

P09

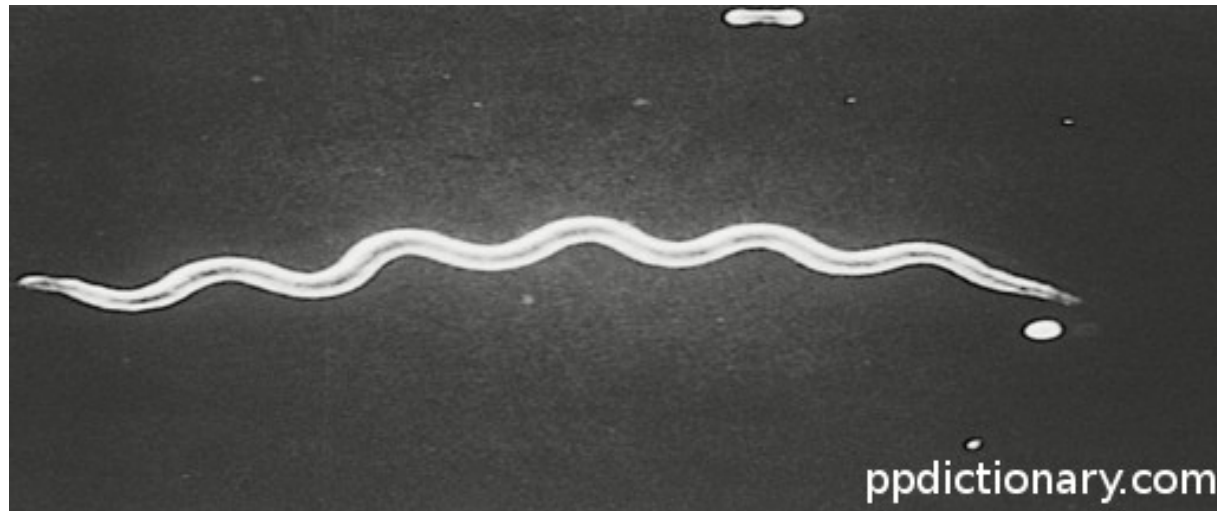
Spirochety

Osnova

- spirochety
- rod *Borrelia*
- rod *Treponema*
- *Leptospira interrogans*
- úkoly

Spirochety

- rody *Borrelia*, *Treponema*, *Leptospira*
- **spirální pohyblivé bakterie** (axiální bičíky v periplazmatickém prostoru)
- buněčná stěna podobná G- bakteriím, ale nebarví se podle Grama, velice **obtížná kultivace**
- **mikroskopie v zástinu, fluorescenční mikroskopie**

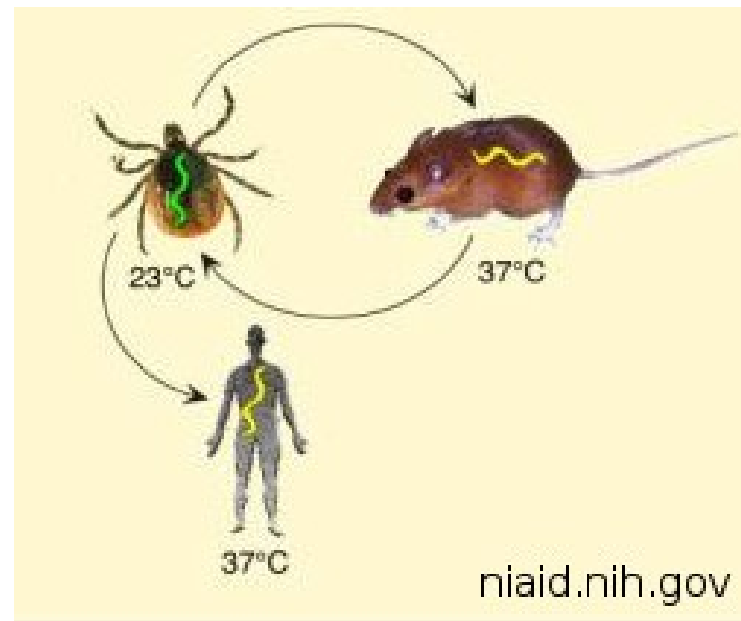


Rod *Borrelia*

- původci **lymské boreliózy**
 - *B. burgdorferi* sensu lato
 - *B. burgdorferi* sensu stricto (USA + Evr.; postižení kloubů a myokardu)
 - *B. afzelii* (Evr. + Asie; kožní příznaky)
 - *B. garinii* (Evr. + Asie; neurologické projevy)
- původci **návratných horeček**
 - *B. recurrentis*
 - *B. duttoni*
 - *B. hermsii*

