

P09

Spirochety

# Opakování

- Co obsahuje buněčná stěna mykobakterií?

Mykolové kyseliny, proto je hydrofobní

- Jaké jsou tvarové možnosti bakterií?

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

- Na kterých půdách se pěstují mykobakteria?

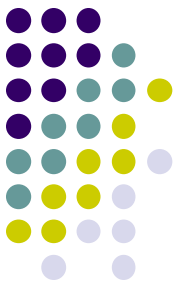
Šula, Banič, Ogawa, Löwenstein-Jenssen

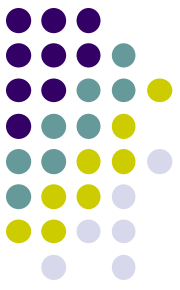
- Co se musí učinit před kultivací mykobakterií?

Mořit louhem, abys se odstranily jiné mikroby

- Které jsou kroky Ziehl-Neelsenova barvení?

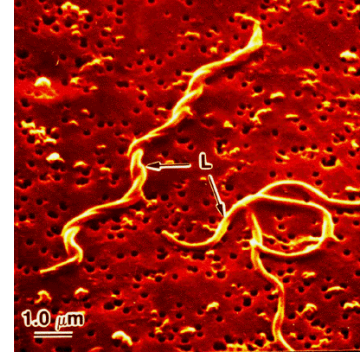
1. Gabbet zahorka, 2. kyselý alkohol, 3. pozadí





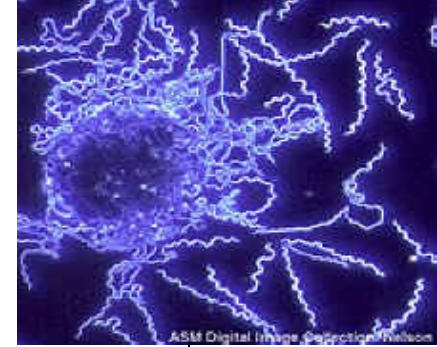
- Jaké znáte bakteriální původce pohlavně přenosných chorob?
- *N. gonorrhoeae*, *H. ducreyi*
- Který bakteriální původce meningitid je schopen se vyskytovat epidemicky?
- *N. meningitidis*
- Které protilátky (Ig) mohou procházet přes placentu?
- IgG
- Záchyt jakých protilátek značí právě probíhající onemocnění?
- IgM
- Je lepší použít metodu přímou nebo nepřímou?
- pokud to jde, tak vždy volit metodu přímou

# Spirochety



- Rod *Borrelia*, *Treponema*, *Leptospira*
- Spirální bakterie, pohyblivé pomocí intracelulárních bičíků
- Jejich buněčná stěna je blízká gramnegativní, ale podle Grama se nebarví
- Mikroskopovat je lze pouze pomocí zástinu, fluorescence anebo imunofluorescence
- Spirochety se obecně prakticky nedají kultivovat

# Borrelie



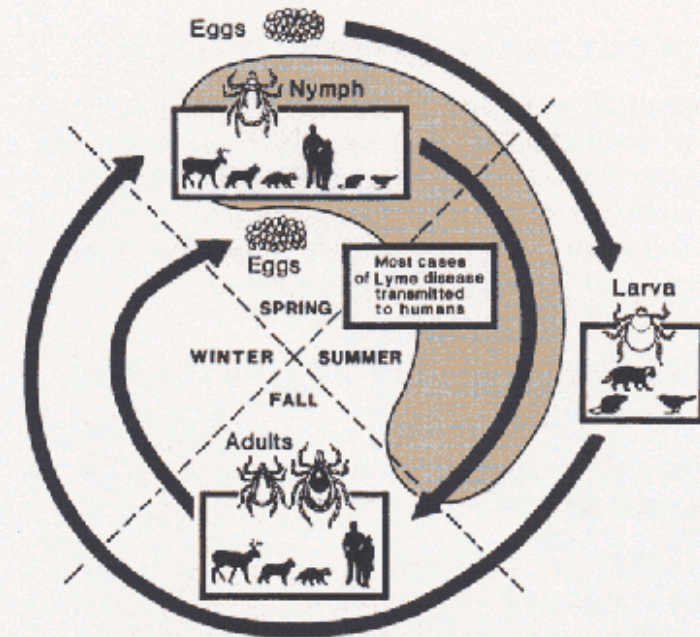
- Původci lymské boreliózy (*Borrelia burgdorferi* sensu lato)
  - *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (postižení kloubů a myokardu)
  - *B. afzelii* (kožní příznaky)
  - *B. garinii* (neuroborelióza)
  - *B. lusitaniae*, *B. japonica*, *B. bissetti*
- Původci návratných horeček (*B. recurrentis*, *B. duttoni*, *B. hermsii*)



# Lymeská borelióza

- Zoonóza
- Přenos členovci, především klíšťaty ( u nás *Ixodes ricinus*)
- Vakcína není k dispozici
- Protilátky nalézáme u 10 % zdravých osob
- Lék volby: peniciliny, tetracykliny

