis*
 - *B. duttoni*
 - *B. hermsii*



Lymeská borelióza

- ▶ Typická zoonóza přenášená klíšťaty (v České republice *Ixodes ricinus*).
- ▶ **Rezervoár:** hlodavci, ptáci.
- ▶ **Incidence v ČR:** 40 / 100 000 obyvatel, u přibližně 10 % zdravých osob se nachází protilátky.
- ▶ Často dojde ke spontánnímu uzdravení.
- ▶ **Léčba ATB:** β -laktamy, tetracykliny.



Lymeská borelióza – průběh

▶ **Časné lokalizované:**

- erythema migrans (3–30 dní)
- nespecifické příznaky

▶ **Časné diseminované:**

- borreliový lymfocytom (uši)
- neurologické, kardiální, revmatologické projevy

▶ **Pozdní diseminované:**

- chronická encelafomyelitida, artritida
- acrodermatitis chronica atrophicans (degenerace podkoží, ztenčená kůže)



Lymeská borelióza – erythema migrans



Rod *Treponema*

▶ *Treponema pallidum*

- *ssp. pallidum* – **syfilis** (sexuálně přenosná pohlavní nemoc)
- *ssp. endemicum* – **endemická syfilis (bejel)** – léze na ústní sliznici
- *ssp. carateum* – **pinta** – **kožní léze** (výskyt v Latinské Americe)
- *ssp. pertenue* – **framboesie** – **kožní léze** (výskyt v Africe, JV Asii, Jižní Americe)

▶ *Treponema denticola* – většinou nepatogenní, případně orální infekce – periodontitida



Syfilis (1)

- ▶ = lues, klasický zástupce pohlavně přenosných chorob
 - ▶ **Původce:** *T. pallidum ssp. pallidum*

 - ▶ **Časná syfilis:**
 - **primární** – vznik ulcerací v místě vstupu infekce – na genitálu vzniká tvrdý vřed (ulcum durum)
 - **sekundární** – diseminace, bolesti hlavy, svalů, horečka, anorexie, generalizovaná vyrážka, kožní a slizniční léze (=kondylomata)
 - **časná latentní** – během 1. roku po překonání sekundárního stadia, asymptomatické období, možné relapsy sekundárního stadia
-



Syfilis (2)

▶ Pozdní:

- **pozdní latentní** (není epidemiologické riziko, možné pozdní příznaky)
- **terciální – gummata** – měkké záněty (nejčastěji játra, kosti, kůže); **neurosyfilis** – meningitida, progresivní

paralýzy, demence, tabes dorsalis (poruchy pohyblivosti, chůze, řití, ...); **kardiovaskulární záněty**, aneurysma (



- ▶ **Vrozená syfilis** (potrat nebo sekundární stadium)
-



Diagnostika syfilis (1)

- ▶ **Přímý průkaz (provádí se zřídka):**
 - **Mikroskopie:** nativní preparát, mikroskopie v zástinu, fluorescenční mikroskopie.
 - Kultivace a biochemie: nepoužívá se
 - **Průkaz antigenu imunofluorescenčně**
 - Pokus na zvířeti: rabbit infectivity test (RIT), očkování do varlat novozélandského bílého králíka (orchitida za 10 dní) – dnes raritní
 - **PCR diagnostika**



Diagnostika syfilis (2)

- ▶ **Nepřímý průkaz:**
- ▶ **Netreponemové testy:**
 - **RRR** (rychlá reaginová reakce), **RPR** (rabbit-plasma reagin test), **VDRL** (venereal disease research laboratory)
 - zjišťuje se přítomnost nespecifických protilátek proti kardiolipinu
 - detekovatelné cca 4 týdny po infekci
- ▶ **Treponemové testy:**
 - antigen je z *T. pallidum*
 - TPHA – *T. pallidum* pasivní hemaglutinační test (TPPA – *T. p.* particle agglutination), anti-TP
 - ELISA, FTA-ABS, western blotting



