

Mikrobiologický ústav uvádí

NA STOPĚ PACHATELE



Díl devátý:

Pachatelé stočení do spirály

Opět začneme testíkem...

- Jaké je složení G+ buněčné stěny?

Peptidoglykan (murein), řetězce kys. teichoové

- Jaké je složení G- buněčné stěny?

Tenká vrstva mureinu, nad ní vnější membrána

- Co obsahuje buněčná stěna mykobakterií?

Mykolové kyseliny, proto je hydrofobní

- Jaké jsou tvarové možnosti bakterií?

Koky, kokotyčinky, tyčinky, vláknité tyčinky až vlákna, spirochety, bez tvarové (mykoplasmata)

Testík pokračuje... a končí

- Jaké znáte způsoby získání anaerobiózy?

Mechanický ve VL bujónech, fyzikální u anaerobních boxů, chemický u anaerostatů

- Na kterých půdách se pěstují mykobakteria?

Šula, Banič, Ogawa, Löwenstein-Jenssen

- Co se musí učinit před kultiací mykobakterií?

Mořit louhem, abys se odstranily jiné mikroby

- Které jsou kroky Ziehl-Neelsenova barvení?

1. Gabbet zahorka, 2. kyselý alkohol, 3. pozadí

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

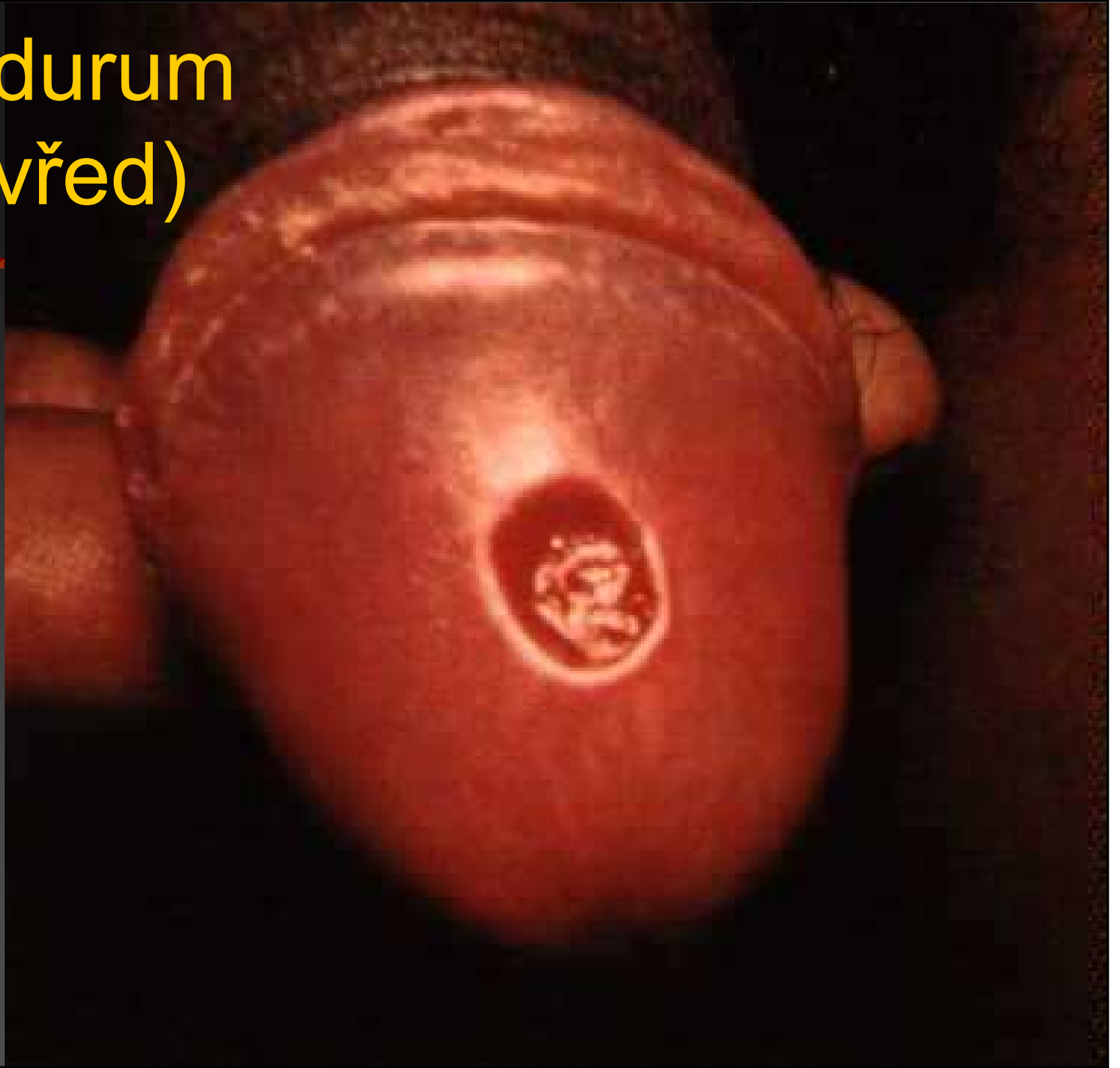
Starý název původce
kapavky (*N. gonorrhoeae*)

Měkký vřed – choroba
způsobovaná *Haemophilus
ducreyi*

Tvrdý vřed – jeden
z typických příznaků syfilis

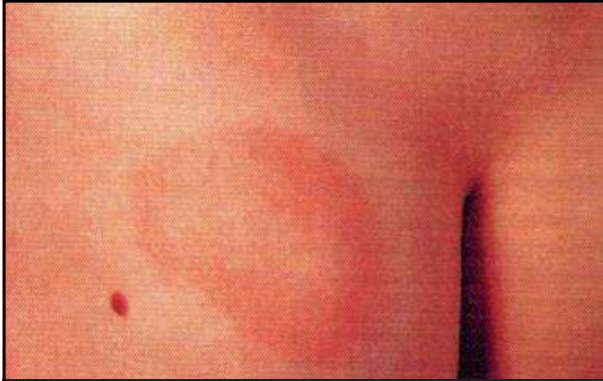
(Zpívá se jako
*Gaudeamus igitur,
iuvenes dum sumus*)

Ulcus durum (tvrdý vřed)



Příběh první

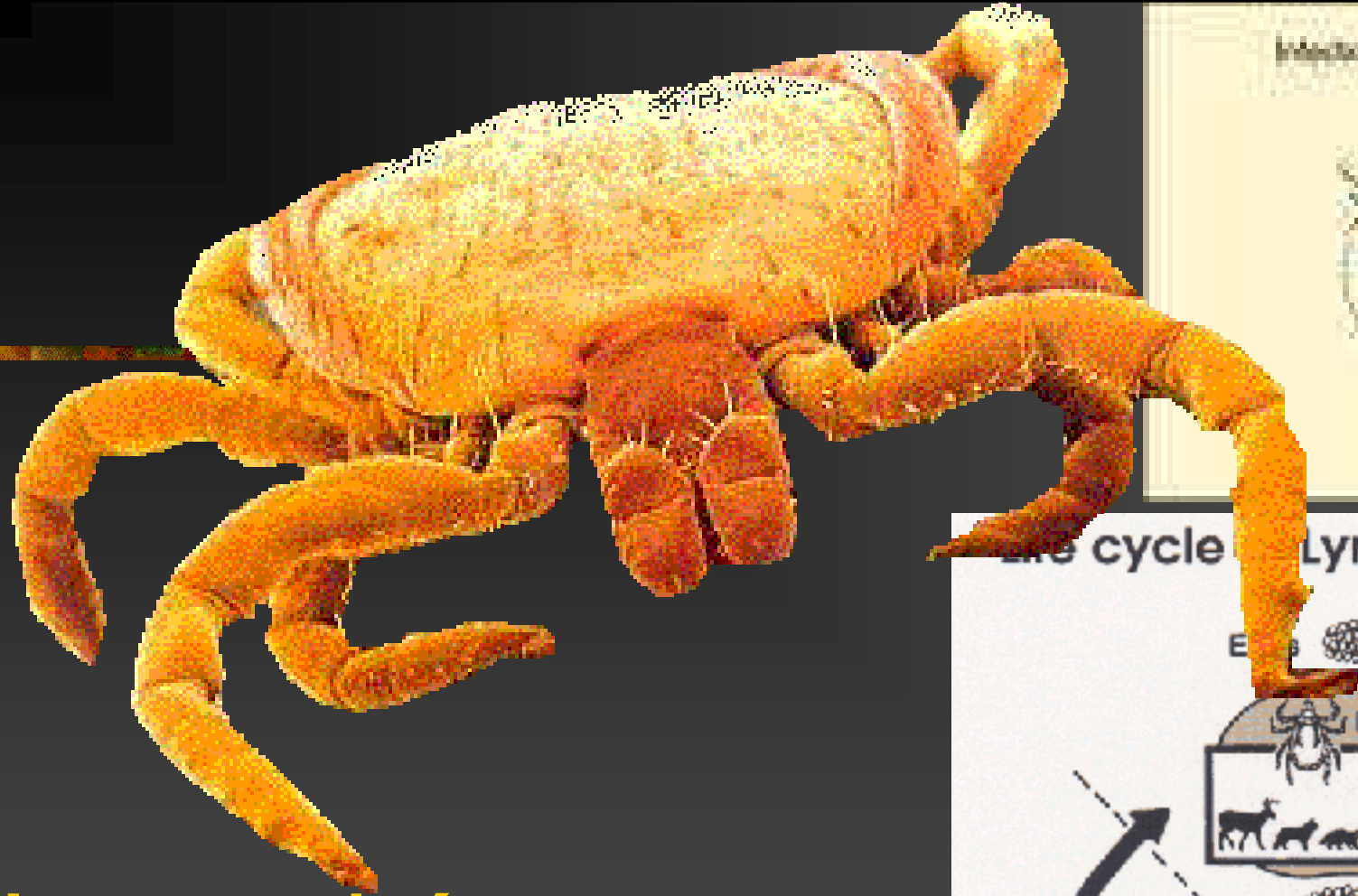
- **Růžence Flekové** naskákaly po těle růžové skvrny. Vzpomněla si, že by to mohla být... No ano, to by odpovídalo, před několika týdny byla na táboře a **několikrát během tábora měla klíště.**
- **Obvodní lékař** ji poslal na **dětskou infekční kliniku**, kde **zkušená infekcionista** potvrdila, že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