Life cycle of Lyme disease ticks



# Infekce probíhá ve 3 fázích:

## ➤ Časně lokalizované st.

- *erythema migrans*
- nespecifické příznaky

## ➤ Časně disseminované st.

- borreliový lymfocytom
- neurologické, revmatologické či kardiální projevy

## ➤ Pozdní st.

- *acrodermatitis chronica atrophicans*  
(končetiny, trup, obličej)





# Průkaz

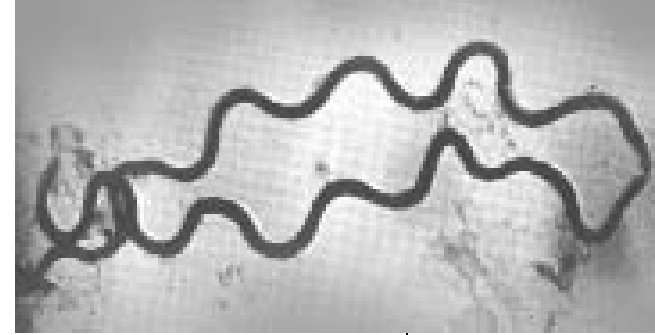


## ➤ Borrelie:

- Především sérologie, popř. PCR
- Sérologii se stanovují IgM (svědčí pro časnou infekci) a IgG protilátky metodou ELISA
- Pozitivní nálezy se ověřuje Western blotem, ten je specifičtější metodou



# *Treponema pallidum*



- Původce syfilis (poddruh *T. pallidum* subsp. *pallidum*)
- 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. pallidum* subsp. *pertenue*)
- Některá treponemata jsou i nepatogenní- na sliznicích dutiny ústní a genitálu