Rod *Leptospira*

- ▶ ***Leptospira interrogans***
- ▶ Spirální bakterie s jemnými závity, ohnuté na koncích.
- ▶ **Způsob nákazy:** kontakt s močí infikovaného zvířete (hlodavci, skot, prase...) → koupání v přírodních vodních zdrojích, konzumace kontaminované vody.
- ▶ **Vstup:** kůží (jako jediné bakterie mohou pronikat nejspíše i neporušenou kůží), sliznicemi (nejběžněji spojivkou)
- ▶ **Serovar Grippotryphosa – polní/žňová/blatácká horečka** – chřipkovité příznaky, anikterická forma
- ▶ **Serovar Icterohemorrhagiae – Weilova nemoc** – nejdříve podobné blatácké horečce, poté ikterus, krvácivé projevy na kůži a sliznicích, renální selhání

Úkol č. 1 – Průkaz protilátek proti *B. Garinii* metodou ELISA (1)

- ▶ **Pacient J:** klinicky definované erythema migrans (jasný obraz, ne jen podezření)
 - ▶ **Pacient K:** cítí se ospalý, v létě měl klíště; jiné potíže nejsou přítomny
 - ▶ **Pacient L:** neurologové našli typické klinické příznaky neuroboreliózy
 - ▶ **Pacient M:** zdravá osoba, ale v létě měl klíště, a cítí se ohrožen rizikem borreliózy, protože si přečetl o tomto riziku
 - ▶ **Pacient N:** je u něj podezření na neuroboreliózu, avšak není jasné
-



Úkol č. 1 – Průkaz protilátek proti *B. Garinii* metodou ELISA (2)

- ▶ Průkaz protilátek ve třídách IgM a IgG.
- ▶ Výsledky reakce ve formě absorbance.
- ▶ Pozitivní hodnoty jsou vyšší než hodnota kalibrace: (CAL) (K+ a K- jsou kontroly, důlky B1 a C1)

IgM

CAL	6	J	22	30
K+	7	K	23	31
K-	8	L	24	32
1	9	17	25	N
2	10	18	26	34
3	11	19	27	35
4	12	20	28	36
5	13	M	29	37

IgG

CAL	6	J	22	30
K+	7	K	23	31
K-	8	L	24	32
1	9	17	25	N
2	10	18	26	34
3	11	19	27	35
4	12	20	28	36
5	13	M	29	37

Úkol č. 2 – Průkaz protilátek proti *B. Garinii* pomocí Western Blotu

- ▶ Konfirmace pokud je pozitivní reakce ELISA nebo klinické důvody (J – klinické důvody)
- ▶ **Pozitivní WB:**
 - IgM: pozitivita v pruhu p25 a OspC
 - IgG: pozitivita v pruhu VlsE



Úkol č. 3 – Diagnostika borreliózy pomocí PCR

- ▶ PCR = přímý průkaz, důležité především u čerstvé infekce, když ještě nejsou vytvořeny protilátky.
- ▶ **Indikace k PCR: pacientu L a N.**
- ▶ **Pozitivita: svítící band**
- ▶ IC nebyla použita



Souhrnné výsledky úkolů 1-3

	ELISA		WB		PCR
	IgM	IgG	IgM	IgG	
J (erythema migrans)	-	-	-	-	
K (klíště v létě)	-	+	-	+	
L (příznaky neurobor.)	+	+	+	+	+
M (zdravý)	-	+	-	+	
N (podezření neurobor.)	+	-	-	-	-