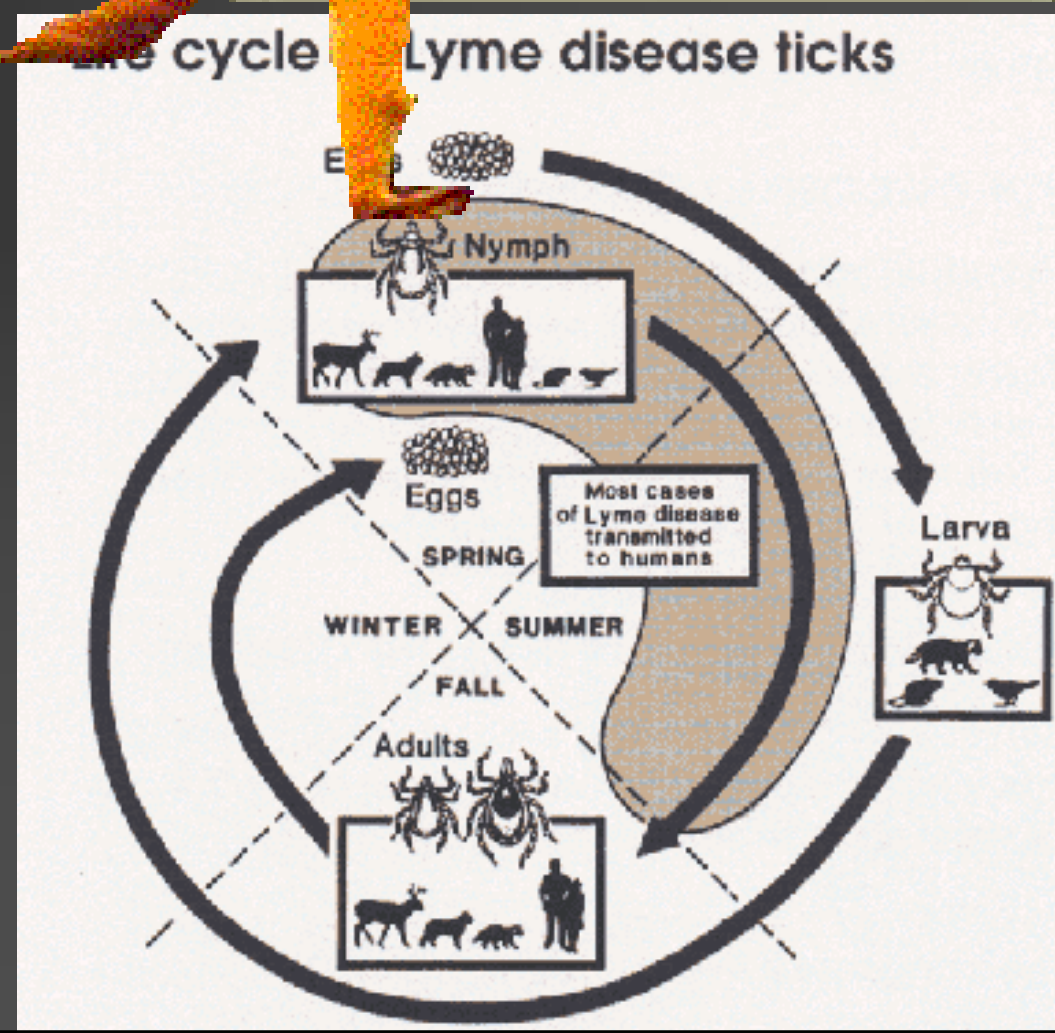
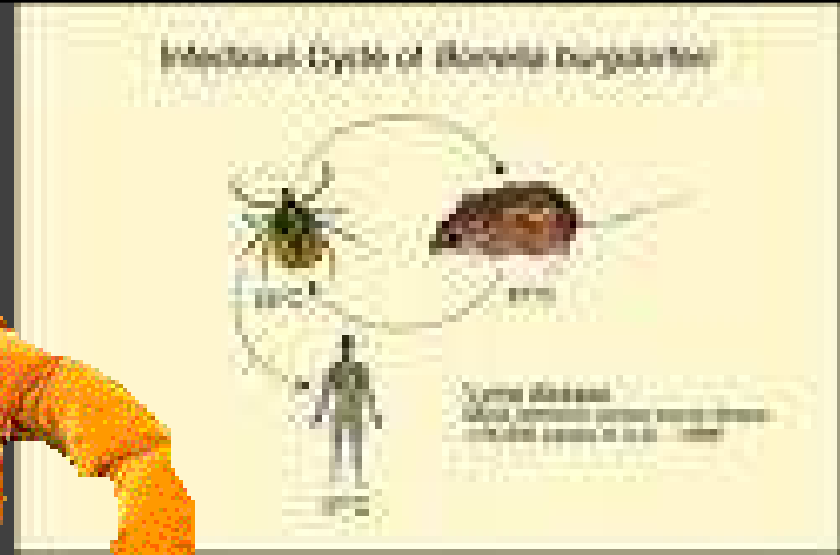
Viníkem byla



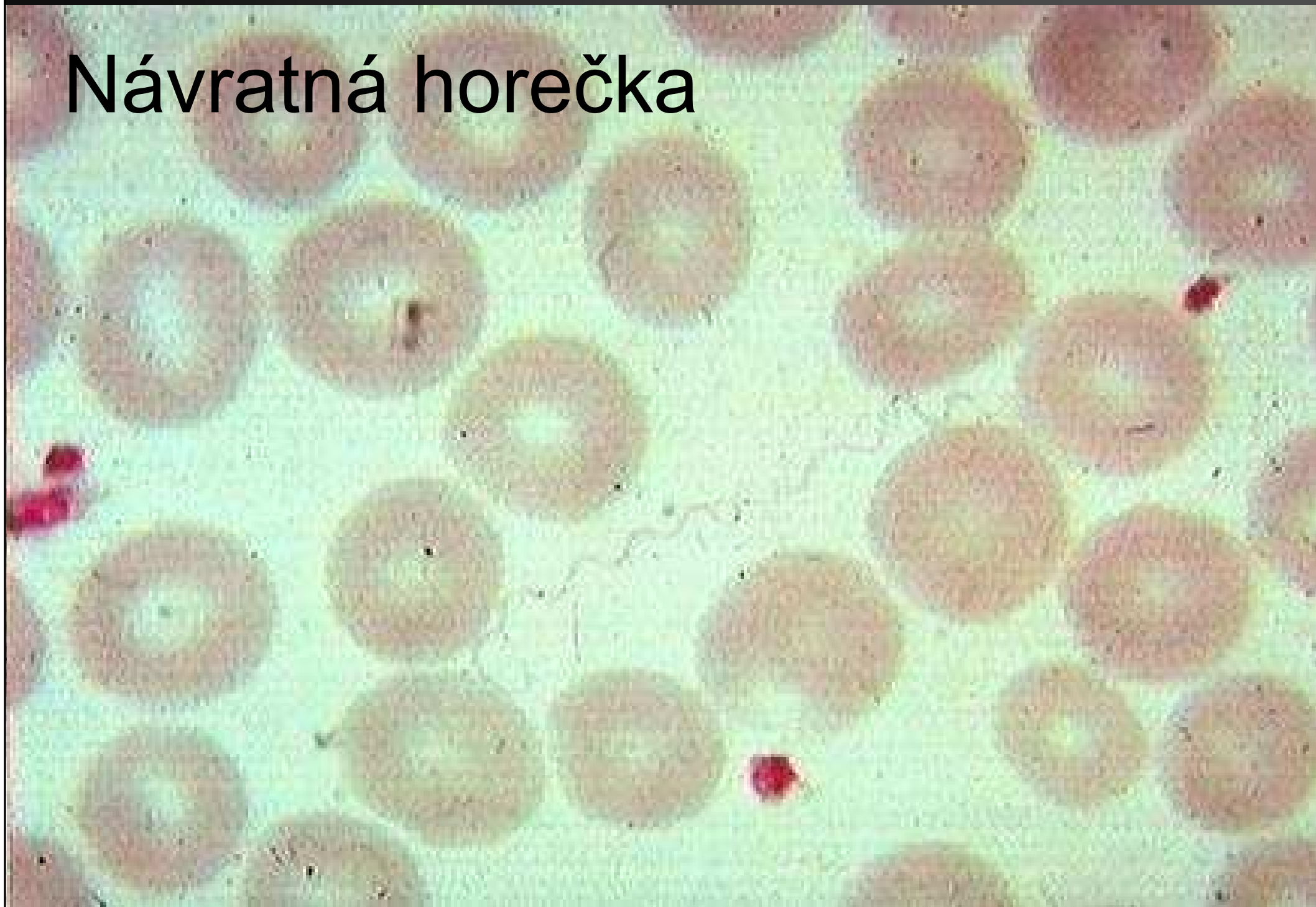
- *Borrelia afzelii*, jedna z borrelií, vyvolávajících Lymeskou nemoc a patřících do skupiny *Borrelia burgdorgeri sensu lato* (= „v širším slova smyslu“)
- Tento druh „v širším slova smyslu“ se rozpadá na řadu „v užším slova smyslu“. Nejvýznamnější jsou *B. garinii*, *B. afzelii* a *B. burgdorferi sensu 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