# Průběh syfilis



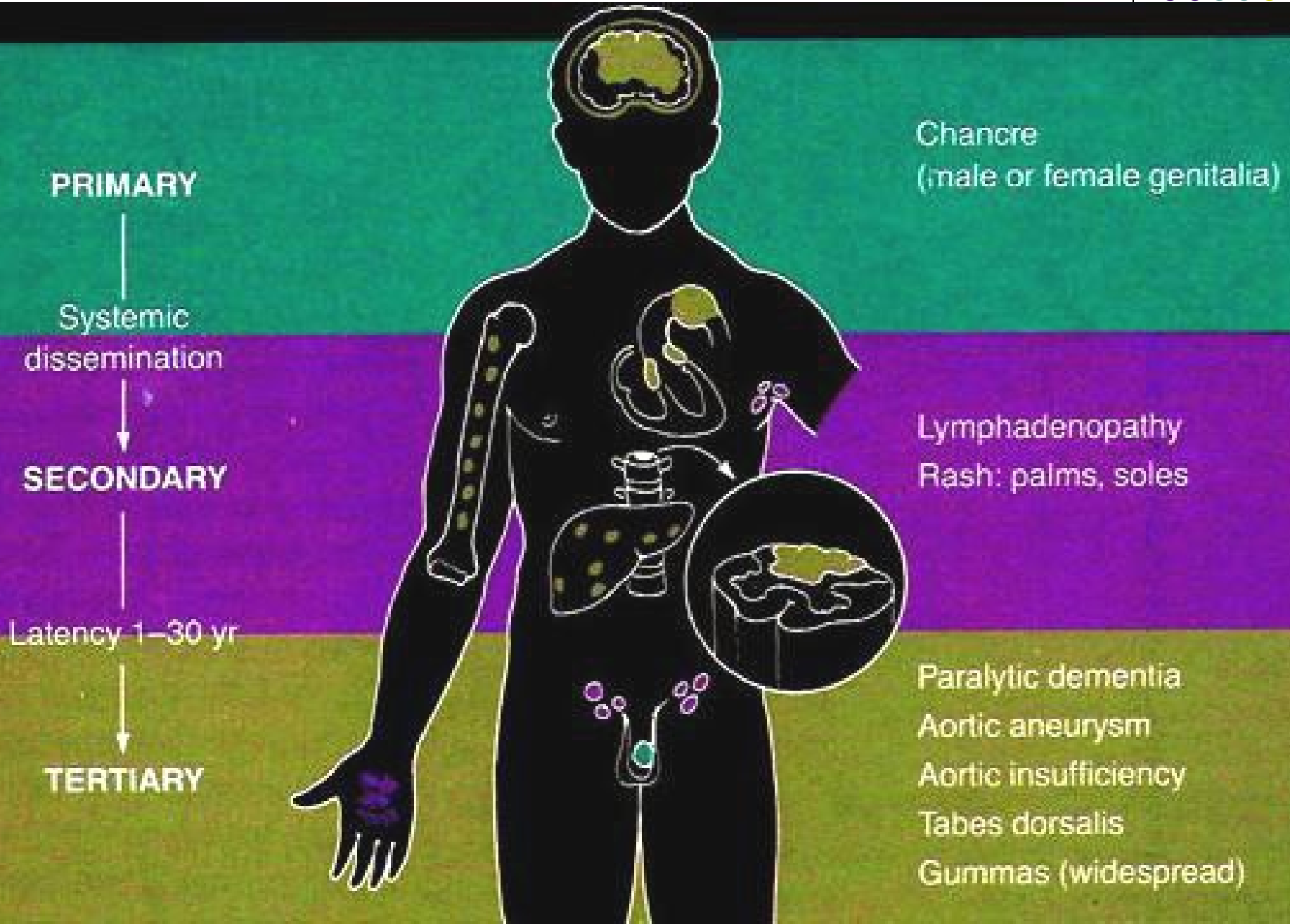
## ➤ Časná syfilis

- Primární syfilis (ulcerace na genitálu- tvrdý vřed)
- Sekundární syfilis (diseminace, nespecifické symptomy, generalizovaná vyrážka, condylomata lata)
- Časná latentní syfilis (asymptomatická, relapsy sekundární fáze)

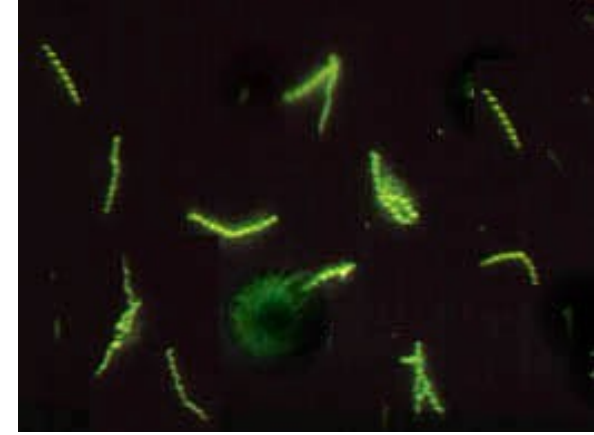
## ➤ Pozdní syfilis

- Latentní syfilis (cca 10-20 let)
- Terciární syfilis (gummata, kardiovaskulární lues, neurosyfilis)

## ➤ Vrozená syfilis



# Treponemata: přímý průkaz



- Přímý průkaz se dělá zřídka
- Mikroskopie: Používá se nativní preparát – zástin, 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: nepřímý průkaz



- Používají se **netreponemové testy**, kde antigenem je zpravidla kardiolipin a **treponemové testy**, kde antigen je získán opravdu z *Treponema pallidum*
- Diagnostika se skládá ze screeningu a confirmace. 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, **confirmace** se provádí pomocí velmi spolehlivých treponemových testů
- Indikací ke confirmaci je:
  - 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

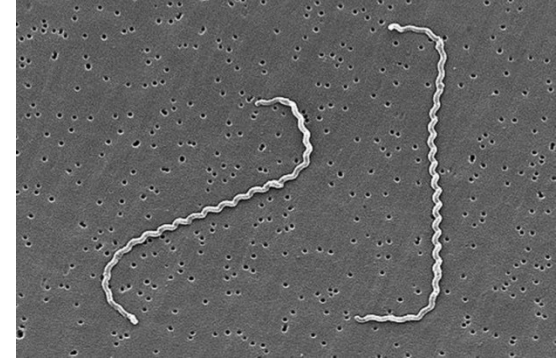
# Přehled nejdůležitějších nepřímých testů na lues



Historický	BWR – Bordet Wassermann	Netr.
Screeningové	RRR – Rapid Reagin Test	
	TPHA	Treponemové
Konfirmační	ELISA	
	FTA-ABS (nepř. imunofluorescence)	
	Western Blot	

