

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)



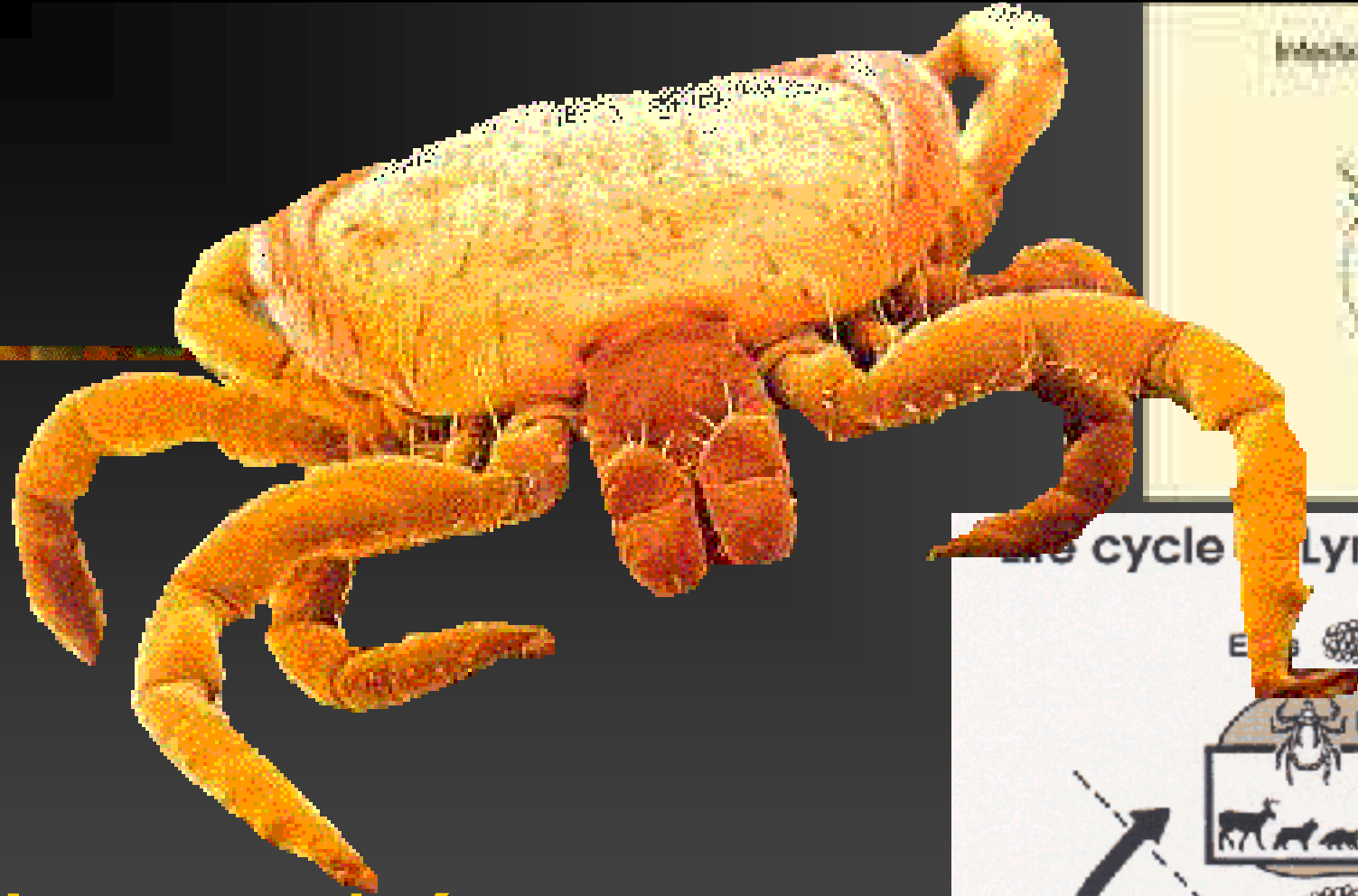
Příběh první

- **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...**

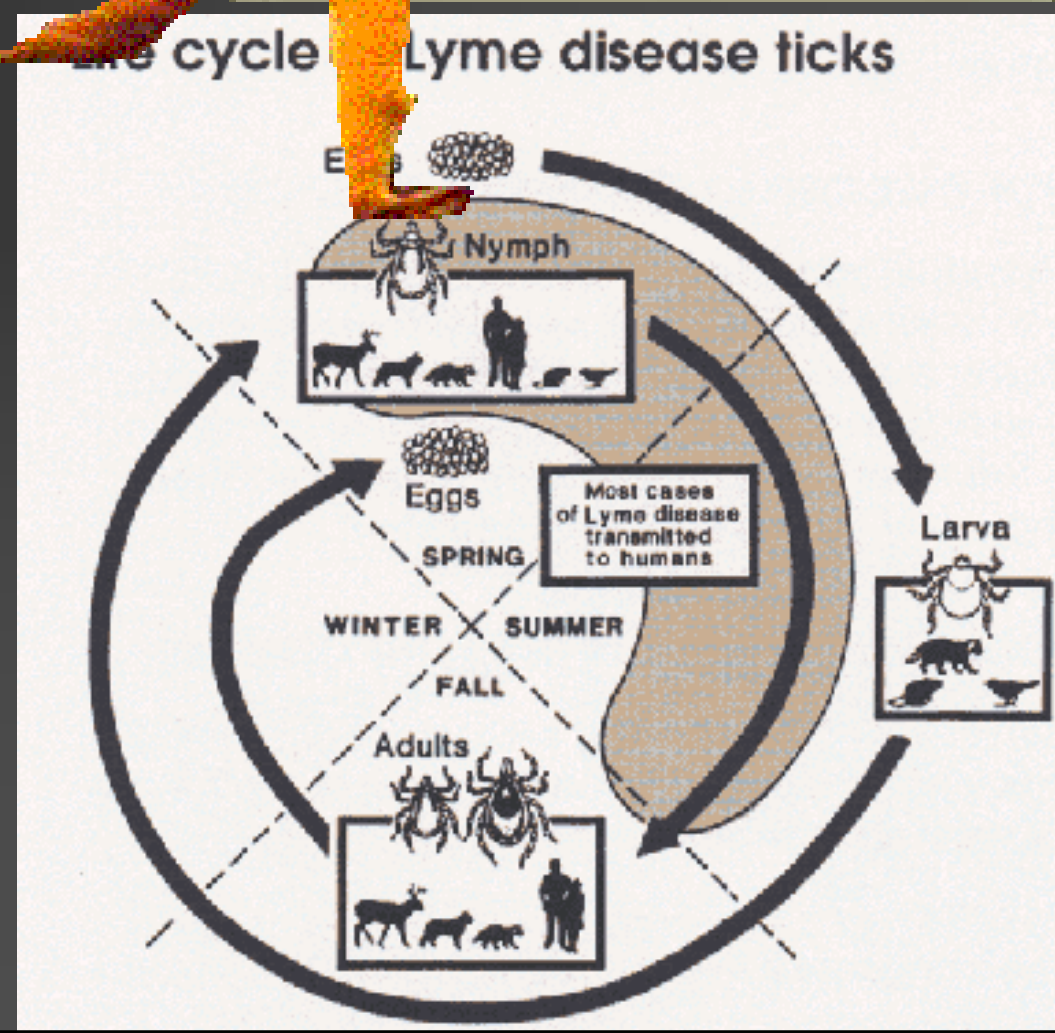
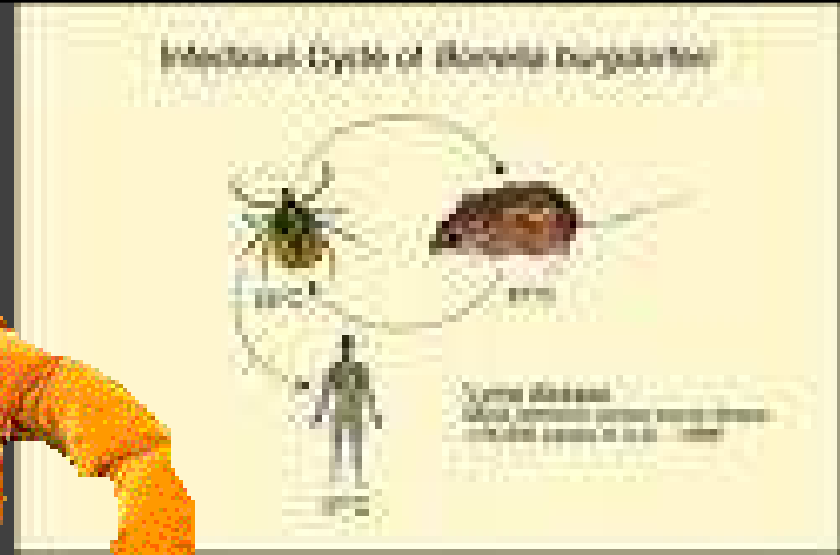
Viníkem byla