Lymeská borelióza

- **zoonóza**, přenos **klíšťaty** (v ČR *Ixodes ricinus*), rezervoár hlodavci, ptáci
- incidence v ČR: 40/100 000 obyvatel
- **často spontánní uzdravení**
- protilátky asi u 10 % zdravých osob
- prodělané onemocnění chrání jen částečně
- ATB: beta-laktamy, tetracykliny



Stádia lymfské boreliózy

- **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)



Rod *Treponema*

- ***Treponema pallidum***
 - *ssp. pallidum* – **syfilis** (pohl. nemoc, přenos sex.)
 - *ssp. endemicum* – endemická syfilis (bejel) – **léze na ústní sliznici**
 - *ssp. carateum* – *pinta* – **kožní léze** (Lat. Am.)
 - *ssp. pertenue* – *framboesie* – **kožní léze** (Afr., JV Asie, J. Am.)
- *Treponema denticola* – **nepatogenní**, popř. periodontitida

Syphilis (lues)

- ***T. pallidum ssp. pallidum***
- klasická pohlavní nemoc (přenos výhradně sexuálně)
- **časná syphilis**
 - **primární** (ulcerace v místě vstupu – na genitálu, ulcus durum, tvrdý vřed)
 - **sekundární** (diseminace, horečka, bolesti hlavy, artralgie, anorexie, generalizovaná vyrážka + kondylomata – kožní a slizniční léze)
 - **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 polohocitu, chůze, čítí, ...)
 - kardiovaskulární záněty, aneurysma (aorta)
- **vrozená syfilis** (potrat nebo sekundární stadium)



Diagnostika syfilis – přímý průkaz

- **přímý průkaz se provádí 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 – 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

Přehled testů na syfilis

Historický	BWR – Bordet Wassermann	Netreponemové
Screening	RRR/RPR/VDRL	
	TPHA/TPPA/anti-TP	Treponemové
Konfirmace	ELISA	
	FTA-ABS	
	Western blotting	
Historický (superkonfirmace)	TPIT (Treponema Pallidum Imobilizační Test) = Nelson	

Leptospira interrogans

- jemné závity, na koncích ohnuté
- nákaza **kontaktem s močí infikovaného zvířete** – hlodavci, prase, skot, ... (koupání v přírodních vodních zdrojích, konzumace kontaminované vody)
- vstup kůží (pravděpodobně i neporušenou) nebo sliznicemi (typicky 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 1: Průkaz protilátek proti *B. garinii* metodou ELISA

- **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 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 2: Průkaz protilátek proti *B. garinii* pomocí WB

- **konfirmasiace 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 3: Dg. borreliózy pomocí PCR

- **PCR je přímý průkaz** (průkaznější než hledání protilátek) zvláště u čerstvé infekce, kdy ještě nejsou vytvořeny protilátky
- k PCR jsou indikováni pacienti L a N
- **pozitivita: svítící proužek**
- IC nebyla použita, vpravo je ladder