TPHA – *T. pallidum* pasivní hemaglutinační test

# Rod *Leptospira*



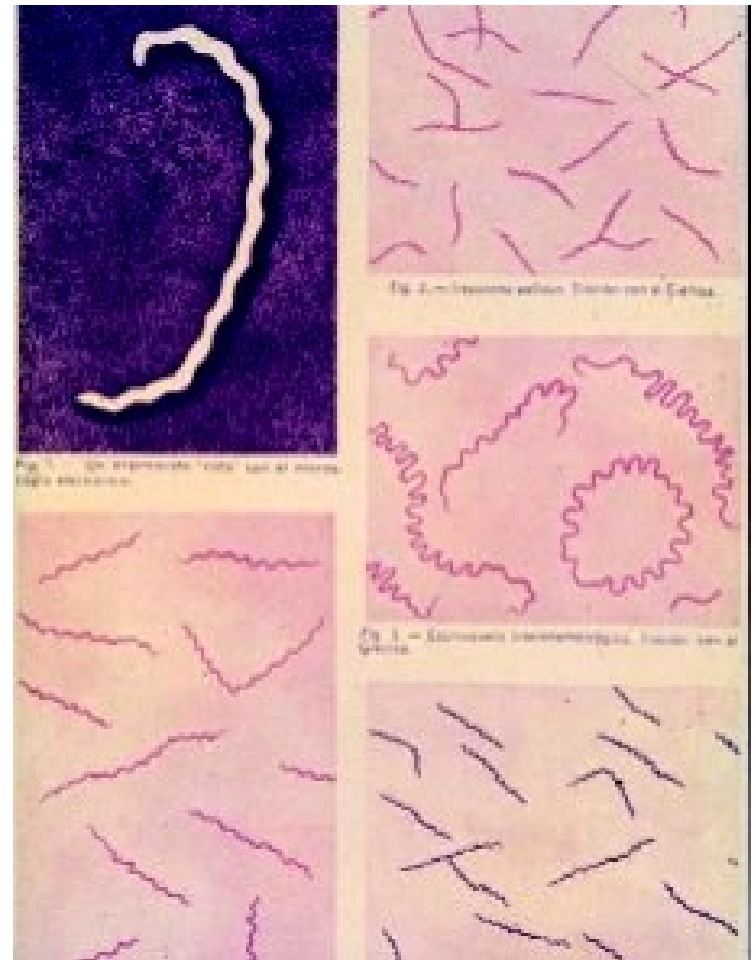
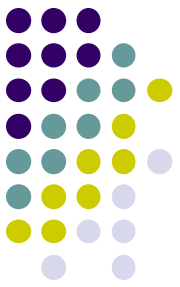
- Jemné pravidelné závity, na koncích háčkovitě ohnuté
- Komplikovaná taxonomie- dnes dělení na 17 genomospecies, původně na 2 druhy
- Dříve se jednotlivé serovary leptospir považovaly za samostatné druhy, nyní se všechny patogenní považují za součást druhu *Leptospira interrogans* (druhý druh *Leptospira biflexa* je nepatogenní)
- Způsobují zoonózy- tzv. leptospirózy, člověk se nakazí kontaktem s močí infikovaného zvířete (myšovití hlodavci, prase, skot)- koupání, konzumací kontaminované vody či potravy
- Příznaky mohou být různé, od „chřipkotyfových“ příznaků serovaru **Grippotyphosa** (blat'ácká horečka) až po žloutenku a krvácivé stavy (**Weilova choroba**) serovaru **Ictero-hemorrhagiae**



# Průkaz

## ➤ Leptospiry:

- Používá se zástinová mikroskopie a kultivace ve speciálním médiu



# Borreliie: úvod k úkolům 1 až 3



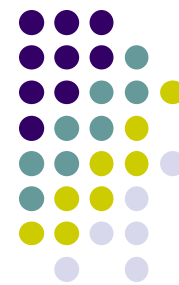
- Máme pět pacientů, kteří z různých důvodů přicházejí k vyšetření na borreliózu.
  - **Pacient J:** klinicky definované erythema migrans (jasný obraz, ne jen podezření)
  - **Pacient K:** cítí se ospalý, v létě měl klíště; jiné potíže nejsou přítomny
  - **Pacient L:** neurologové našli typické klinické 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 to jasné

# Úkol 1: ELISA – Borrelia



- Průkaz protilátek proti *Borellia garinii*
- Máte k dispozici výsledky reakce ELISA ve formě hodnot absorbance
- Pozitivní jsou pacienti s hodnotami vyššími nežli hodnota v kalibračním důlku (CAL). Ten se nachází v pozici A1, B1 a C1 jsou kontroly
- Prověřte výsledky pacientů J, K, L, M, N ve třídách IgG i IgM

# Pacienti – ELISA, jak jdou po sobě jednotlivá čísla pacientů:



## IgM

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

## IgG

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

# Úkol 2: Borrelie – confirmace WB

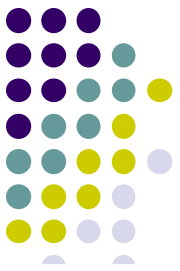


- Konfirmují se pouze pacienti pozitivní v reakci ELISA, nebo indikovaní z klinických důvodů. V našem případě jsou to však všichni pacienti J, K, L, M, N (všichni byli v reakci ELISA pozitivní, s výjimkou pacienta J, který však má erythema migrans, takže je bez ohledu na negativitu ELISA indikován ke konfirmaci).
- Pozitivita WB je definována následovně:
  - u IgM považuje pozitivita v pruhu p 25, OspC
  - u IgG považuje pozitivita v pruhu VlsE
- Odečtete tedy výsledky IgG i IgM u našich pacientů.

# Úkol 3: Borrelie – PCR



- PCR je reakce přímého průkazu, je tedy **průkaznější** než hledání protilátek, zvláště u čerstvé infekce
- K reakci PCR jsou indikováni z našich pacientů pouze **pacienti L a N.**
- Zjistěte, který pacient je pozitivní
- Pozitivita = svítí proužek detekované reakce
- Interní kontroly tentokrát nebyly použity
- Úplně vpravo je ladder (hmotnostní měřítko)



# Závěr k úkolům 1 až 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



- 4a- z etických důvodů i z důvodu pracnosti se použití RIT minimalizuje. Proto ani nemáme k dispozici obrázky výsledků tohoto testu
- 4b- mikroskopie v zástinu – prohlédněte si obrázky a obkreslete si je do protokolu (princip i vzhled *Treponema pallidum*)
- 4c- přímá IMF – prohlédněte si ještě další obrázek a zakreslete výsledek přímé imunofluorescence

# 4a New Zealand Rabbit



# 4b Zástinová mikroskopie

\*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)



4B) T.pallidum - zástin

The image shows a dark field micrograph of a Treponema pallidum bacterium. The bacterium is a long, thin, spiral-shaped organism with a distinct hook-like end. It is illuminated from the side, causing it to glow with a bright, multi-colored light (primarily green and blue) against a dark background. The background is filled with numerous smaller, out-of-focus light spots, which are other bacteria or debris in the field of view.