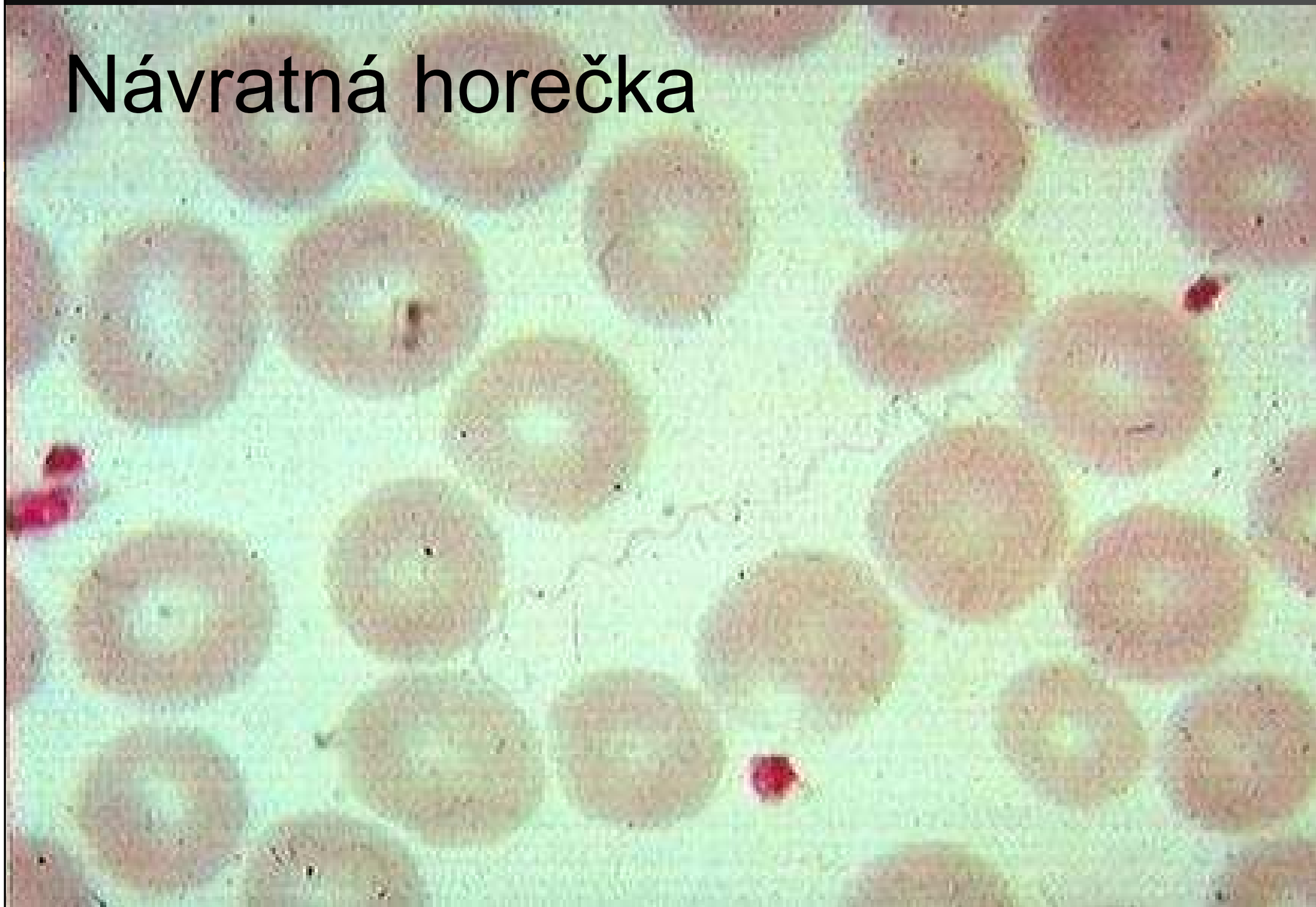
- *Borrelia afzelii*, jedna z borrelií, vyvolávajících Lymeskou nemoc a patřících do skupiny *Borrelia burgdorgeri sensu lato* (= „v širším slova smyslu“)
- Tento druh „v širším slova smyslu“ se rozpadá na řadu „v užším slova smyslu“. Nejvýznamnější jsou *B. garinii*, *B. afzelii* a *B. burgdorferi sensu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