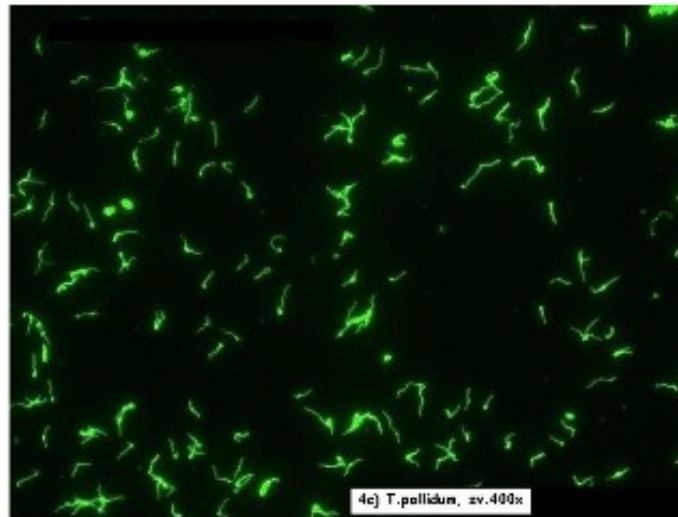
Závěry k úkolům 1-3

- ▶ **J:** Nutno léčit doxycyklinem (i přesto, že je seronegativní, klinické příznaky jsou dostatečně pádným důvodem k léčbě)
- ▶ **K:** Zřejmě jen paměťové protilátky, nutná další diferenciální diagnostika
- ▶ **L:** Skutečně jde o neuroboreliózu, léčba ceftriaxonem
- ▶ **M:** Pacient je v pořádku (kdysi možná prodělal bezpříznakovou borreliózu, 10 % populace má pozitivní IgG)
- ▶ **N:** Pozitivní IgM v ELISA nepotvrdil WB ani PCR, zřejmě zkřížená reakce, nutno pátrat po jiných neuroinfekcích



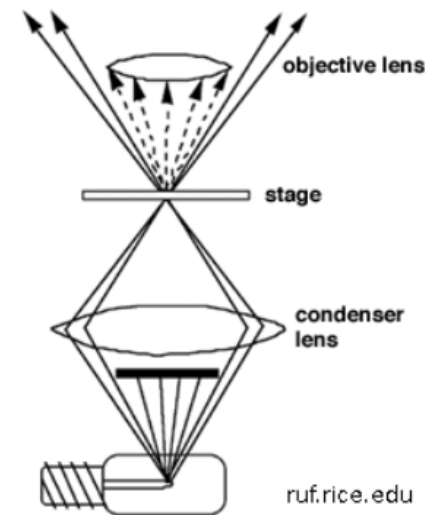
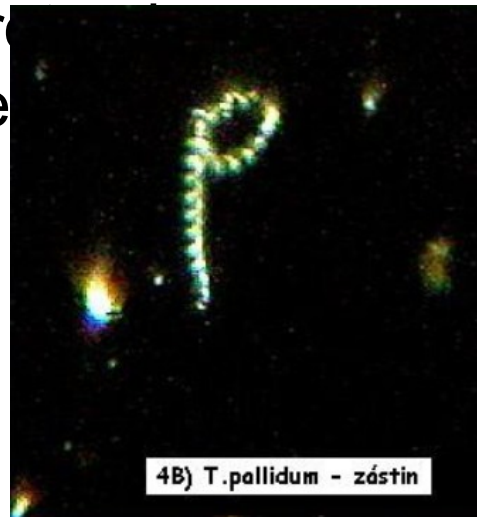
Úkol č. 4 – Přímý průkaz syfilis

- ▶ **Rabbit infectivity test (RIT)**, očkování do varlat novozélandského bílého králíka (New Zealand Rabbit): orchitida za 10 dní.
- ▶ **Zástinová mikroskopie** (pozorujeme světlo které se ohnulo či odrazilo na preparátu).
- ▶ **Přímá imunofluorescence** (detekce antigenů pomocí značených protilátek)



Zástinová mikroskopie

- ▶ Nativní preparát.
- ▶ U zástinové mikroskopie je kondenzor uzpůsoben speciálně tak, aby paprsky dopadaly zešikma. Paprsky, které by byly rovnoběžné s optickou osou, jsou přitom zacloněny clonou.
- ▶ Pouze paprsky lomící se na preparátu dopadají do oka pozorovatele. A protože se zářícím objektem