# 4c Imunofluorescence



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

# Úkoly 5 a 6: Serologie syfilis (screening a konfirmace )



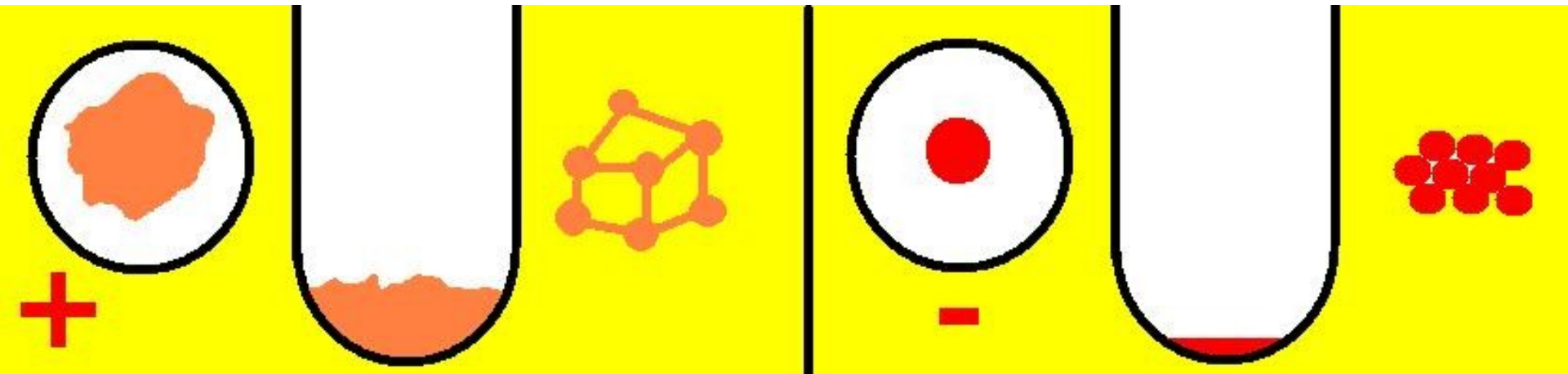
- V úkolu 5 vybereme ze screeningových pacientů ty, které je třeba konfirmovat
- V úkolu 6 potvrdíme jejich diagnózu a učiníme konečný závěr
- Pracujeme s pěticí pacientů:
  - A = těhotná žena (běžný screening, není zvýšené riziko syfilis)
  - B = pacient s dva dny trvající lézí, která vypadá jako ulcus durum
  - C = pacient se suspektní lues latens
  - D = dárce krve (pouhý screening)
  - E = dítě s pravděpodobnou vrozenou syfilis

# Úkol 5: RRR a TPHA



- U **RRR** je pozitivní důlek se zákalem (vypadá podobně jako pozitivní kontrola)
- **TPHA**: Prohlédněte si panel na bočním stole. Vyhodnocení pacientů A, B, C, D, E proveďte dle obrázku na následující obrazovce

# TPHA



- Pozitivní – vzniká aglutinát, při pohledu shora chuchvalec nepravidelného tvaru
- Negativní – klesají na dno a vytvářejí denzní pravidelnou kulatou tečku při pohledu shora



# Připomenutí TPHA

Pozitivní kontrola (různá míra positivity)