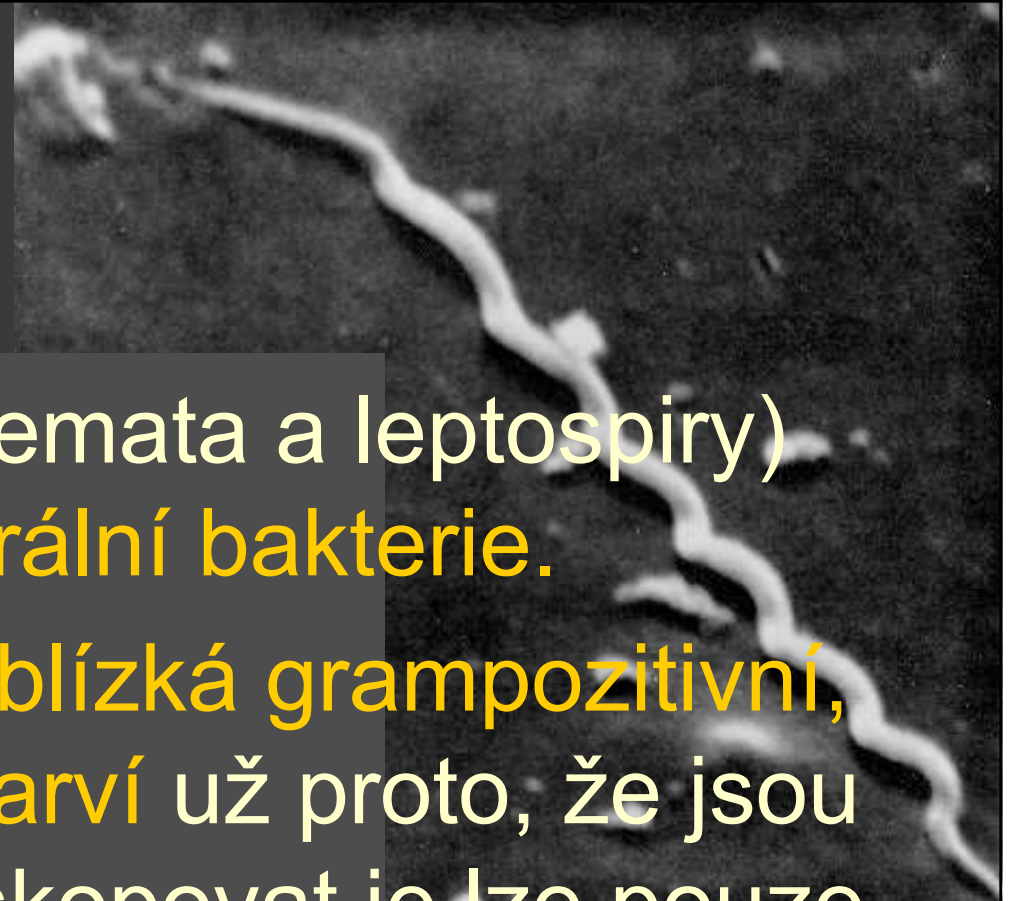


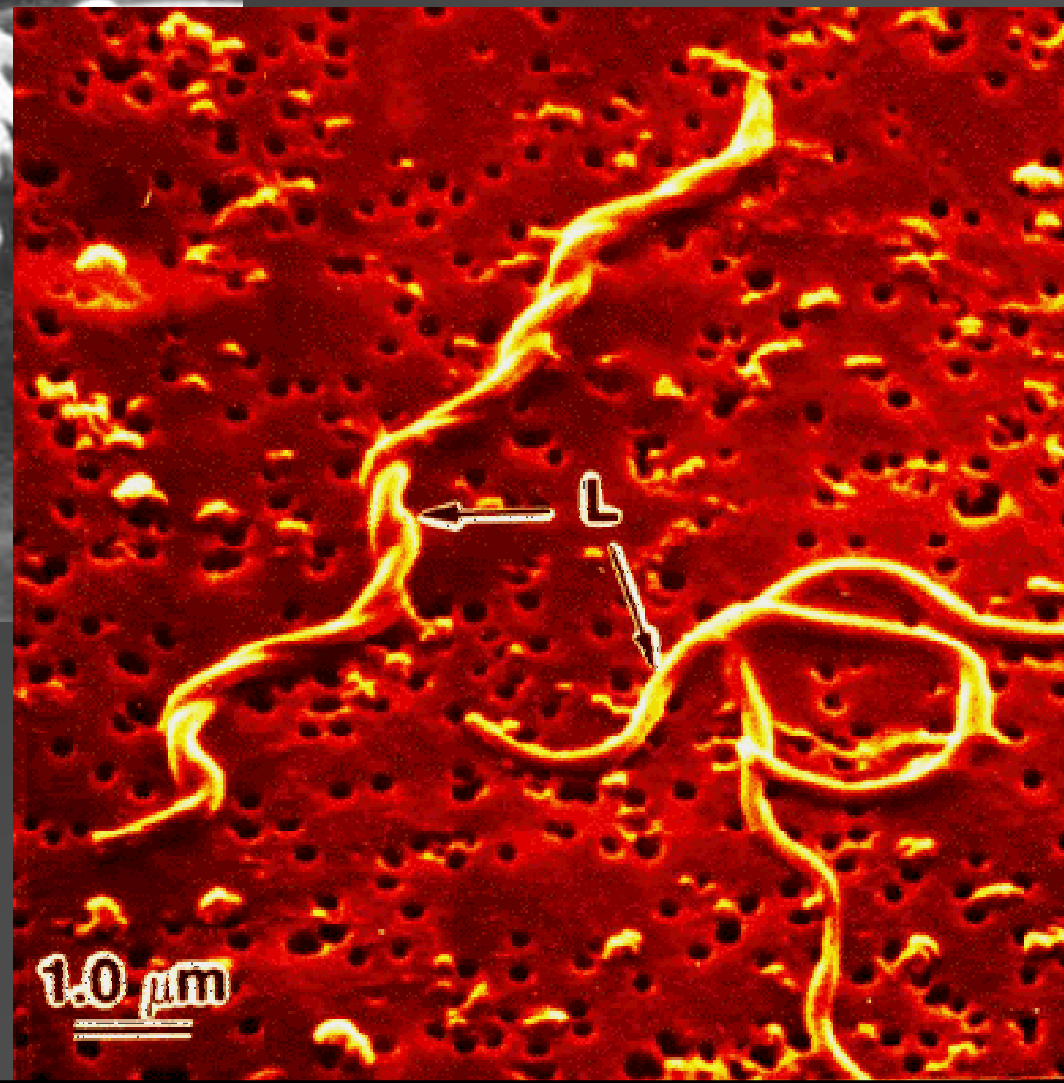
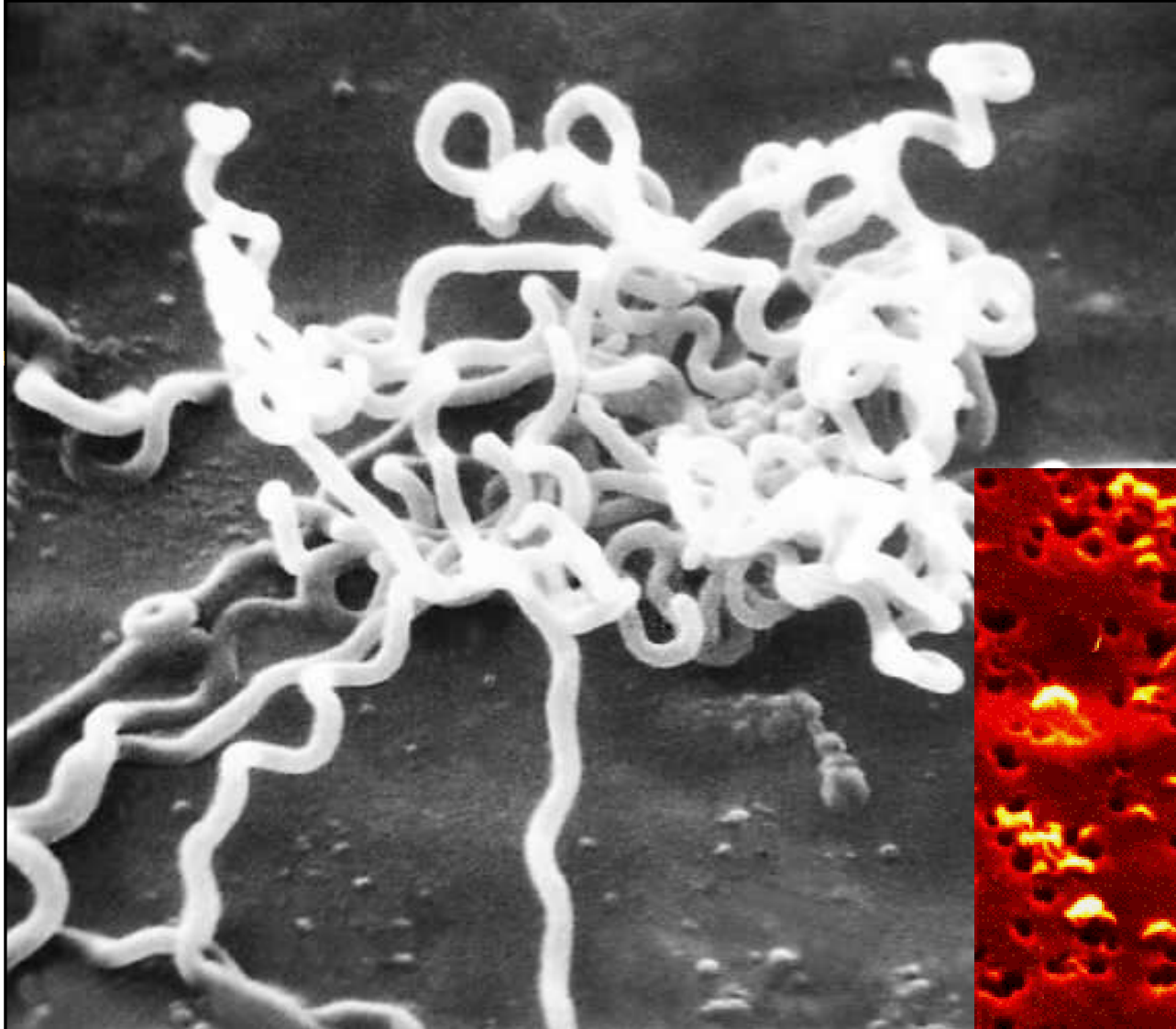
Návratná horečka



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

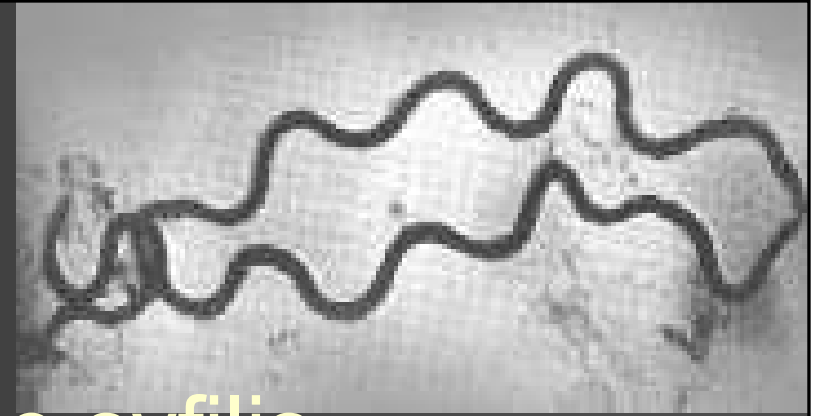
Příběh druhý (vymyšlený, ale základ vychází ze skutečného příběhu)