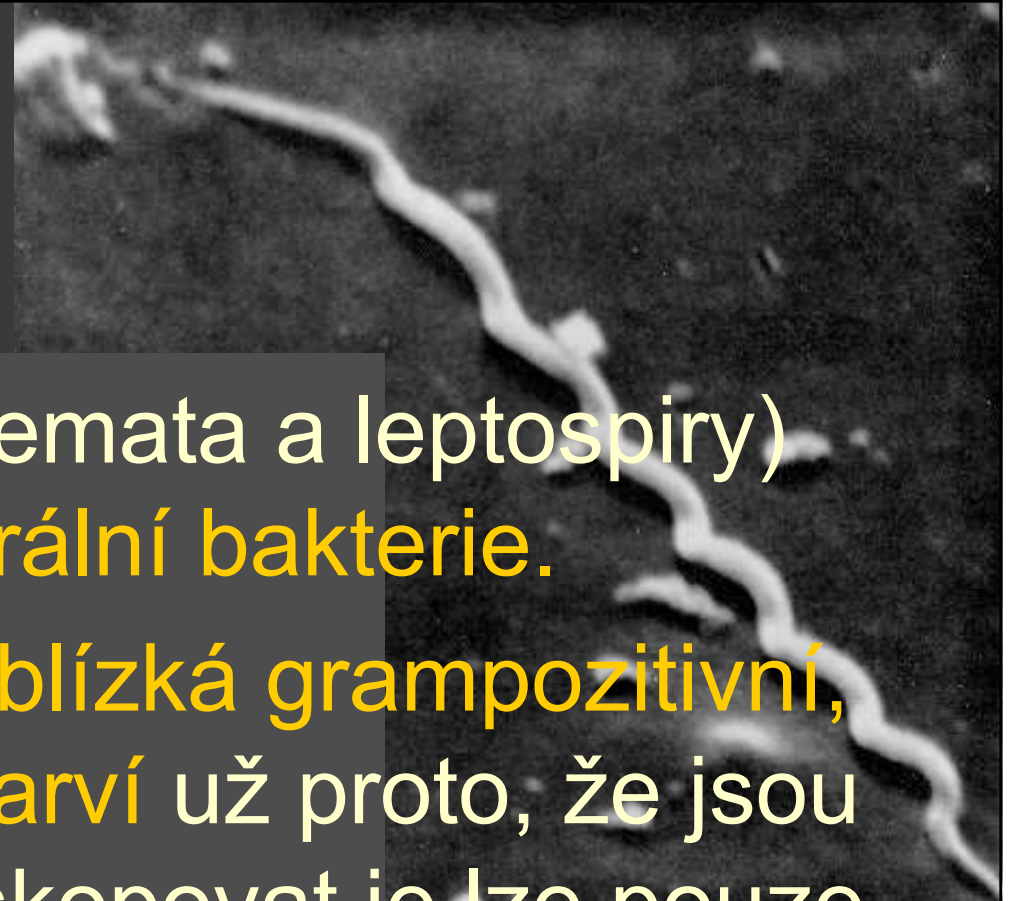


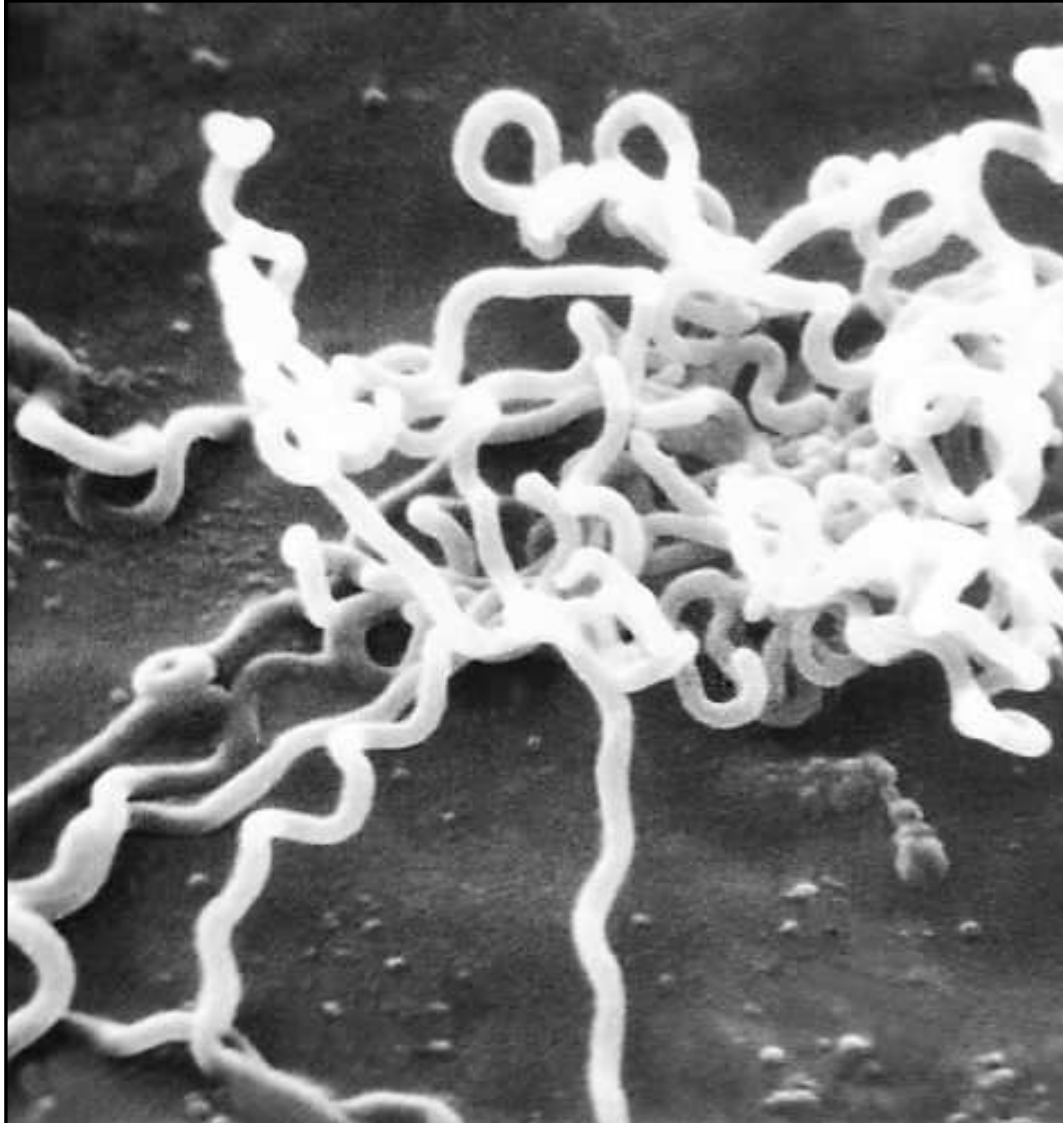
Návratná horečka



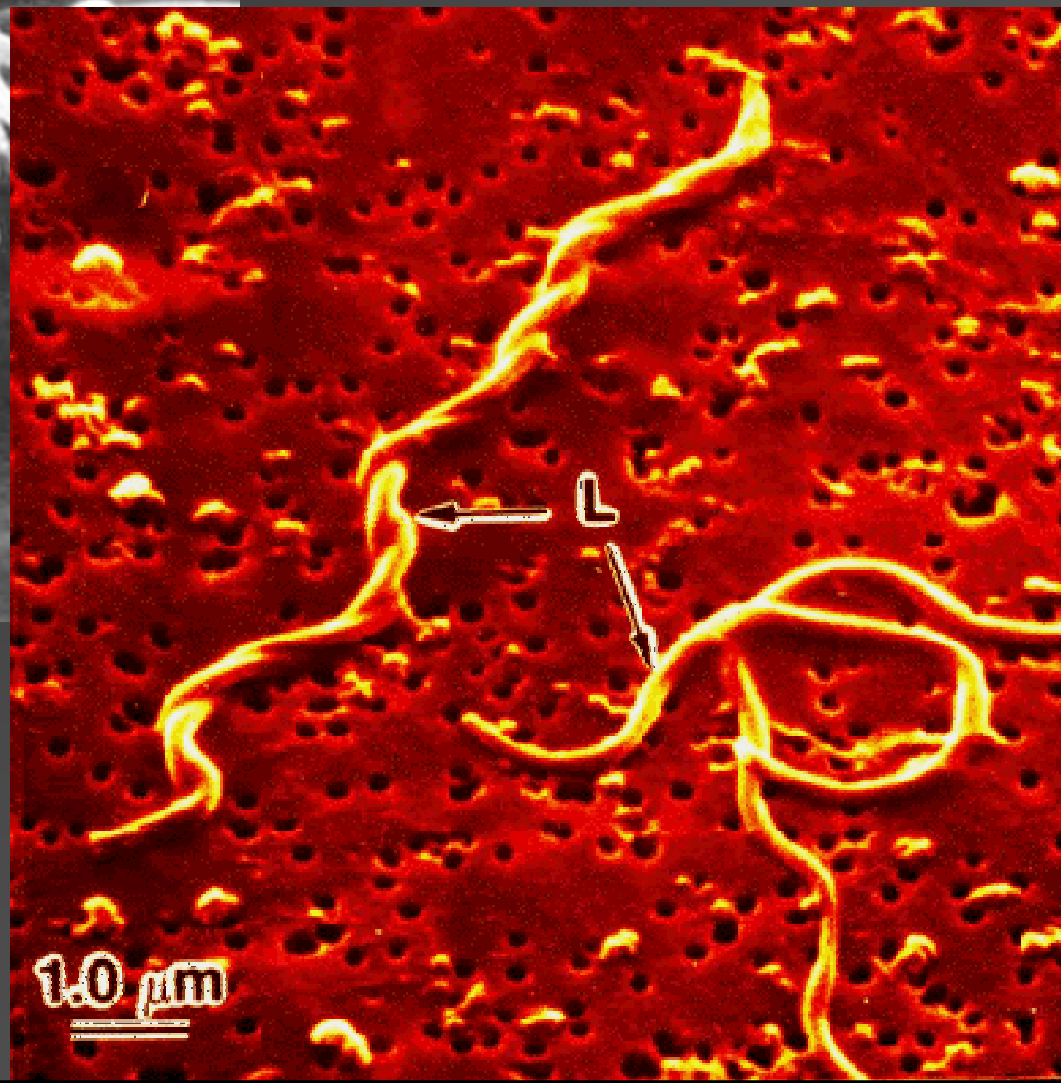
Spirochety

- Borrelie (ale také treponemata a leptospiry) jsou spirochety, tedy spirální bakterie.
- Jejich buněčná stěna je blízká grampozitivní, 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)