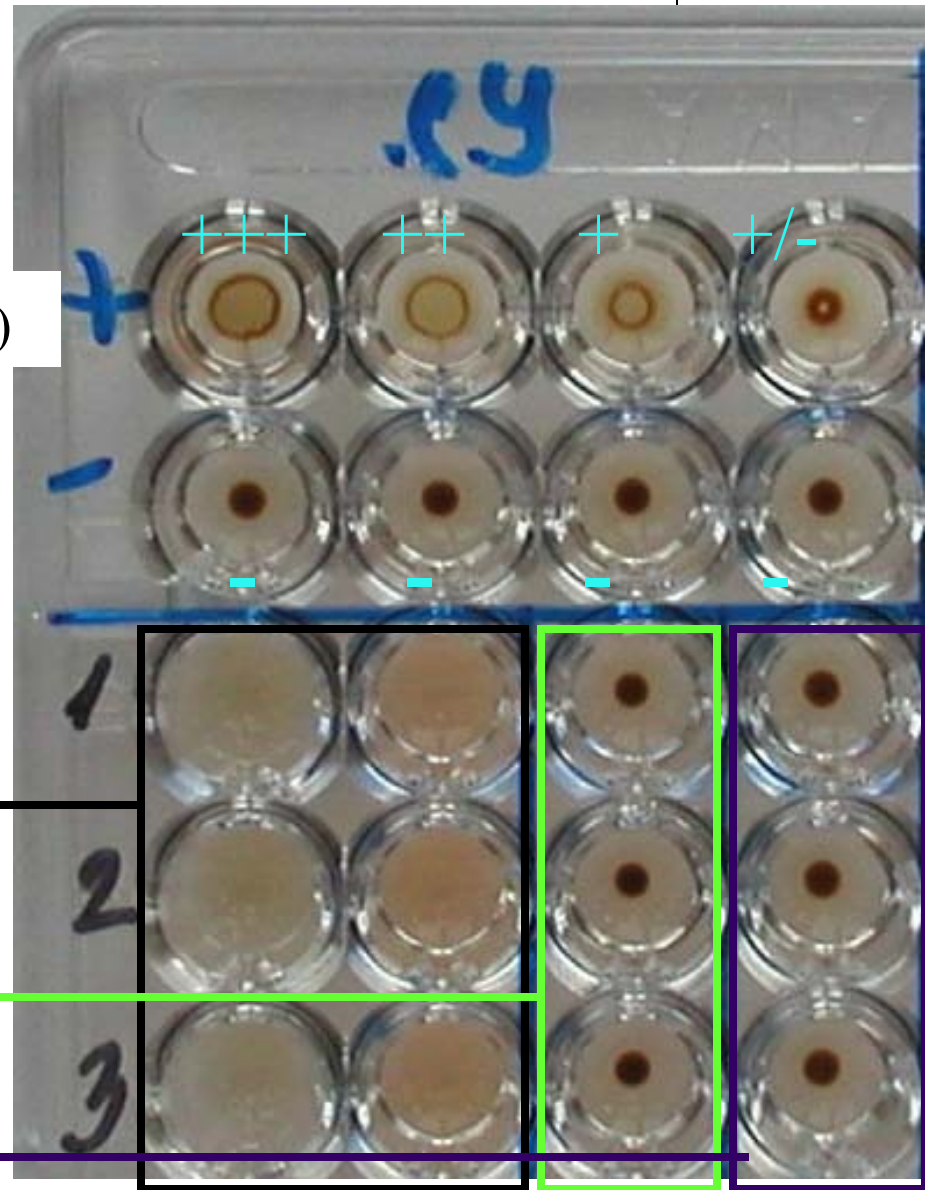
Negativní kontrola

Pacienti (1, 2, 3)