- 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



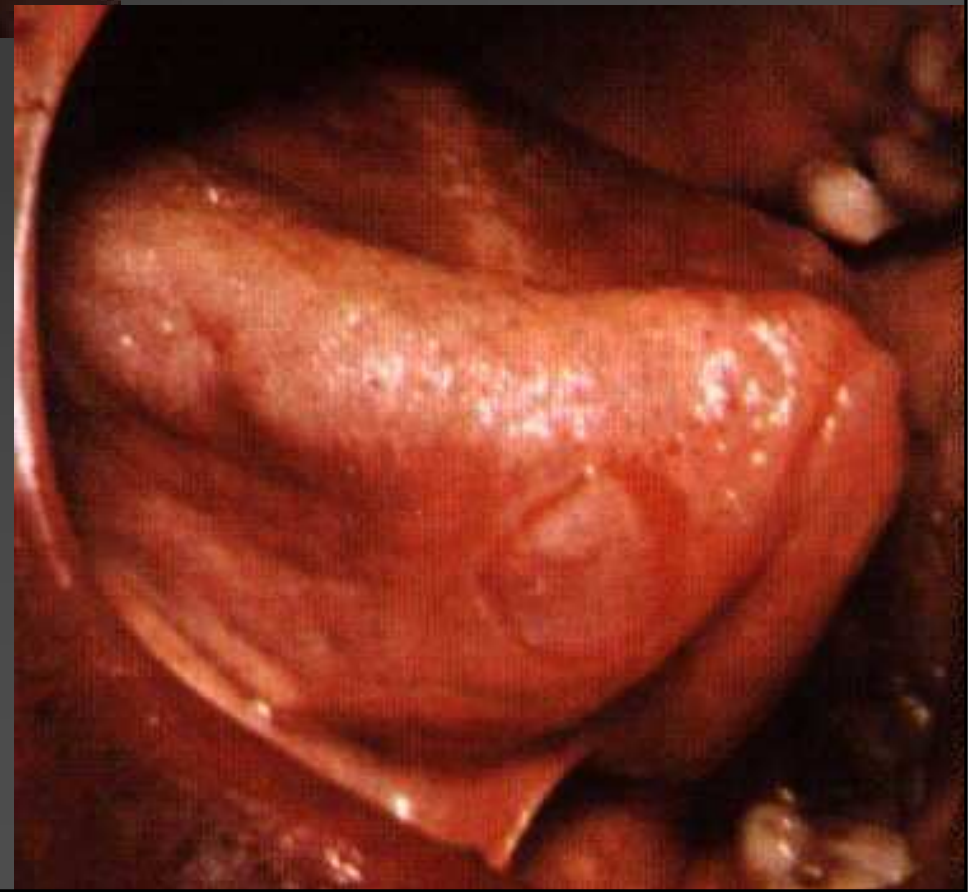
- *Treponema pallidum*, původce syfilis
- Syfilis je klasická pohlavní nemoc. Přenáší se výhradně sexuálně. Jde ovšem o systémové onemocnění – v pokročilých stádiích postihuje celé tělo postiženého člověka (gummata, disekce aorty, neurosyfilis, psychické příznaky)
- Některé poddruhy *T. pallidum* a některá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

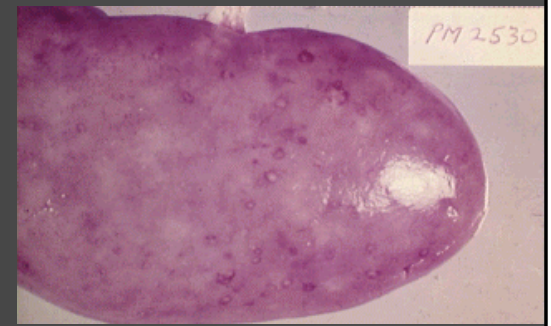


Yaws (framboesie)



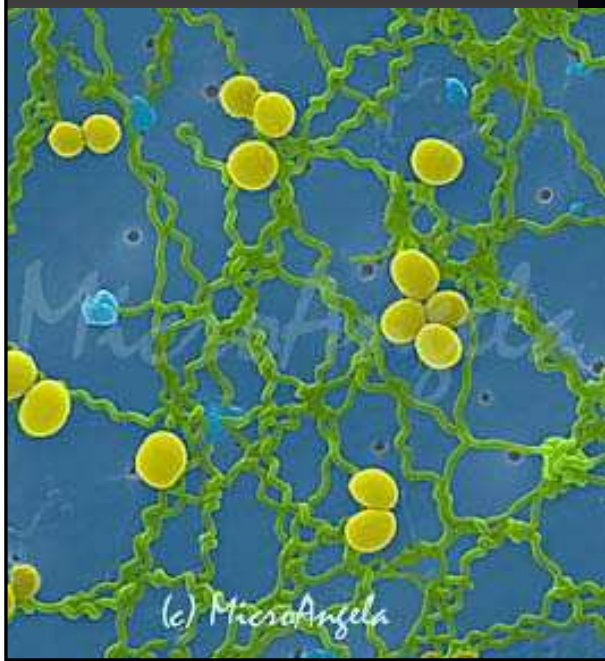
Příběh třetí

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 si hleďte zapamatovat aspoň je 😊)

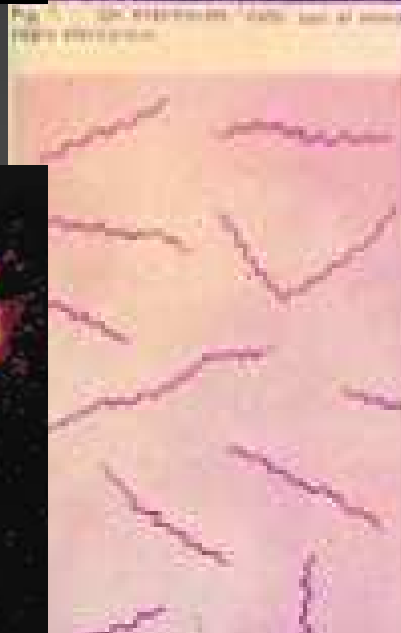
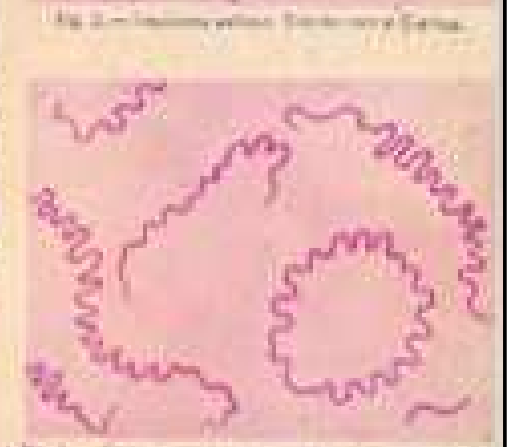
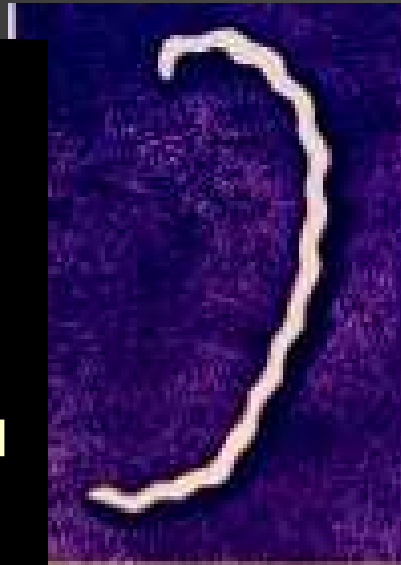
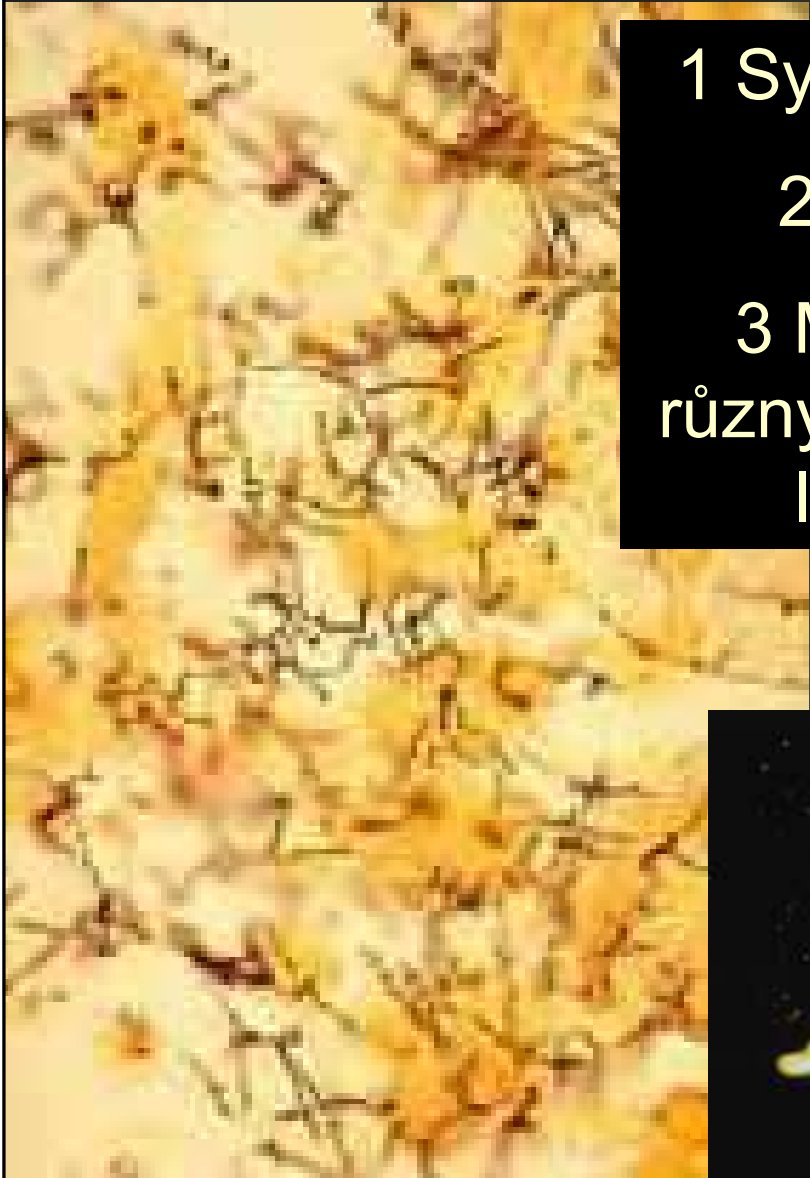