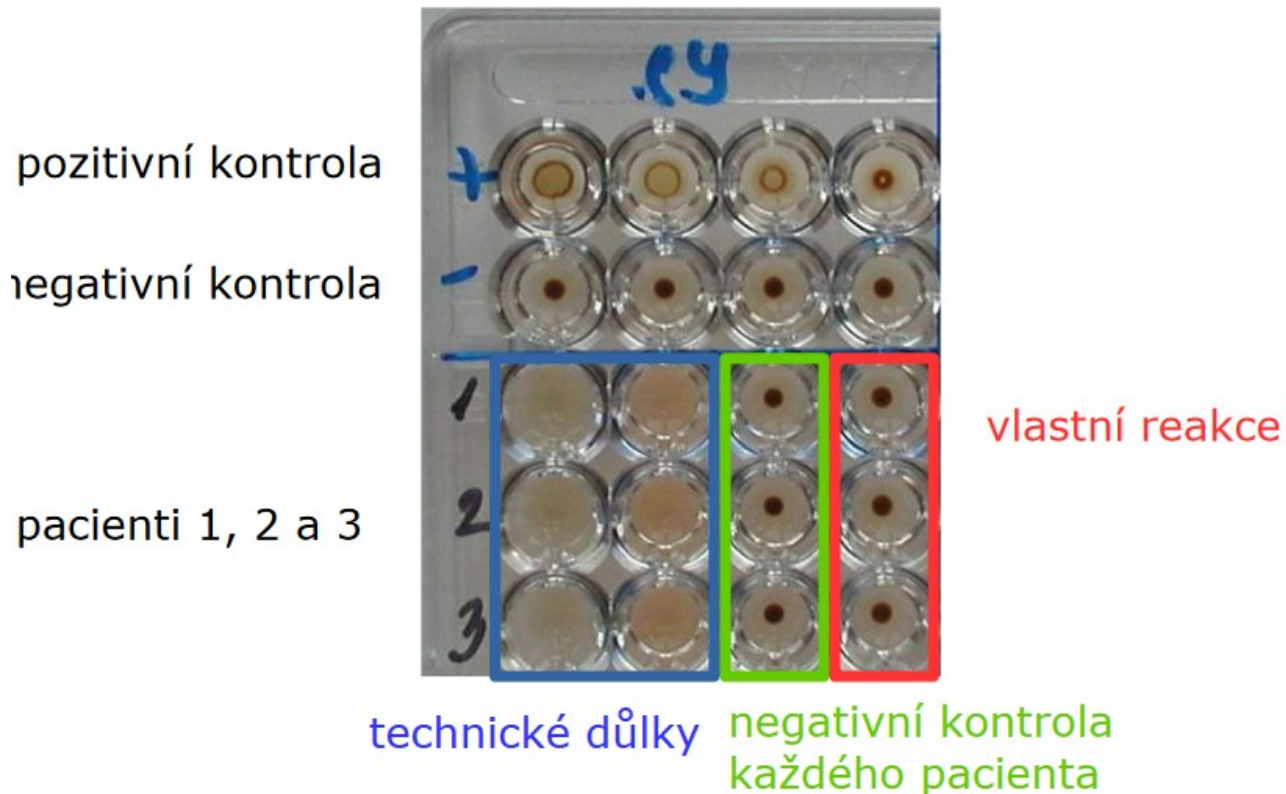
Úkoly č. 5+6 – Nepřímý průkaz syfilis

- ▶ **Úkol 5:** screening pacientů: vybereme ty, které je třeba konfirmovat
- ▶ **Úkol 6:** potvrzení dg., konečný závěr
- ▶ **Vyšetřované osoby:**
 - A = těhotná žena (běžný screening, není zvýšené riziko syfilis)
 - B = pacient s dva dny trvající lézí, která vypadá jako ulcus durum
 - C = pacient se suspektní lues latens
 - D = dárce krve (pouhý screening)
 - E = dítě s pravděpodobnou vrozenou syfilis



Úkol č. 5 – RRR a TPHA (1)