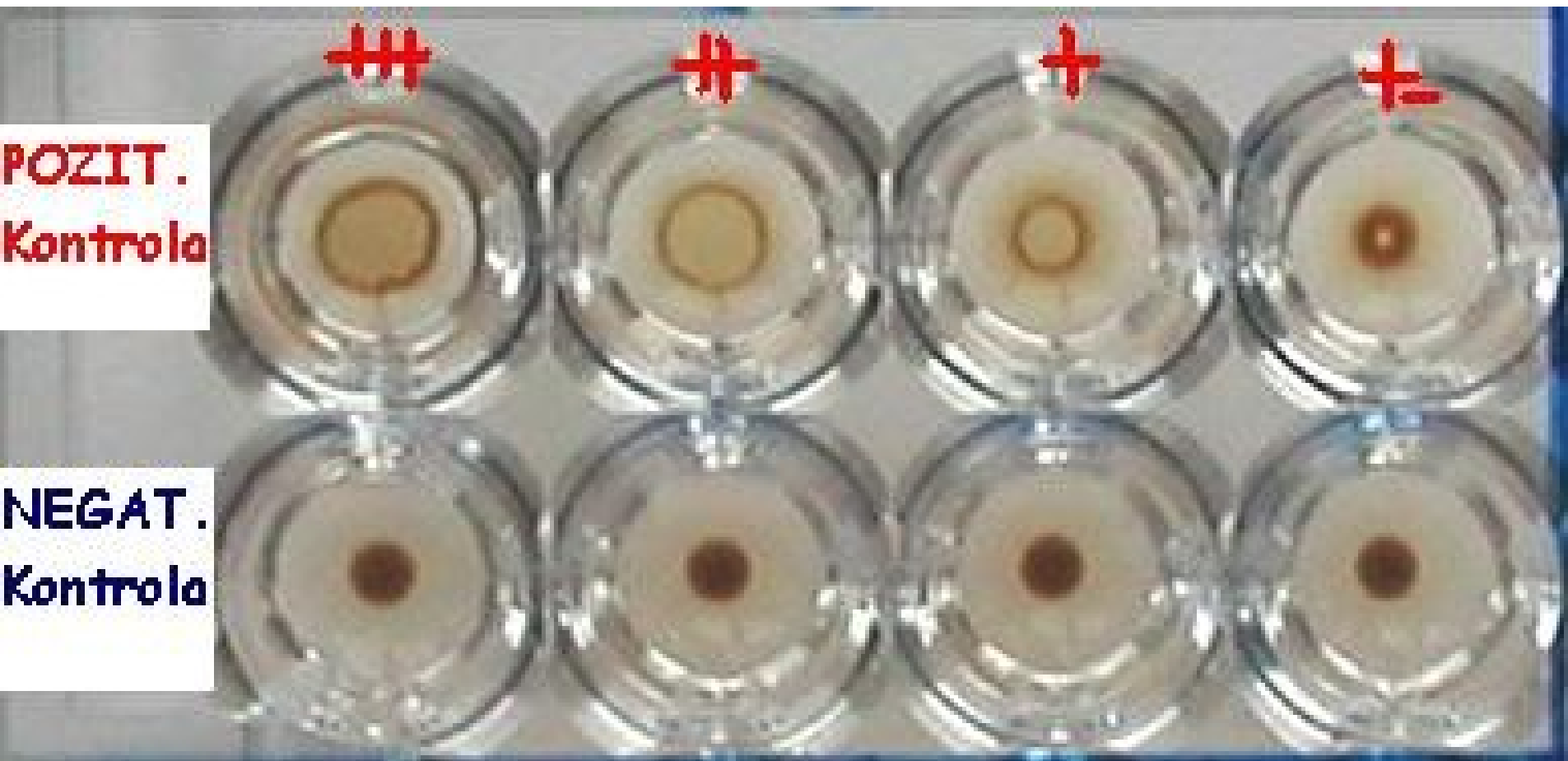
Technické důlky

Kontrola

Vlastní reakce



# TPHA – hodnocení:



# Výsledky – screening



	RRR	TPHA	závěr
A	+	0	konfirmasiace
B	0	0	konfirmasiace*
C	0	+++	konfirmasiace
D	0	0	konfirmasiace není nutná
E	+	+++	konfirmasiace

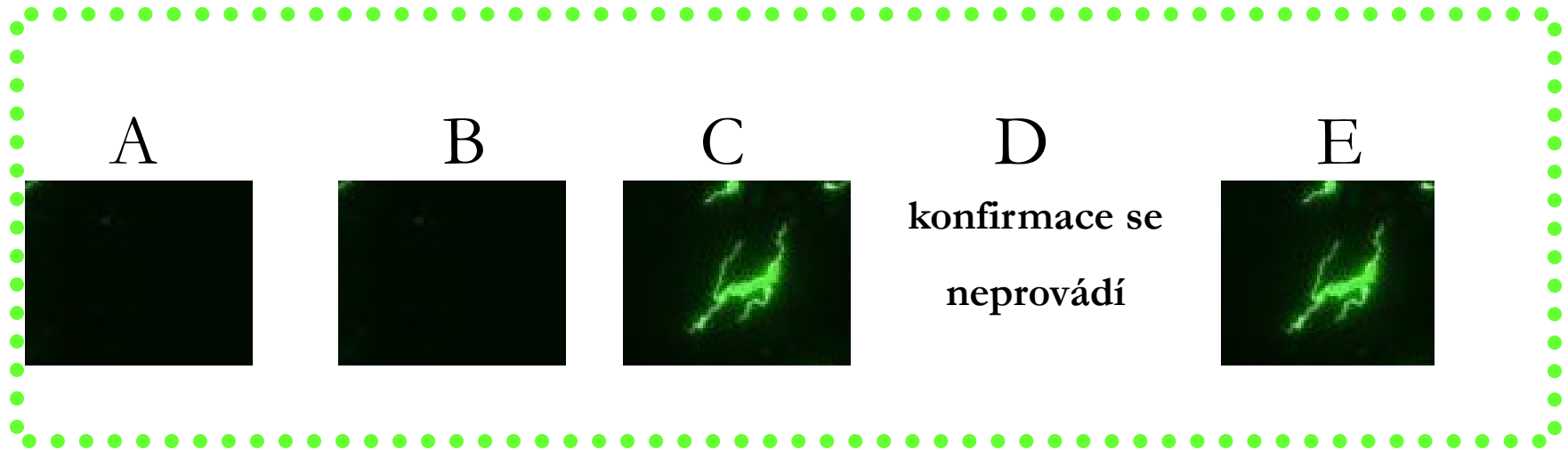
*\*Výsledek je sice negativní, ale konfirmační reakce budou provedeny s ohledem na klinickou situaci*

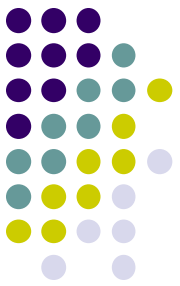
# Úkol 6: Konfirmace syfilis



## Konfirmační reakce I

Výsledky reakce FTA-ABS:





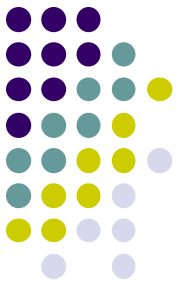
# Konfirmační reakce II

## ➤ Hodnocení ELISA reakce:

- Nejprve spočítejte cut off a nahrad'te otazníky
- **c. o. = (C1 + D1)/2**
- IgG: Hodnoty vyšší než ??? jsou pozitivní
- IgM: Hodnoty vyšší než ??? 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