Defilé zločinců: Spirochety

1 Syfilis ve tkáni

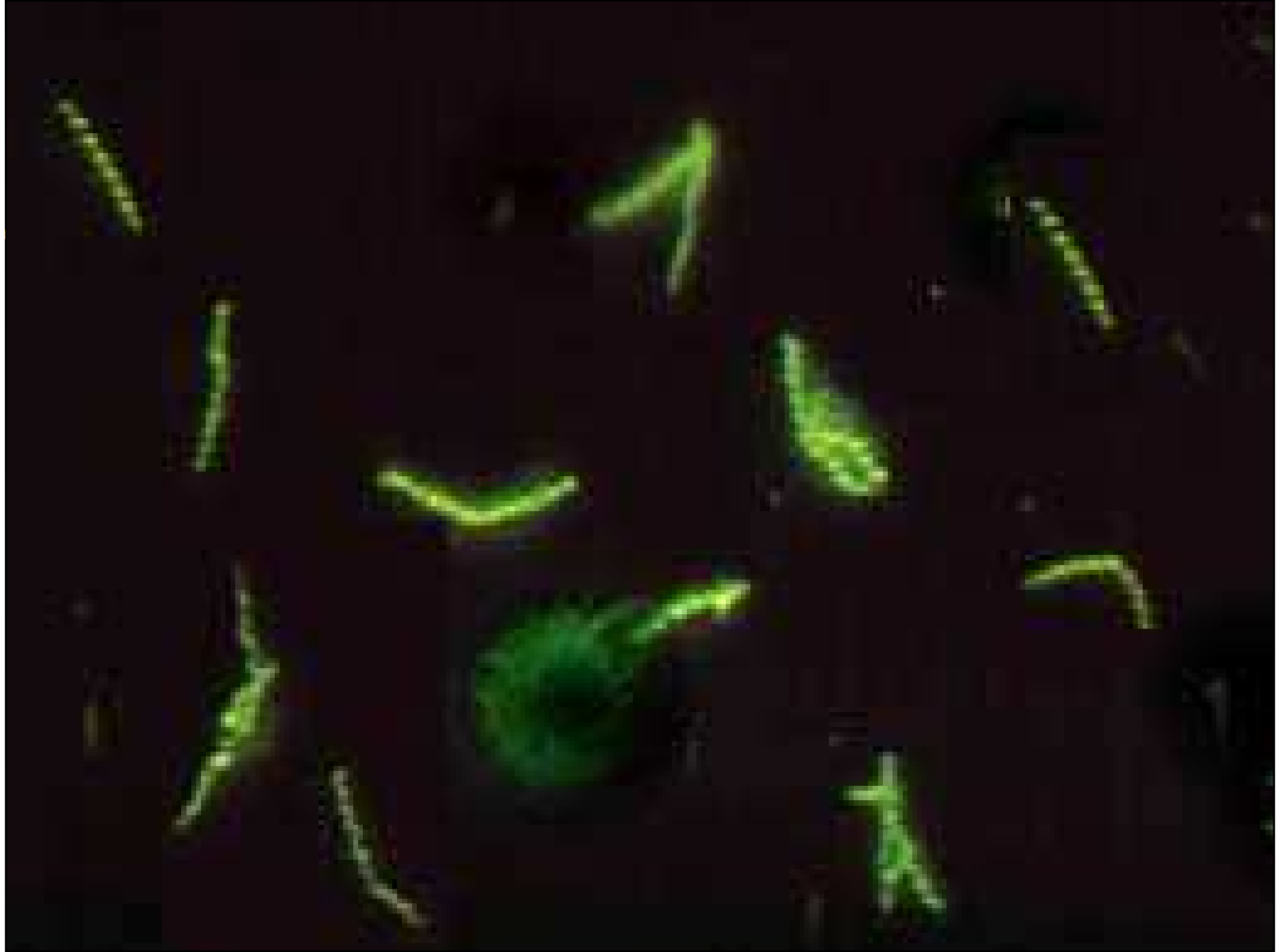
2 Borrelie

3 Morfologie
různých serovarů
leptospir



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 nepřímých

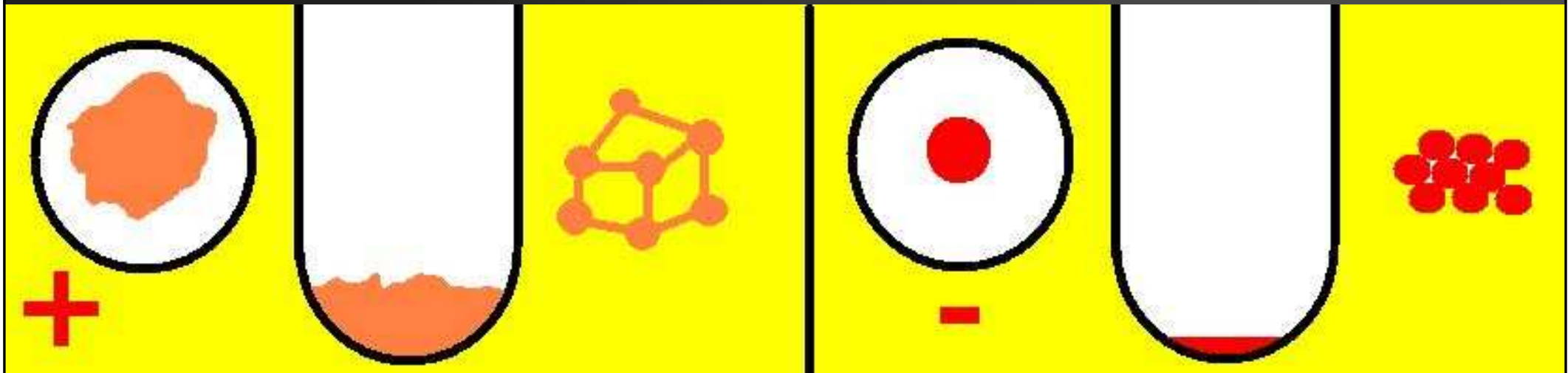
testů na lues

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		
<i>Historický, popř. superkonfirmace</i>	<i>TPIT (Treponema Pallidum Imobilizační Test) = Nelson</i>	

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)

Pozitivní kontrola (různá míra positivity)