Spirochety v elektronovém mikroskopu



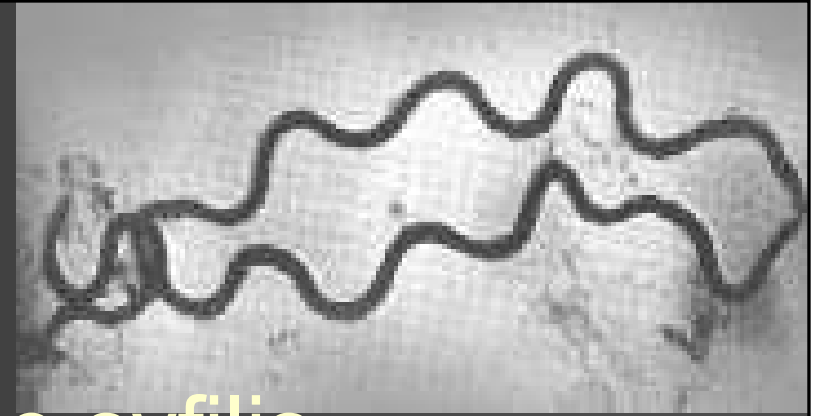
Příběh druhý (vymyšlený, ale základ vychází ze skutečného příběhu)

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

Viníkem zde bylo



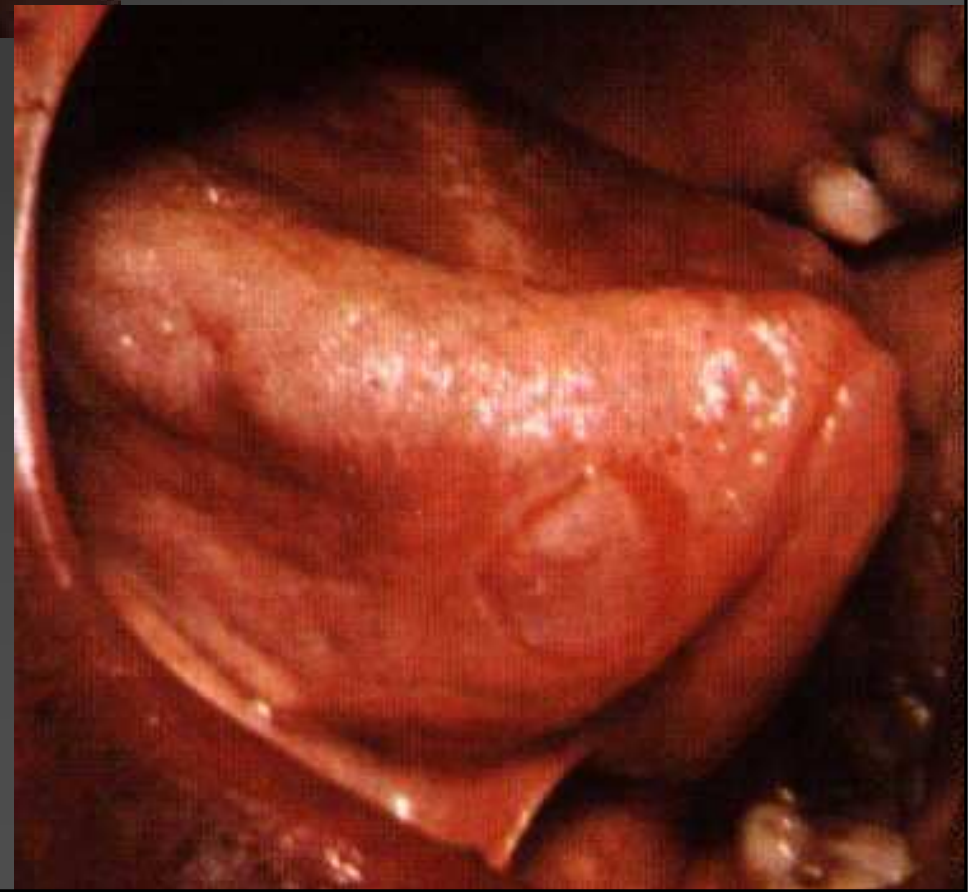
- *Treponema pallidum*, původce syfilis
- Syfilis je klasická pohlavní nemoc. Přenáší se výhradně sexuálně. Jde ovšem o systémové onemocnění – v pokročilých stádiích postihuje celé tělo postiženého člověka (gummata, disekce aorty, neurolyues, psychické příznaky)
- Některé poddruhy *T. pallidum* a některá jiná treponemata způsobují jiné 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.*



primární syfilis
(„šánkr“)



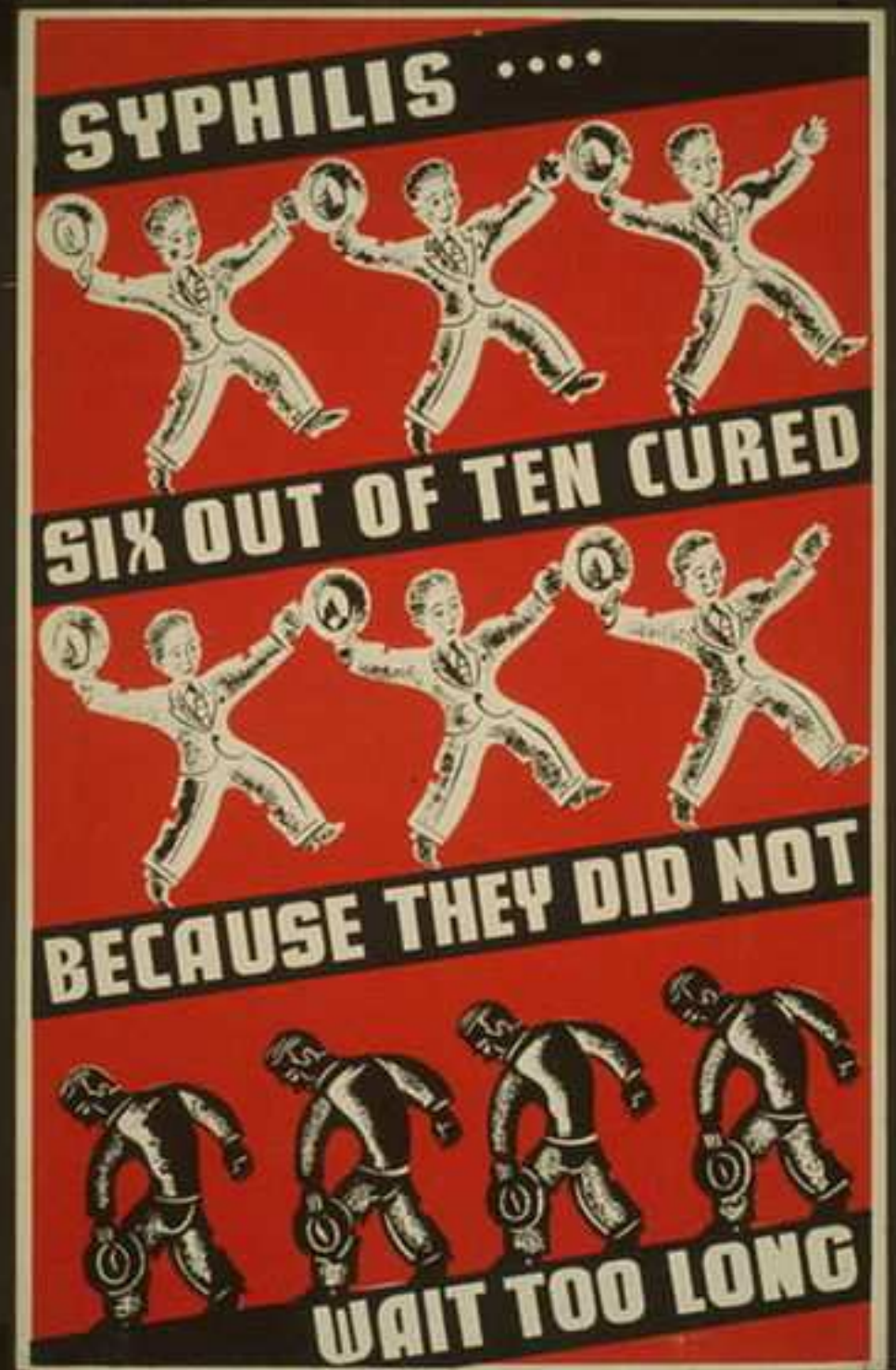
Průběh syfilis

sekundární
syfilis

Terciární syfilis



Syphilis

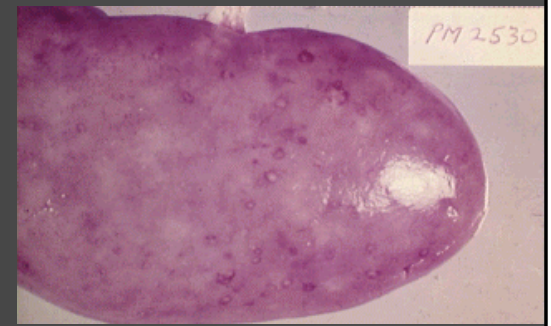


Yaws (framboesie)



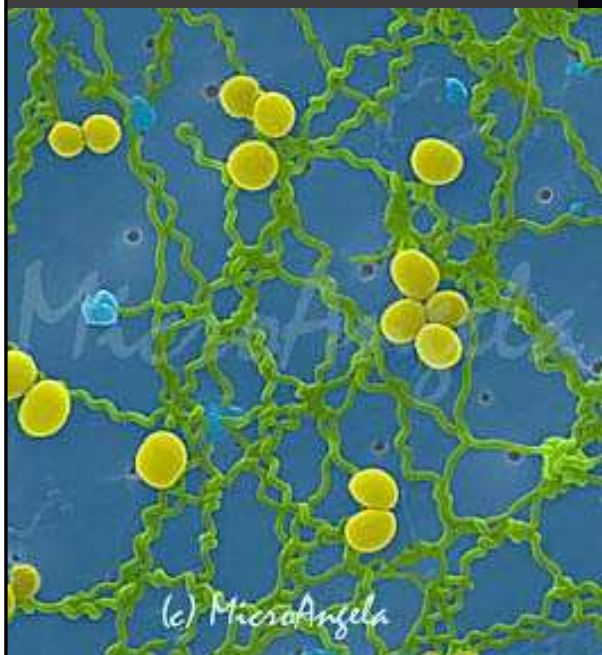
Příběh třetí

Ledvina postižená
příslušnou
chorobou



- **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 *Grippityphosa* (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 sihleďte zapamatovat aspoň je 😊)