Výsledky úkolů 1-3

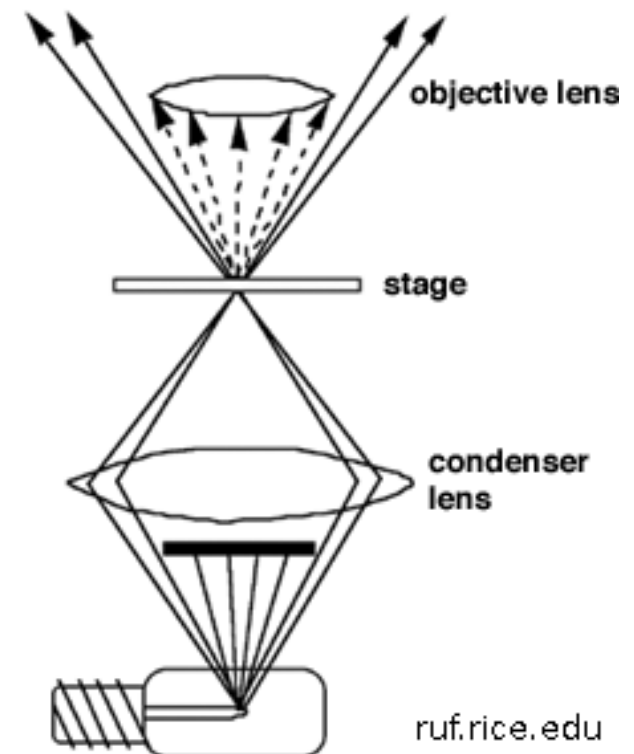
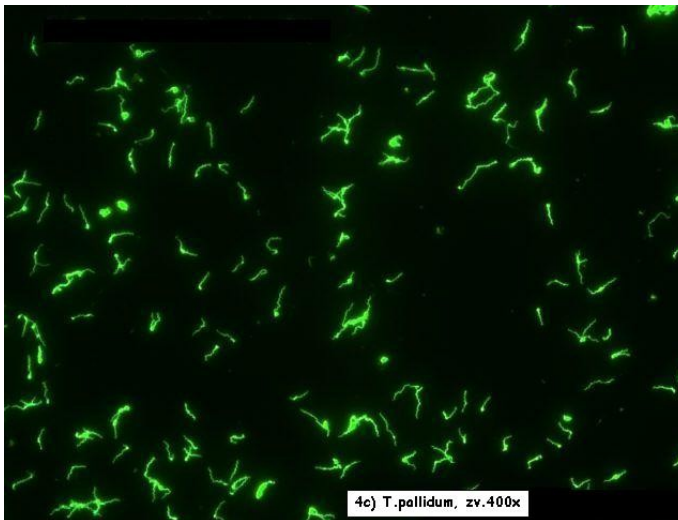
	ELISA		WB		PCR
	IgM	IgG	IgM	IgG	
J (erythema migrans)	-	-	-	-	
K (klíště v létě)	-	+	-	+	
L (příznaky neurobor.)	+	+	+	+	+
M (zdravý)	-	+	-	+	
N (podezření neurobor.)	+	-	-	-	-

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 4: Přímý průkaz syfilis

- **rabbit infectivity test (RIT)**, očkování do varlat **novozélandského bílého** králíka (orchitida za 10 dní)
- **zástinová mikroskopie** (pozorujeme světlo které se ohnulo či odrazilo na preparátu)
- **přímá imunofluorescence** (detekce antigenů pomocí značených protilátek)