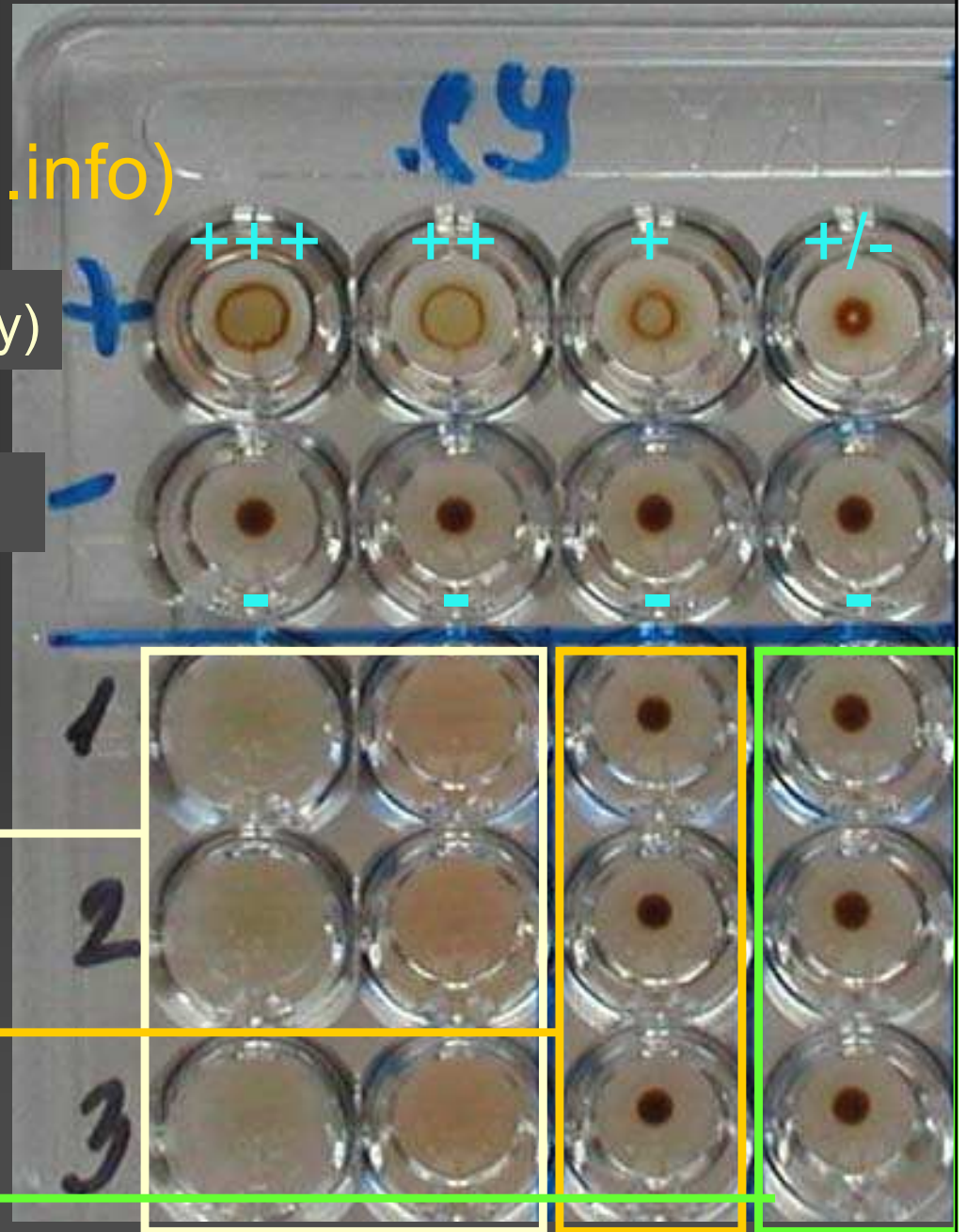
Negativní kontrola

Pacienti (1, 2, 3)

Technické důlky

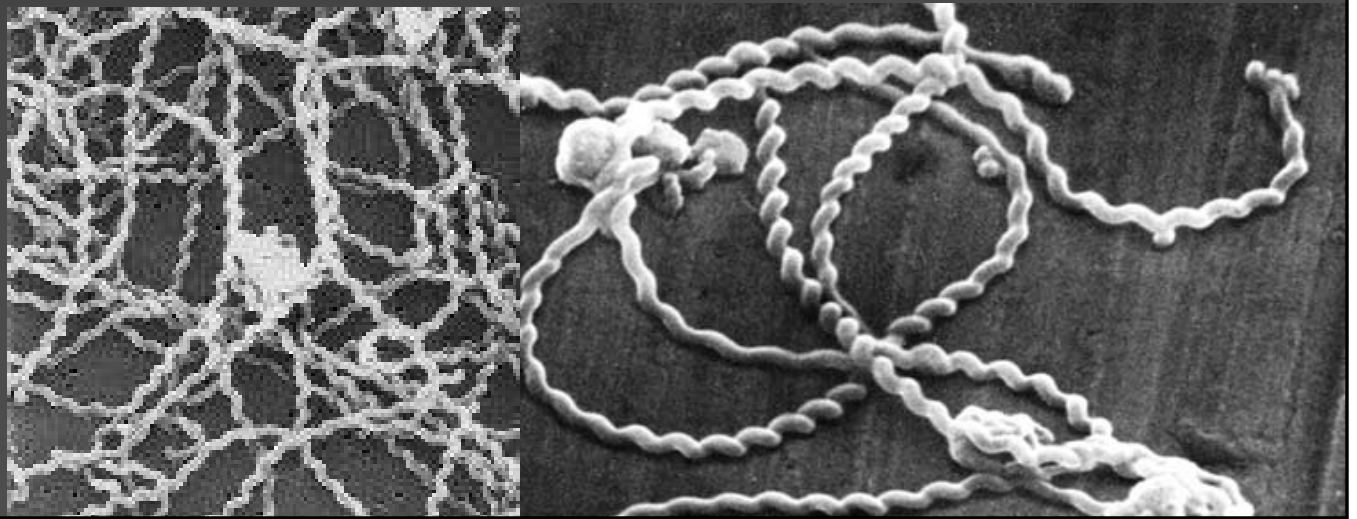
Vlastní reakce

Kontrola



Borrelie a leptospiry – průběh pátrání

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



Úkol 1: ELISA – borrelie

- Odečtěte výsledky reakce ELISA.
- Pozitivní jsou pacienti s hodnotami vyššími, než je hodnota v kalibračním důlku. Ten je umístěn v poloze A1. B1 a C1 jsou kontroly.
- Reakce pacienta č. 1 je v důlku D1, č.2 – E1, č. 3 – F1, č. 4 – G1, č. 5 – H1, č. 6 – A2 atd.
- Uvědomte si, jaký význam mají protilátky IgM a jaký protilátky IgG
- Prověřte alespoň prvních třináct pacientů

Úkol 2: Borrelie – konfirmace 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 (názvy specifických pruhů jsou na šabloně v šedém obdélníku)