Defilé zločinců: Spirochety

1 Syfilis ve tkáni

2 Borrelie

3 Morfologie
různých serovarů
leptospir

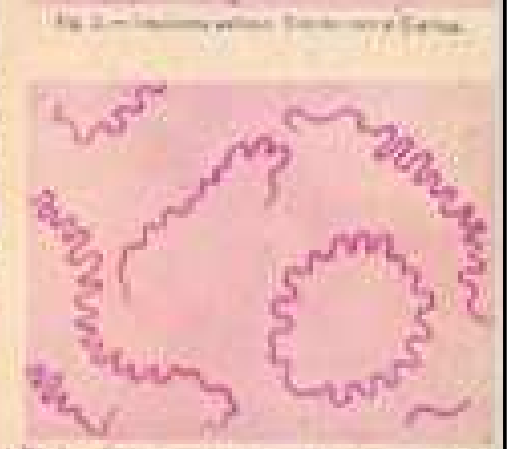
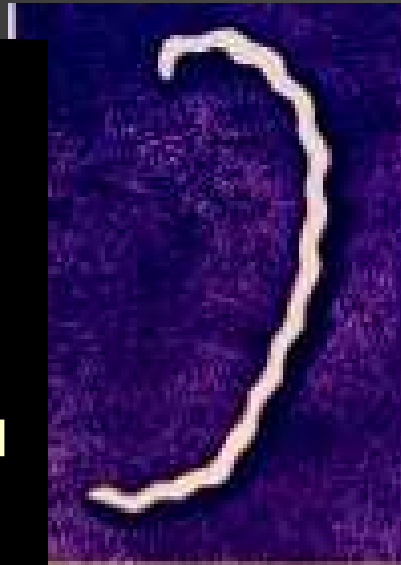
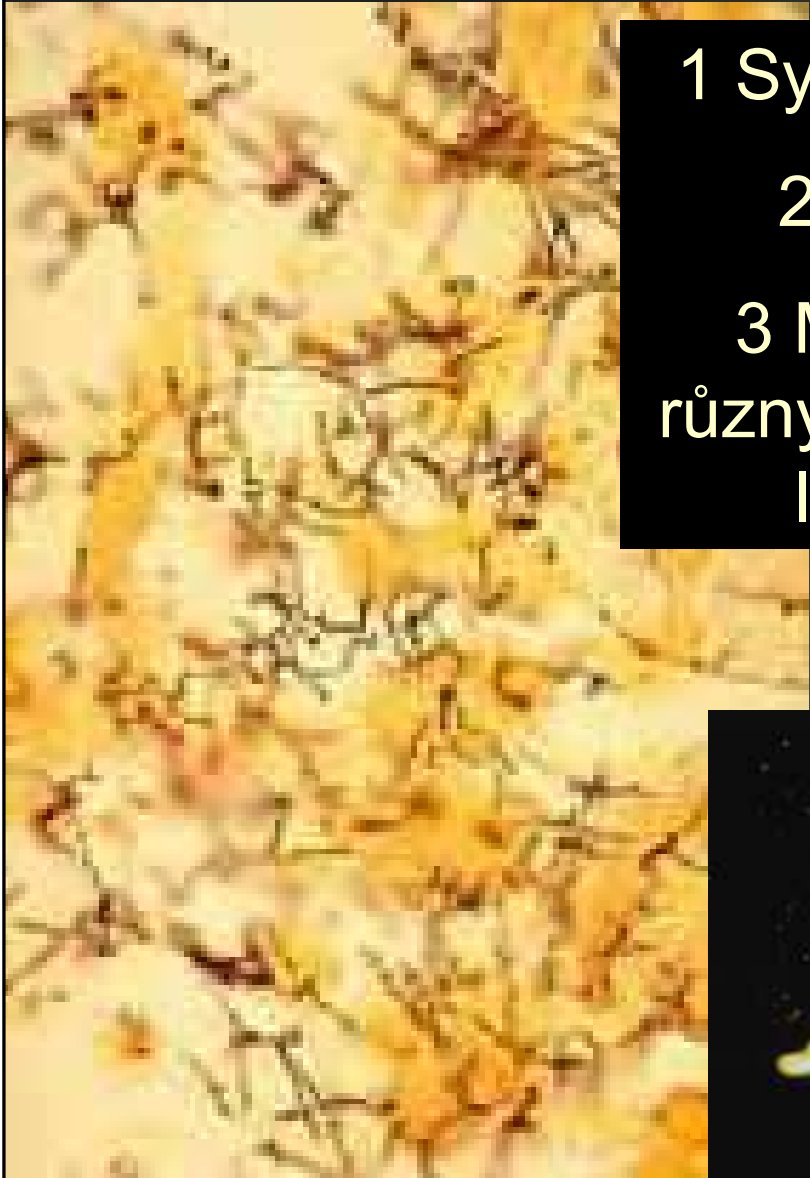


Fig. 11. Spirochetes (Leptospira interrogans) in tissue.



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



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

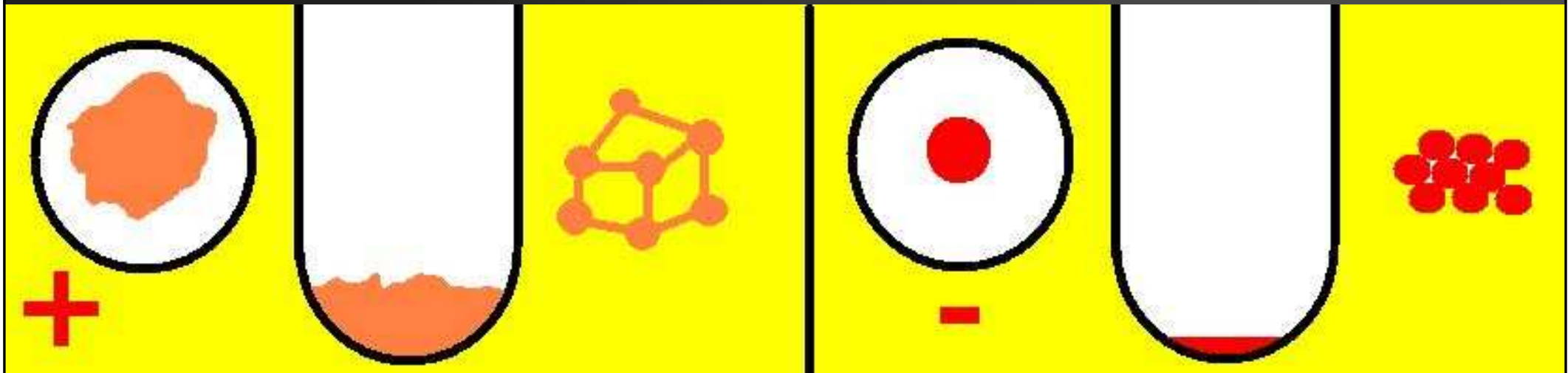
Přehled nejdůležitějších testů na syfilis