- ▶ RRR: pozitivní je důlek se zákalem
- ▶ TPHA: negativní je tečka, „sražený útvar“ pozitivní



Úkol č. 5 – RRR a TPHA (2)

- ▶ Screeningové reakce se dělají při každém testování na syfilis (vč. těhotných).
- ▶ Screeningové reakce se zpravidla provádějí jen kvalitativně či semikvantitativně.
- ▶ **Indikace ke confirmaci:**
 - jakýkoli pozitivní či alespoň hraniční výsledek reakce RRR a/nebo TPHA
 - přítomnost suspektních lézí na těle, nebo anamnéza rizikového sexuálního styku (zde i v případě negativity obou reakcí)



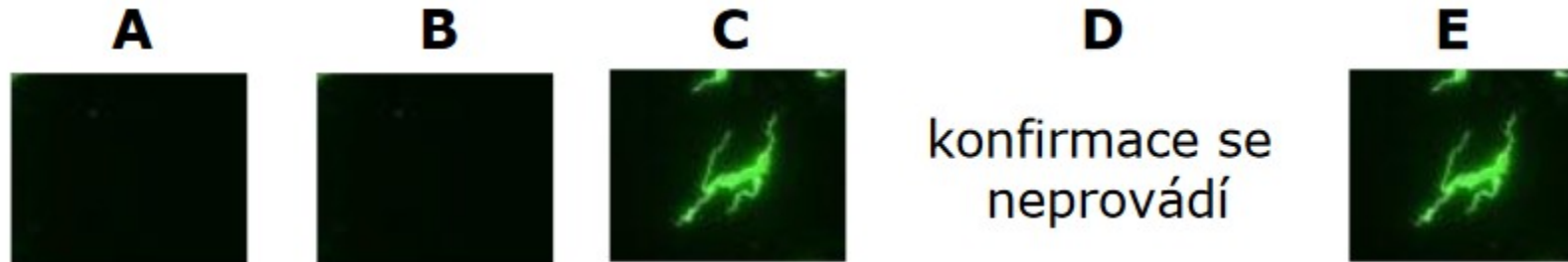
Úkol č. 5 – RRR a TPHA: výsledky

	RRR	TPHA	závěr
A (těhotná)	+	-	konfirmace
B (léze)	-	-	konfirmace
C (susp. lues)	-	+++	konfirmace
D (dárce krve)	-	-	bez konfirmace
E (dítě, vroz. lues)	+	+++	konfirmace



Úkol č. 6 – Konfirmace syfilis

- ▶ Výsledky reakce FTA-ABS:



- ▶ **Hodnocení reakce ELISA:**
 - cut off hodnota: $(C1 + D1)/2$
 - IgM: hodnoty vyšší než 0,494 jsou pozitivní
 - IgG: hodnoty vyšší než 0,366 jsou pozitivní
 - ▶ **Hodnocení Western blottu:** za pozitivní v IgG i v IgM považujte všechny pásy, na kterých umístění a uspořádání proužků zhruba odpovídá pozitivní kontrole
-