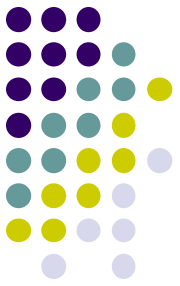
# Konfirmační reakce III

## ➤ Hodnocení ELISA reakce:

- IgG: Hodnoty vyšší než 0,366 jsou pozitivní
- IgM: Hodnoty vyšší než 0,494 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



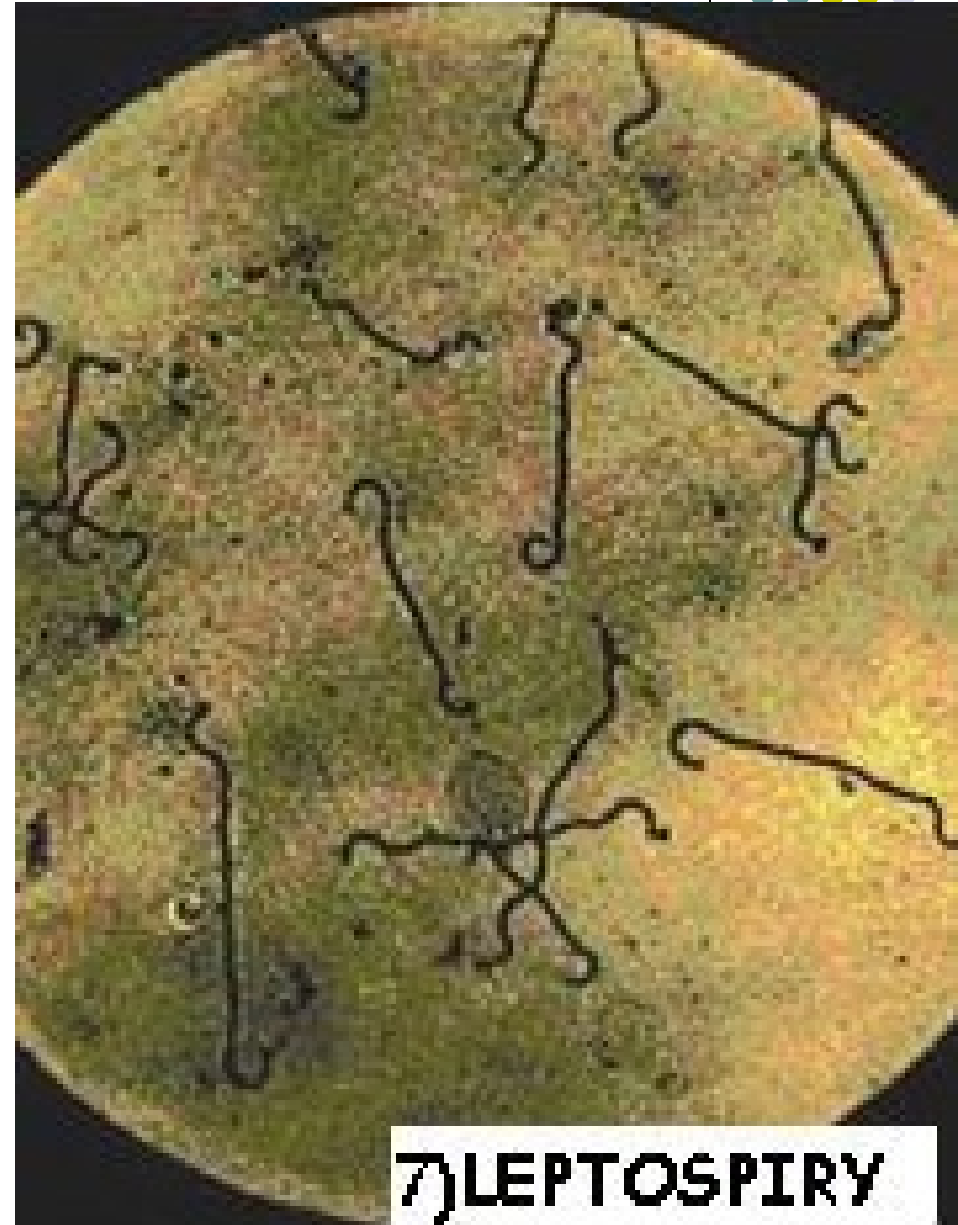
# Výsledky - konfirmace

	FTA- ABS	IgM		IgG		Závěr
		ELISA	WB	ELISA	WB	
A	0	0	0	0	0	Nejde o lues. Asi falešně + (např. po očkování)
B	0	0	0	0	0	PCR nutné. U čerstvé inf. je možná seronegativita
C	+	0	0	+	+	Opravdu jde o lues latens, jak se přepokládalo.
D	konfirmace neprovedena					Dárce je v pořádku
E	+++	+	+	+	+	Jde o kongenitální syfilis. Vyšetříme také krev matky.

# Úkol 7: diagnostika leptospir



- Prohlédněte si obrázek a obkreslete jej



7) LEPTOSPIRY