TPHA – Tr. pasivní hemaglutinační test

TPPA – dtto, místo krvinek polycelulóza

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

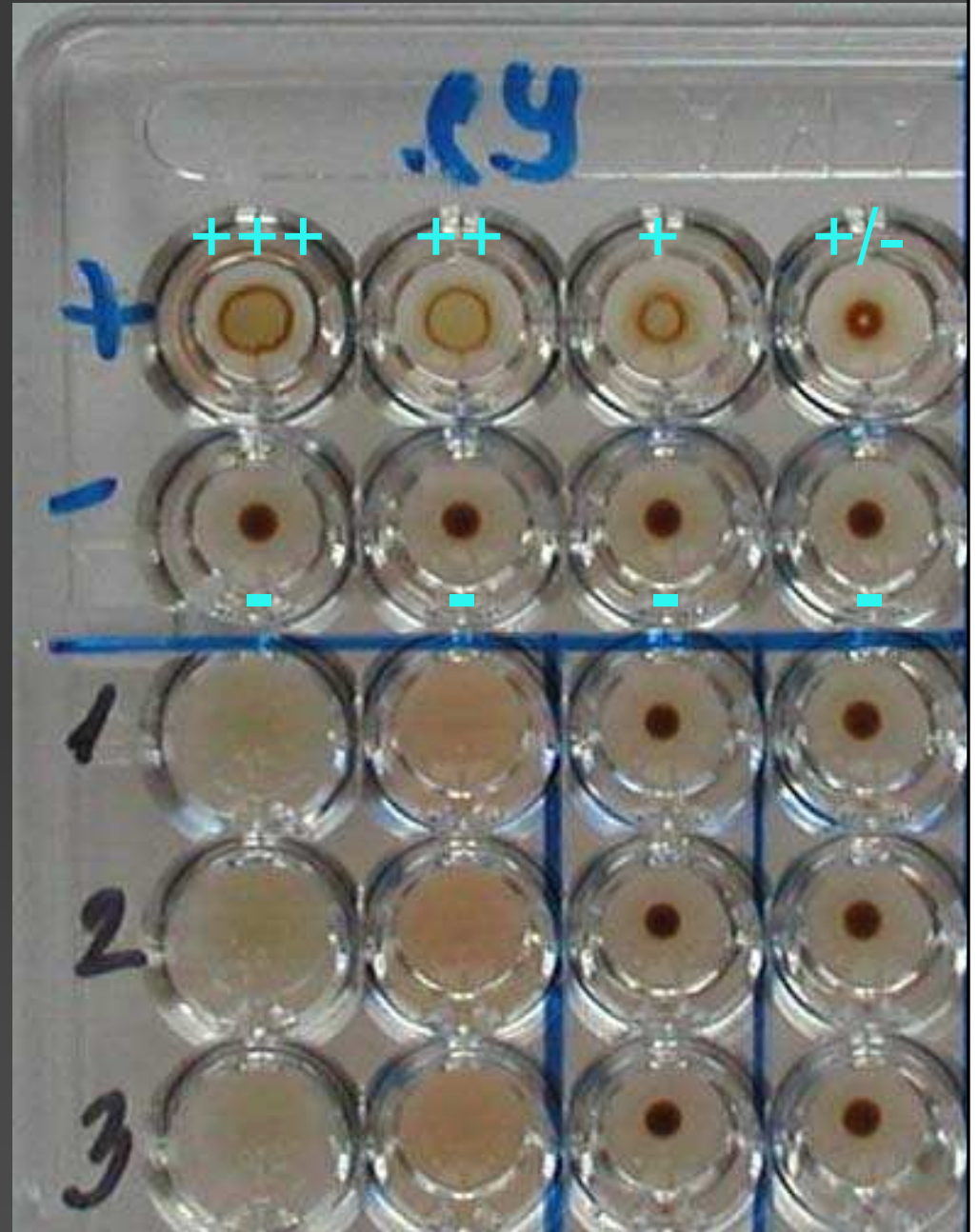
TPHA - připomenutí



- **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

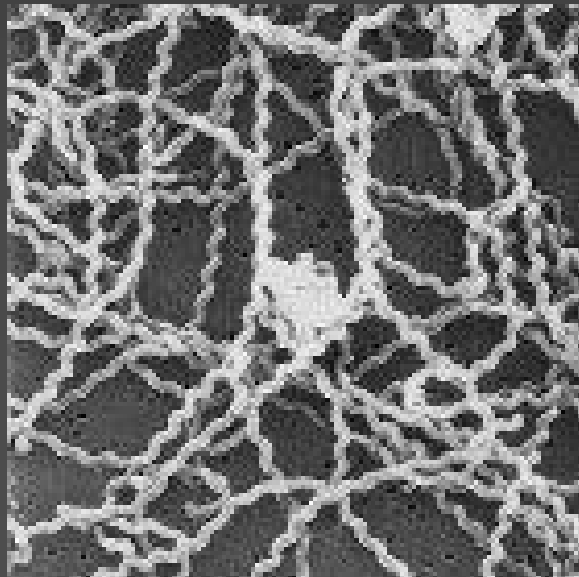
Připomenutí TPHA II

(www.medmicro.info)



Borrelie a leptospiry – průběh pátrání

- **Borrelie:** Používá se zpravidla ELISA jako screening, Western blotting jako konfirmace
- **Leptospiry:** Je možný přímý mikroskopický průkaz, jinak se opět používají různé metody průkazu protilátky, popřípadě též průkazu protilátek



Úkol 1: ELISA – borrelie

- Odečtete výsledky reakce ELISA.
- Pozitivní jsou pacienti s hodnotami vyššími, než je hodnota v kalibračním důlku. Ten je umístěn v poloze A1.
- Vzorky S1 až S5 se nehodnotí. Nejsou to vzorky pacientů, ale vzorky zaslané do naší laboratoře v rámci externí kontroly
- Uvědomte si, jaký význam mají protilátky IgM a jaký protilátky IgG

Úkol 2: Borrelie – confirmace WB

- Konfirmují se pouze ty výsledky, které vyšly pozitivní reakcí ELISA. Za pozitivní se u IgM považuje pozitivita alespoň v jednom specifickém pruhu, u IgG alespoň ve dvou specifických pruzích (ty jsou zvýrazněny)

Úkol 3: Borrelie – PCR

- PCR je reakce přímého průkazu, je tedy průkaznější než hledání protilátek, zejména u čerstvé infekce. Zjistěte, který pacient je pozit.

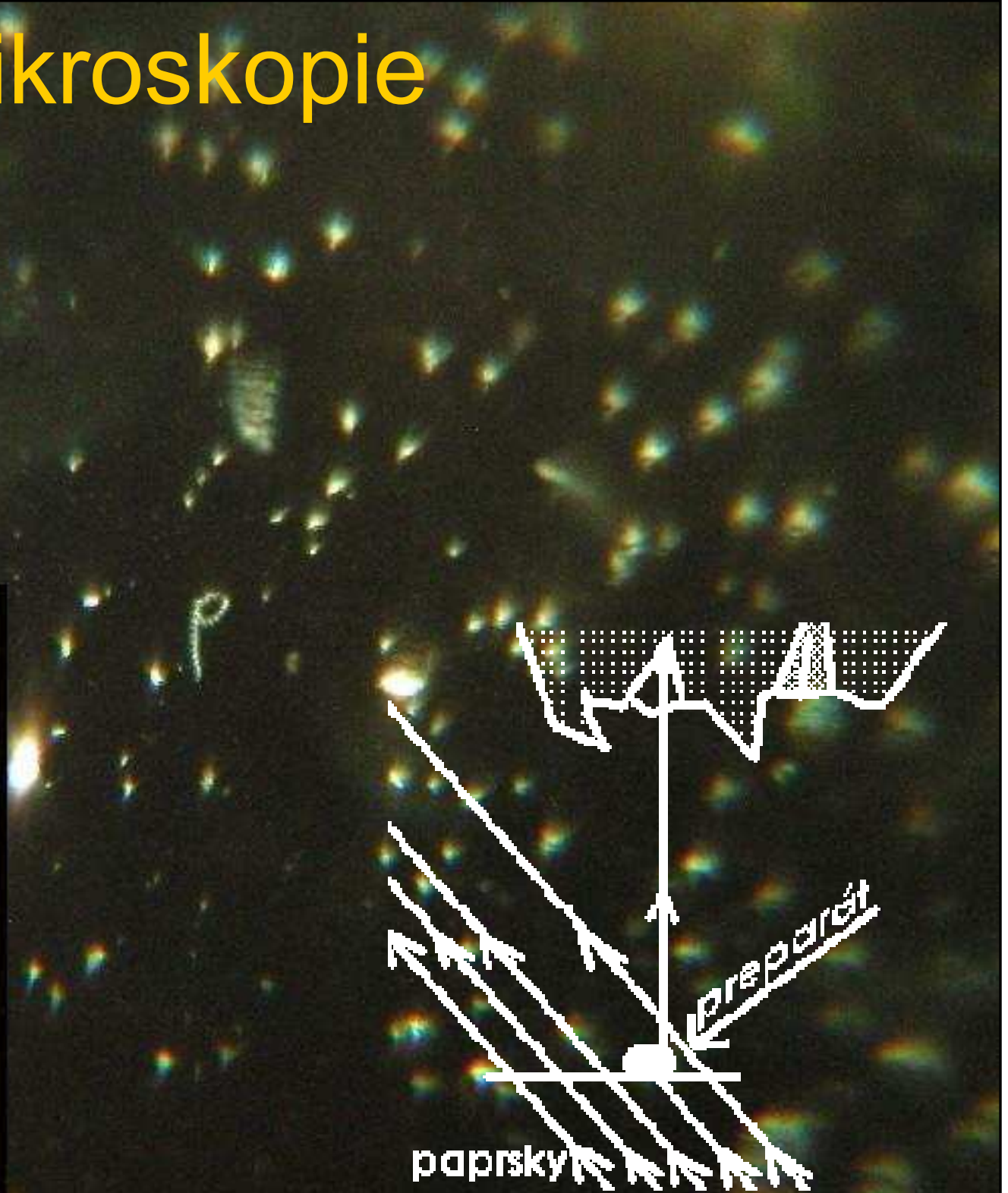
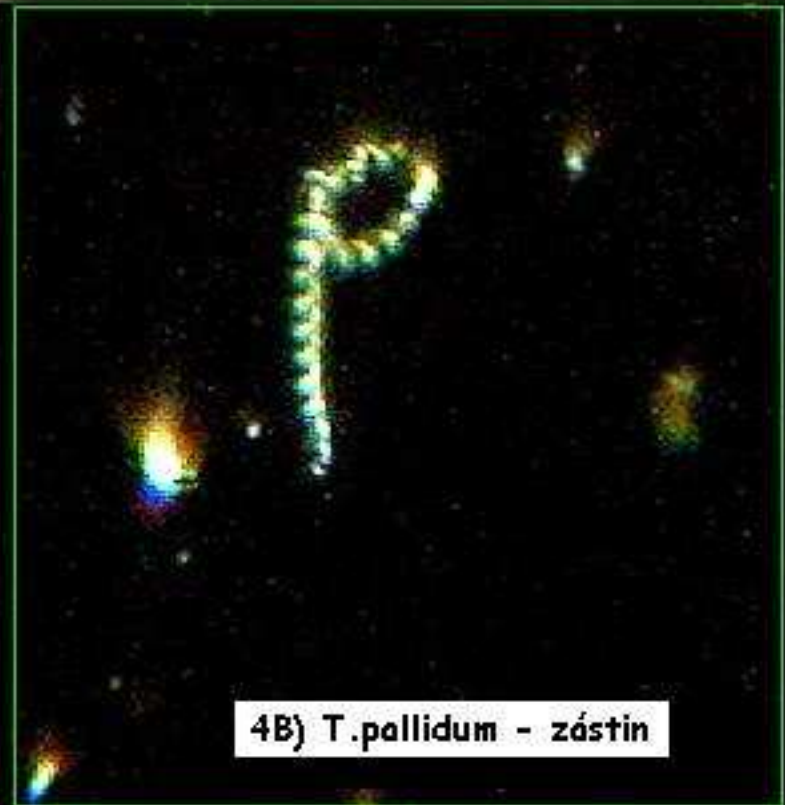
Úkol 4 a b c – přímý průkaz syfilis

- **4 a Králík se nezanítil**, náhradou vám nabízíme obrázek novozélandského bílého králíka, používaného k těmto pokusům (viz další stránka)
- **4 b Zástin** – prohlédněte si obrázek, který následuje za obrázkem králíka, a obkreslete si je do protokolu (princip i vzhled *Treponema pallidum*)
- **4 c Přímá IMF** – prohlédněte si ještě další obrázek a zakreslete