Úkol 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 5: RRR a TPHA

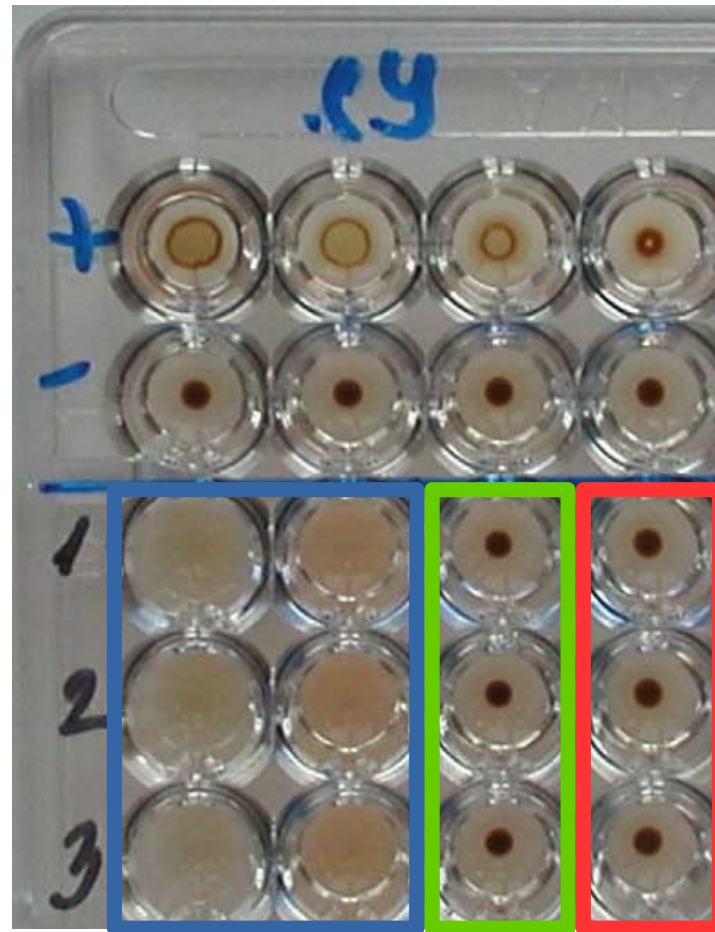
- **RRR**: pozitivní je důlek se **zákalem**

- **TPHA**

pozitivní kontrola

negativní kontrola

pacienti 1, 2 a 3



vlastní reakce

technické důlky

negativní kontrola
každého pacienta

Úkol 5: RRR a TPHA

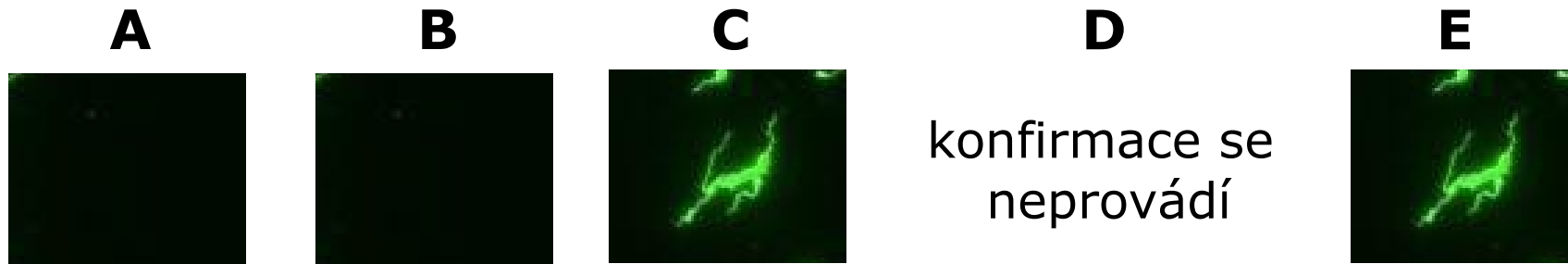
- **screeningové reakce se dělají při každém testování na syfilis** (vč. těhotných)
- screeningové reakce se zpravidla provádějí jen kvalitativně či semikvantitativně
- indikace ke konfirmaci:
 - **jakýkoli pozitivní či alespoň hraniční výsledek** reakce RRR a/nebo TPHA
 - **přítomnost suspektních lézí**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

Úkol 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 6: Konfirmace syfilis

- výsledky reakce **FTA-ABS**:

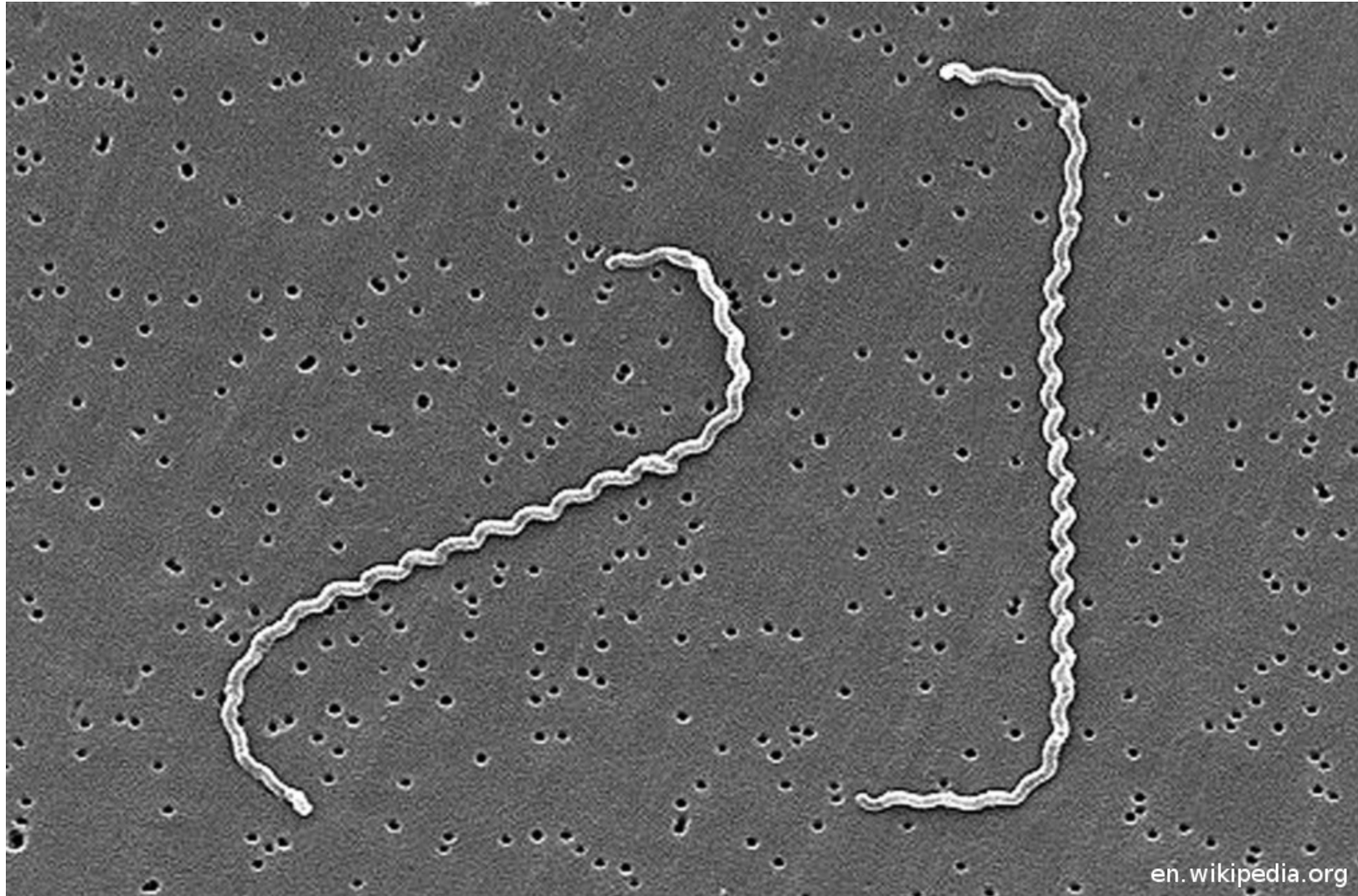


- hodnocení reakce **ELISA**:
 - **cut off hodnota:** $(C1 + D1)/2$
 - **IgM:** hodnoty vyšší než 0,494 jsou pozitivní
 - **IgG:** hodnoty vyšší než 0,366 jsou pozitivní
- hodnocení **Western blottu**: za pozitivní v IgG i v IgM považujte všechny pásy, na kterých umístění a uspořádání proužků zhruba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

Úkol 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 7: Přímý průkaz *Leptospira spp.*



Po tomto cvičení byste měli umět:

- popsat spirochety
- popsat zástupce spirochet, vč. diagnostických postupů, které vedou k úspěšné identifikaci
- zhodnotit význam přímých a nepřímých metod v diagnostice spirochet, vč. vhodnosti jejich použití pro konkrétní případy