Úkol 3: Borrelie – PCR

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

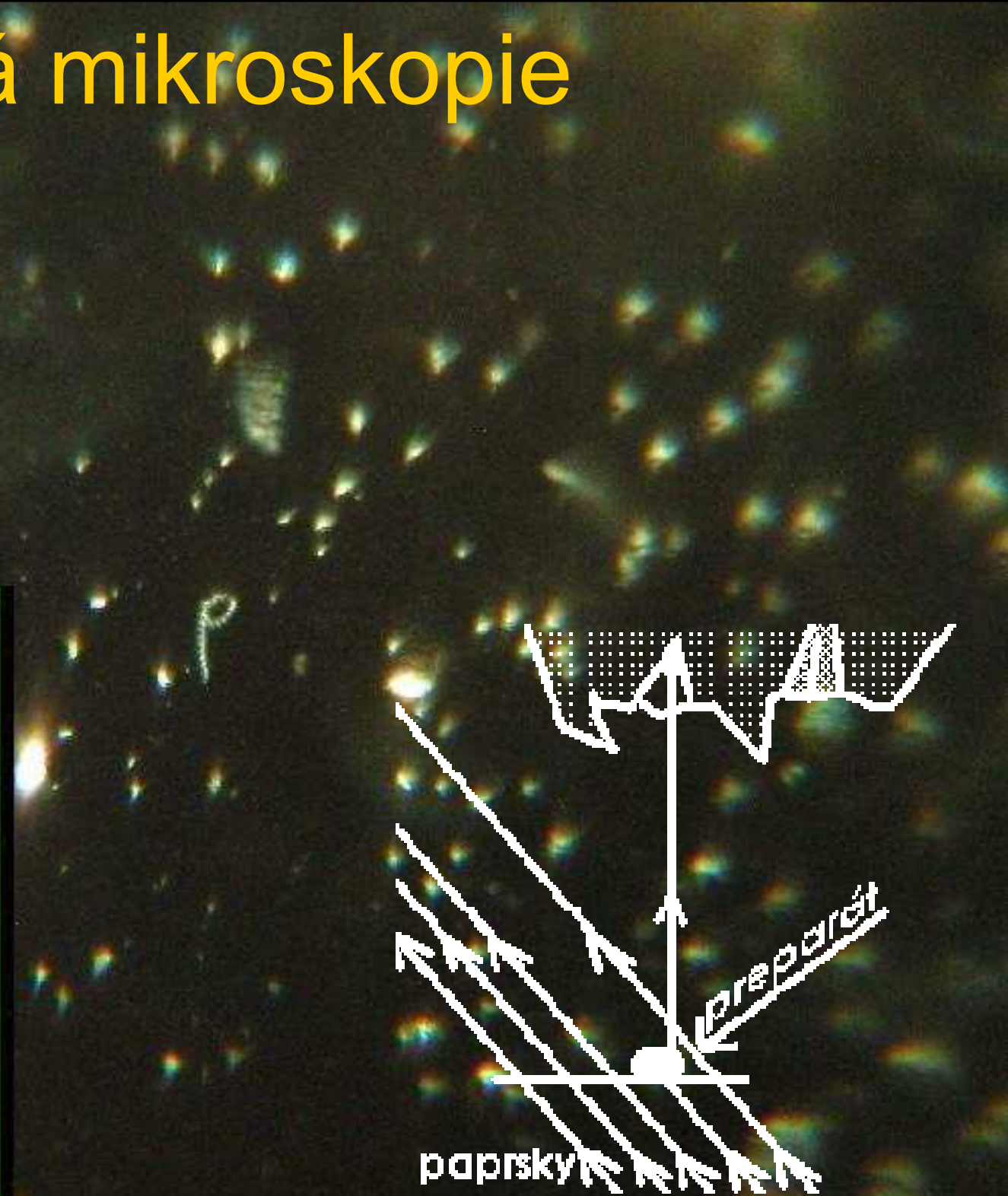
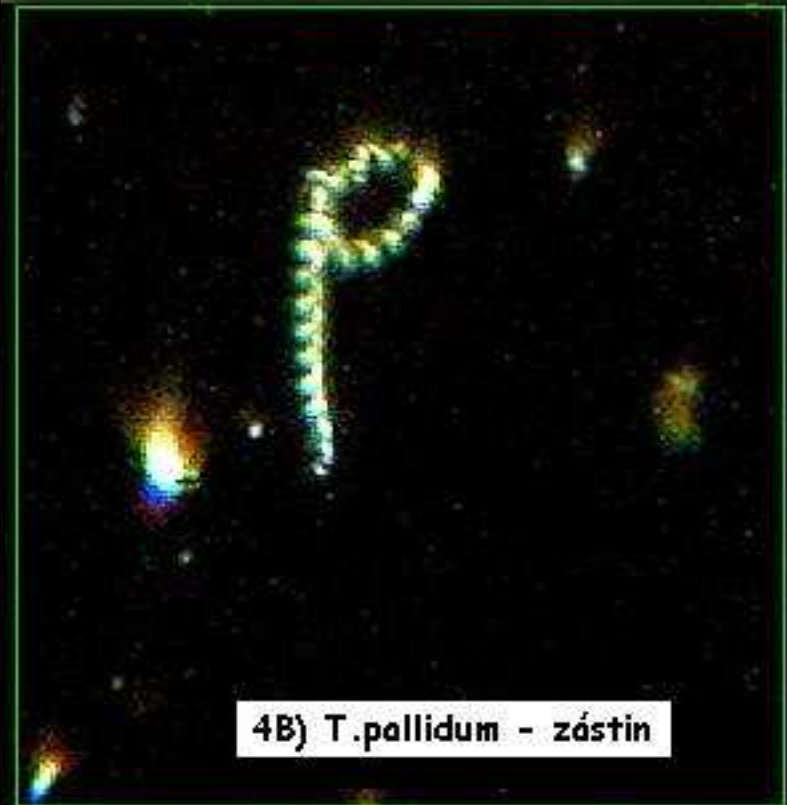
Úkol 4 a b c – přímý průkaz syfilis

- **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

4a New Zealand Rabbit



4b Zástinová mikroskopie



4c Immunofluorescence



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

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

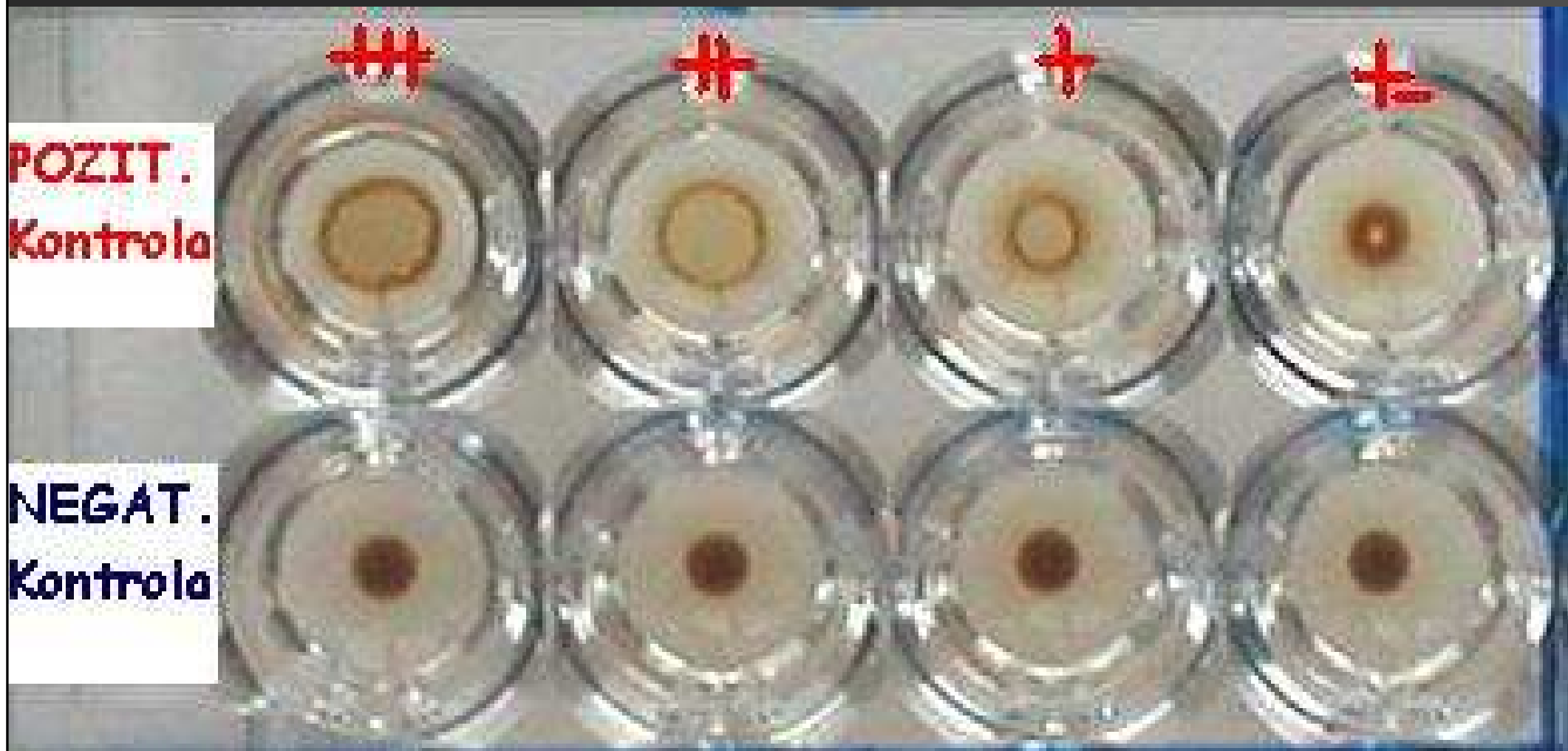
- V úkolu 5 vybereme ze screeningových pacientů ty, které je třeba konfirmovat
- V úkolu 6 potvrdíme jejich diagnózu a učiníme konečný závěr
- Pracujeme s pěticí pacientů:
 - A = těhotná žena
 - B = pacient s hojící se ulcerací na glans penis
 - C = kontakt pacienta s ulcerací (B)
 - D = žena s projevy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

RRR a TPHA

- U **RRR** je pozitivní důlek se zákallem (vypadá podobně jako pozitivní kontrola). Panelem moc netřepete a nenaklánějte, ať si to neroztřepete a ať vám to nevyteče!
- **TPHA** máme bohužel k dispozici jen jako demonstraci. Prohlédněte si panel na bočním stole. Výsledky pacientů A, B, C, D, E vám sdělí asistent

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

TPHA – hodnocení:



Výsledky - screening

Proto
provedeme
konfirmasi...