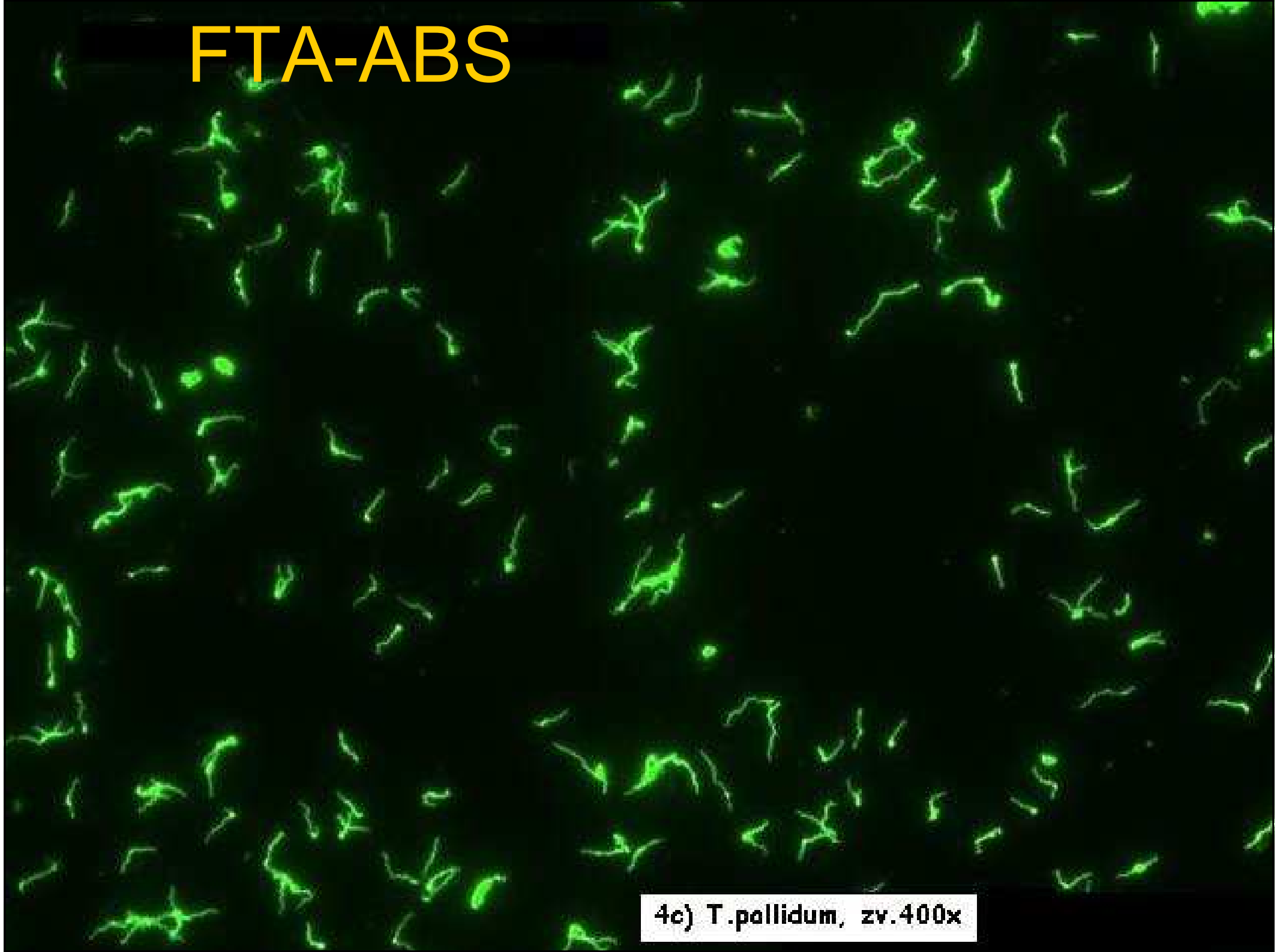
New Zealand Rabbit



Zástinová mikroskopie



FTA-ABS



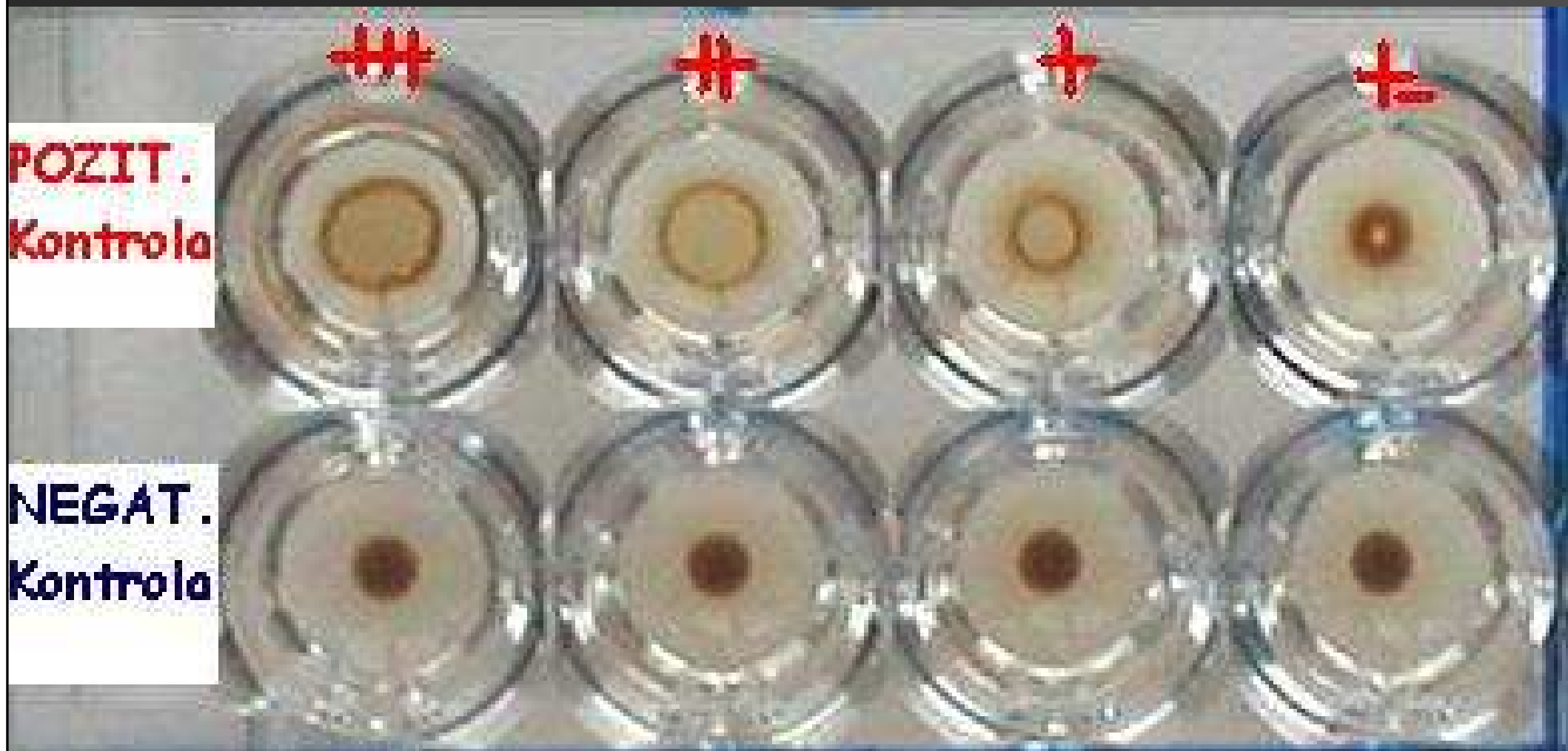
4c) *T. pallidum*, zv. 400x

Úkoly 5 a 6 – serologie syfilis (screening a konfirmace)

- V úkolu 5 vybereme ze screeningových pacientů ty, které je třeba konfirmovat
- V úkolu 6 potvrdíme jejich diagnózu a učiníme konečný závěr
- Pracujeme s pěticí pacientů:
 - A = těhotná žena
 - B = pacient s hojící se ulcerací na glans penis
 - C = kontakt pacienta s ulcerací (B)
 - D = žena s projevy sekundarismu (mokravé léze v dutině ústní, riziková anamnéza)
 - E = novorozeně ženy léčené před 2 lety pro syfilis

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

TPHA – hodnocení



Výsledky - screening

Proto
provedeme
konfirmasi...

Vz.	RRR	TPHA	závěr
A			
B			
C			
D			
E			

Jak hodnotit Western blot

- Srovnává se intenzita pruhů na posuzovaném blotu s intenzitou pruhu p47 (označeno na xerokopii červeně).
- Pruhy stejně intenzivní dostanou 1 bod, intenzivnější 2 body.
- Body se sečtou pro každý jednotlivý blot.
- IgM – pozitivní při zisku 4 a více bodů
- IgG – pozitivní při zisku 5 a více bodů
- *Hodnocení reakce ELISA máte uvedeno přímo u listů s výsledky reakce*

Výsledky - konfirmasiace

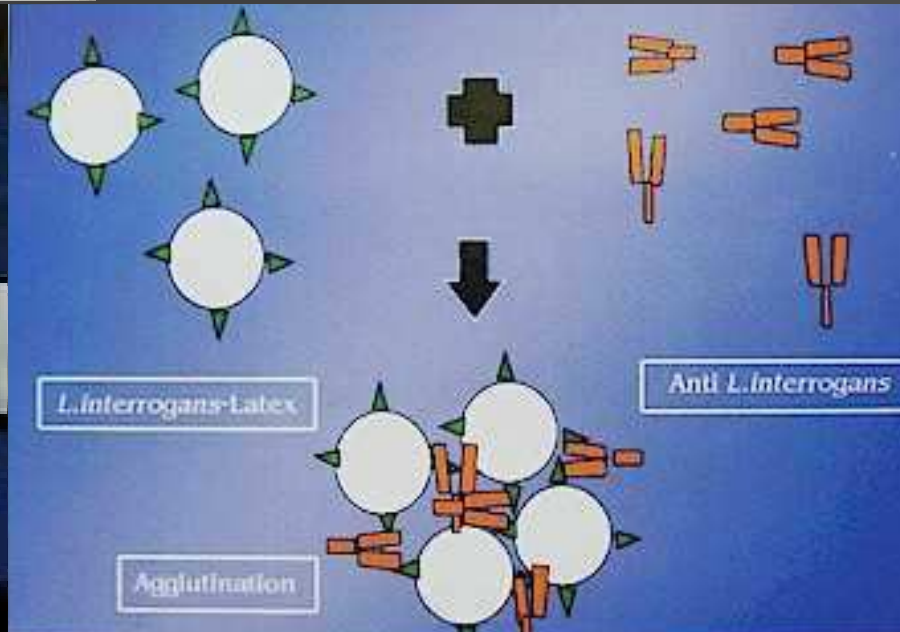
** Nejspíše jen pasivně přenesené
protilátky. Dítě je třeba dispenzarizovat
a kontrolovat v 6 týdnech a ve 3, 6,
event. 12 měsících.*