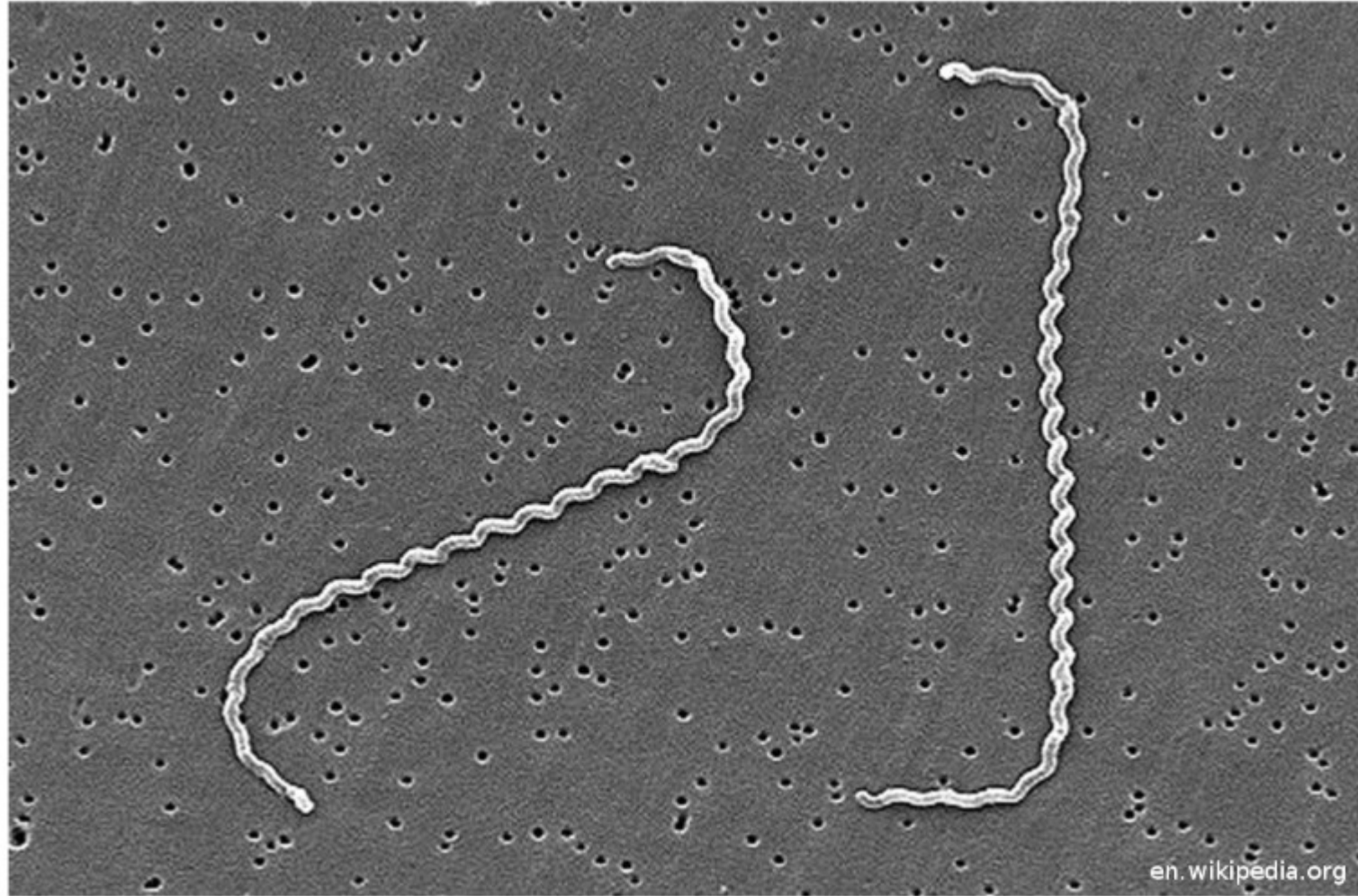


Úkoly č. 5+6 – Nepřímý průkaz syfilis: výsledky

	FTA	ELISA		WB		závěr
	ABS	IgM	IgG	IgM	IgG	
A (těhotná)	-	-	-	-	-	nejde o lues (falešně poz., možná po očkování)
B (léze)	-	-	-	-	-	PCR nutné, u čerstvé infekce možná seronegativita
C (susp. lues)	+	-	+	-	+	lues latens
D (dárce)						dárce je v pořádku
E (dítě, vroz. lues)	+	+	+	+	+	kongenitální syfilis, vyšetřit krev matky



Úkol č. 7 – Přímý průkaz *Leptospira* spp.



Po tomto cvičení byste měli znát:

- ▶ Popsat specifické vlastnosti spirochet.
- ▶ Znat zástupce rodů patřících mezi spirochety: klinický význam, léčba, diagnostika.
- ▶ Vyhodnotit použití přímých a nepřímých metod při diagnostice spirochet.