Vz.	RRR	TPHA	závěr
A	+		
B	0		
C	0		
D	+		
E	0		

*Výsledky
provedeme

Konfirmační reakce

- Hodnocení ELISA reakce: Vzorec na papíře je správný, ale možná zbytečně složitý. Lze si také pamatovat toto:
 - Hodnoty vyšší než $0,505 + 10\%$ ($= 0,5555$) jsou pozitivní
 - Hodnoty nižší než $0,505 - 10\%$ ($= 0,4545$) jsou negativní
 - Hodoty mezi $0,4545$ a $0,5555$ jsou hraniční
- Western blot – viz další obrazovka

Jak hodnotit Western blot – zjednodušení pro praktikum

(Musel jsem to zjednodušit, na kopiích je to špatně vidět)

- Podívejte se na šablonu pro IgG. Jsou na ní **čtyři výrazné pruhy**
- Za pozitivní v IgG i v IgM považujte všechny pásky, na kterých najdete aspoň tři z těchto proužků (ani nemusí být tak výrazné).
- Normálně se hodnotí takto:
- Srovnává se intenzita pruhů na posuzovaném blotu s intenzitou pruhu p47 na stejném proužku (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

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*

Žádní falešní losi.



Jedině

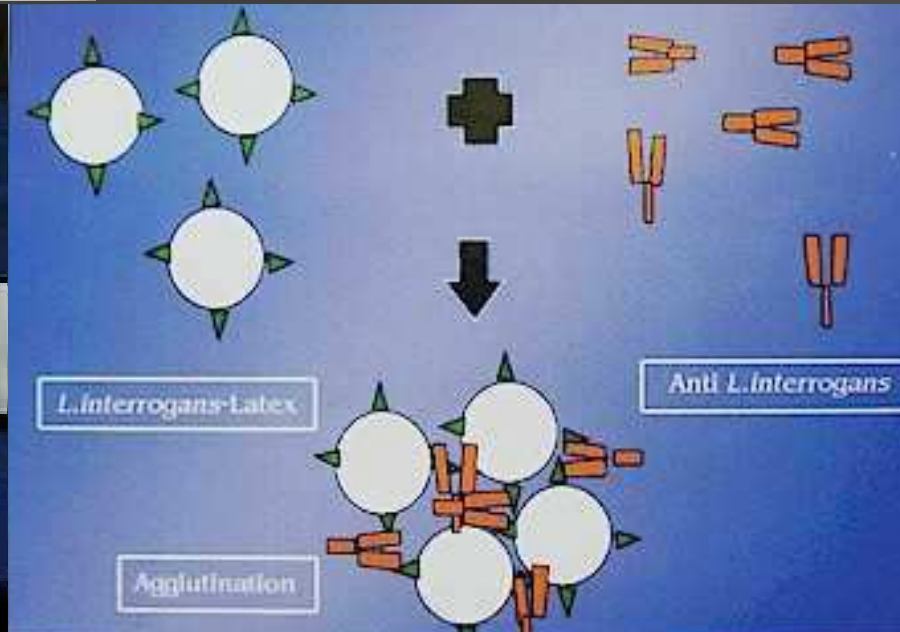
Treponema pallidum

pravou syfilis vám přináší

Leptospira v elektronovém mikroskopu



Další diagnostické možnosti u leptospir (latexová aglutinace)



Úkol 7 – diagnostika leptospir

- Prohlédněte si
obrázek a
obkreslete jej

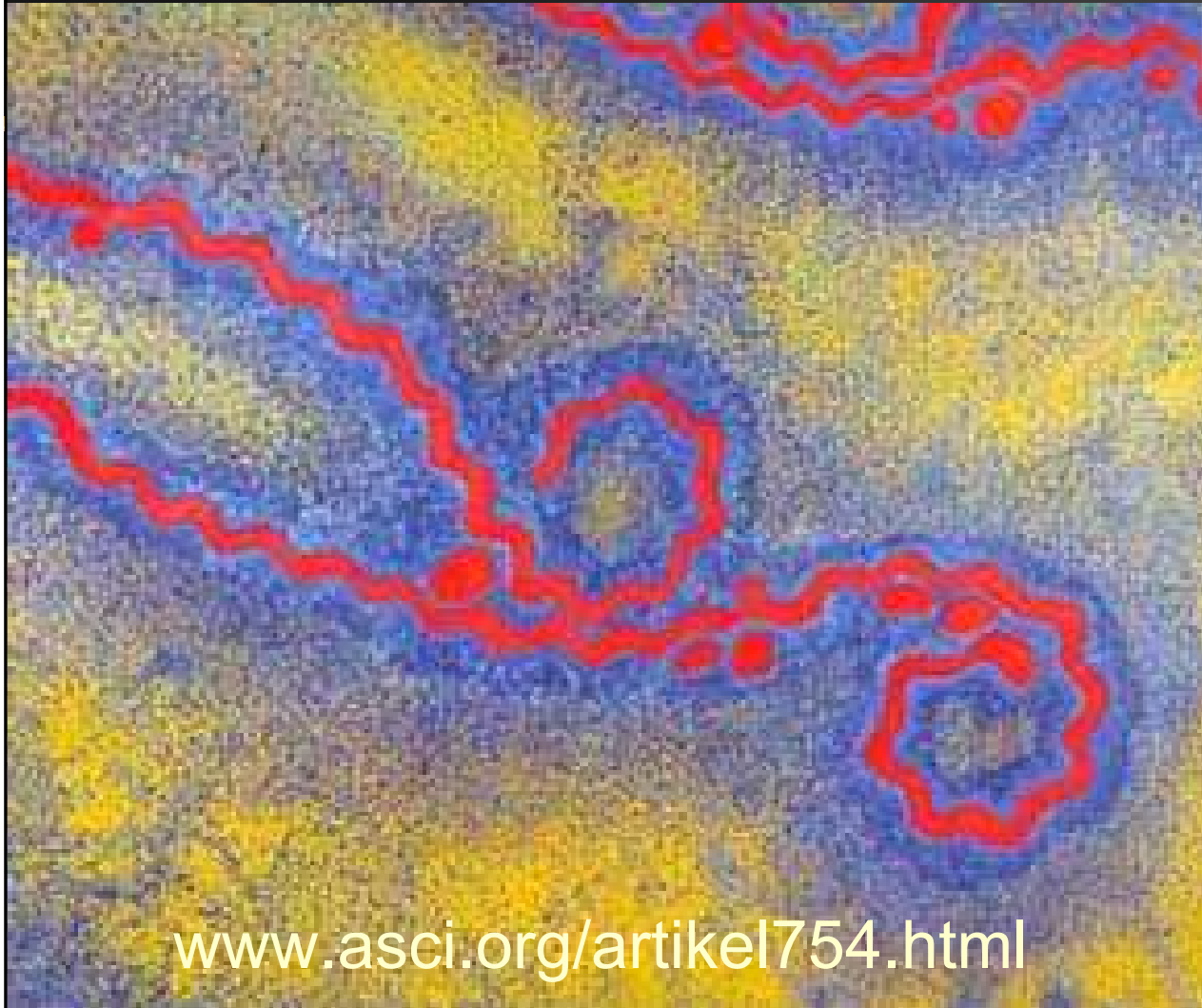




Než opustíte
praktikárnu...

...pláště laskavě nepohazujte po
praktikárně, nýbrž je pověste na
věšák tak, aby nespadly.

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_ictérico.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.