Vz.	FTA	IgM		IgG		Závěr
	ABS	ELISA	WB	ELISA	WB	
A	0	0	0	0	0	NEGATIVNÍ
B	+	±	+	0	+	POZITIVNÍ, nástup seroreakce
C	0	0	0	0	0	(dosud ?) NEGATIVNÍ
D	++++	+	+	+	+	SILNĚ POZITIVNÍ
E	+	0	0	+	+	Viz poznámka*

Leptospira v elektronovém mikroskopu

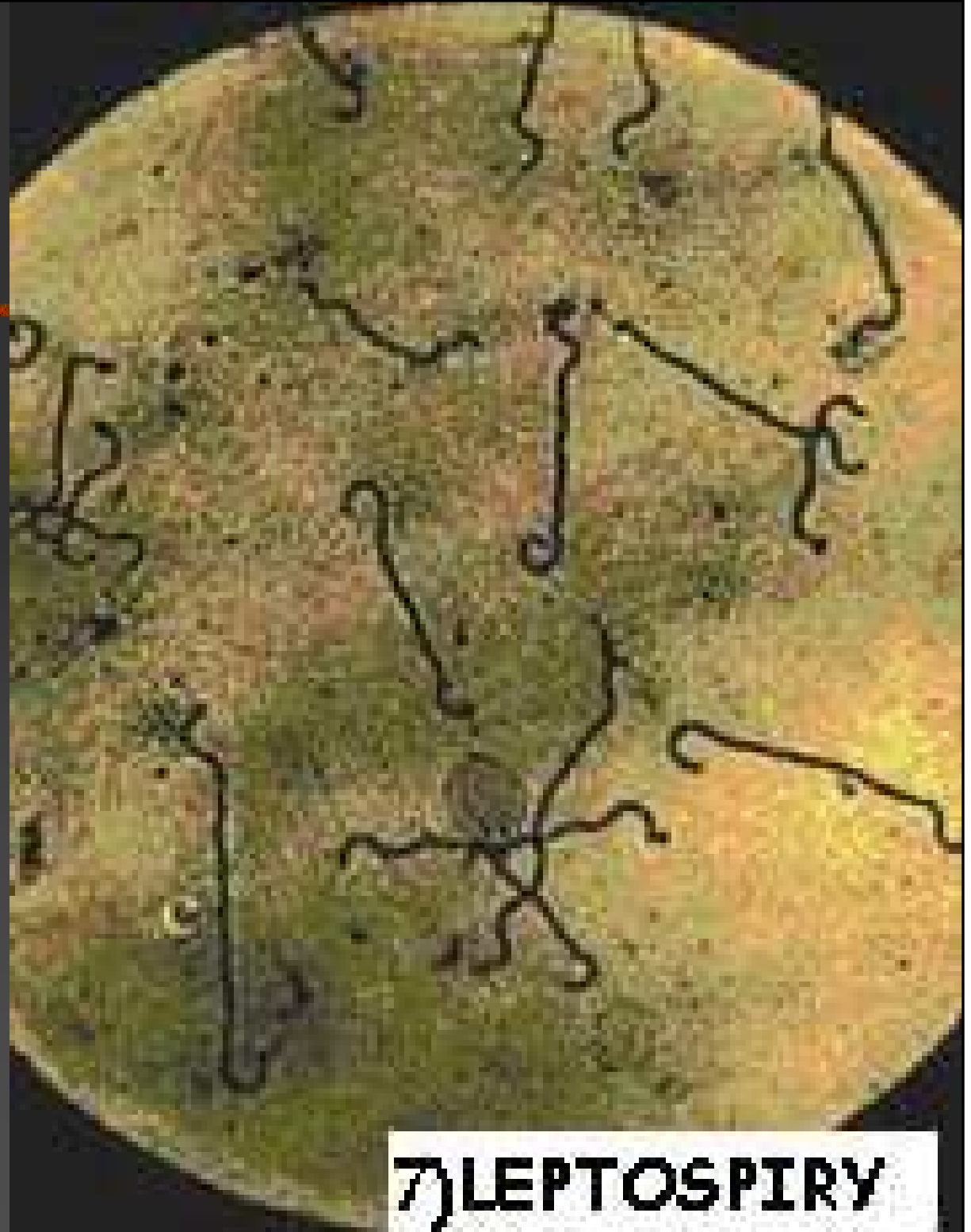


Další diagnostické možnosti u leptospir (latexová aglutinace)

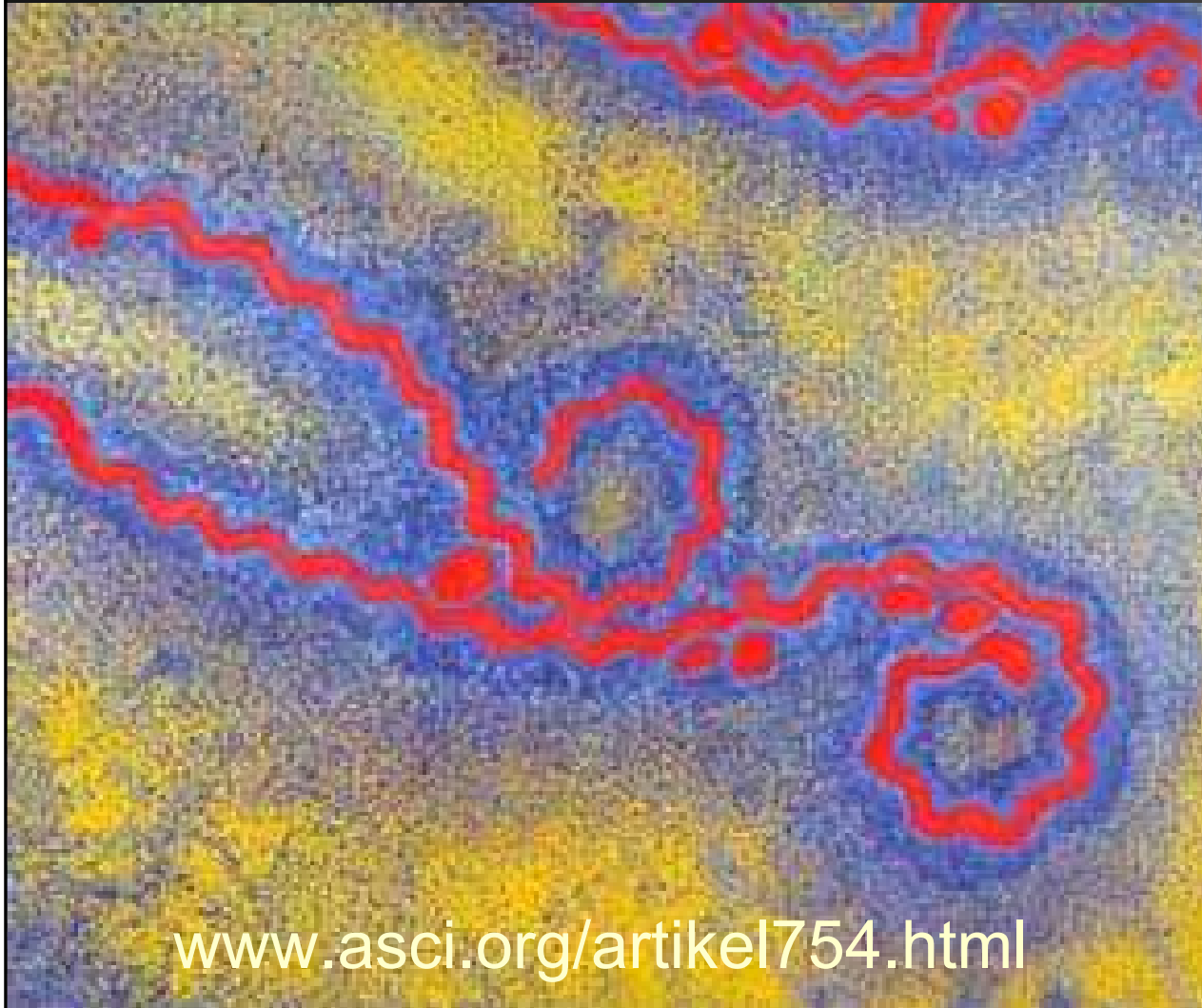


Úkol 7 – diagnostika leptospir

- Prohlédněte si
obrázek a
obkreslete jej



Nashledanou při dalším dílu!



www.asci.org/artikel754.html

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

Použity obrázky z adres:

03 - 06 <http://www2.mf.uni-lj.si/~mil/bakt4/bakt4.htm>

07 - 09 uhavax.hartford.edu/bugl/histepi.htm.

10 11 www.primer.ru/std/gallery_std/treponema.htm.

12

<http://www.revoptom.com/osc/3078/Ro0304F8Trepone ma.jpg>

13

<http://nl.wikipedia.org/wiki/Afbeelding:TreponemaPallidum.jpg>

14 www.wadsworth.org/databank/hirez/hechemy2.gif

15 www.borrelia.de/Verlauf/verlauf.html.

16 www.niaid.nih.gov/dir/labs/lhbp/rosa.htm.

17

<http://medinfo.ufl.edu/year2/mmid/bms5300/images/d7155.jpg>

19

<http://www.pasteur.fr/recherche/borrelia/Borreliaspecies.html>

20 21 <http://www.presse.uni-wuppertal.de/archiv/output/okt98/Borrelia.jpg>

22 až 40 www.med.sc.edu:85/fox/spiro-neisseria.htm.

41 www.ucmp.berkeley.edu/stat/9837.html.

42

http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n3/imagen/diferentes_serovares_leptospira.jpg

43

http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n3/imagen/paciente_icterico.jpg

44 www.scidev.net/scidev_images/leptospira.jpg

45 www.pbrc.hawaii.edu/microangela/lepto.htm.

46 - 52 www.thailabonline.com/leptospira.htm.

53 54 idsc.nih.gov/.../k03/k03_012/k03_012.html

55 www.rockinjawrabbits.com/newzealand.htm.