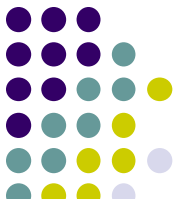


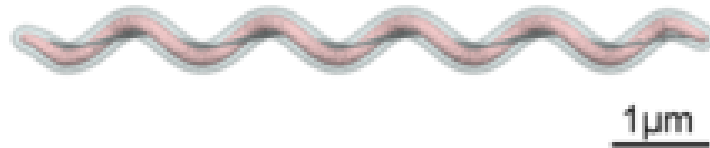
P09

Spirochety

Spirochety



- Rod *Borrelia*, *Treponema*, *Leptospira*
- Spirální bakterie, pohyblivé pomocí intracelulárních bičíků (penetrace tkáněmi, ochrana před fagocyty)



- Jejich buněčná stěna je blízká gramnegativní, ale podle Grama se nebarví
- Mikroskopovat lze pouze pomocí zástinu, fluorescence anebo imunofluorescence
- Spirochety se obecně prakticky nedají kultivovat

Borrelie

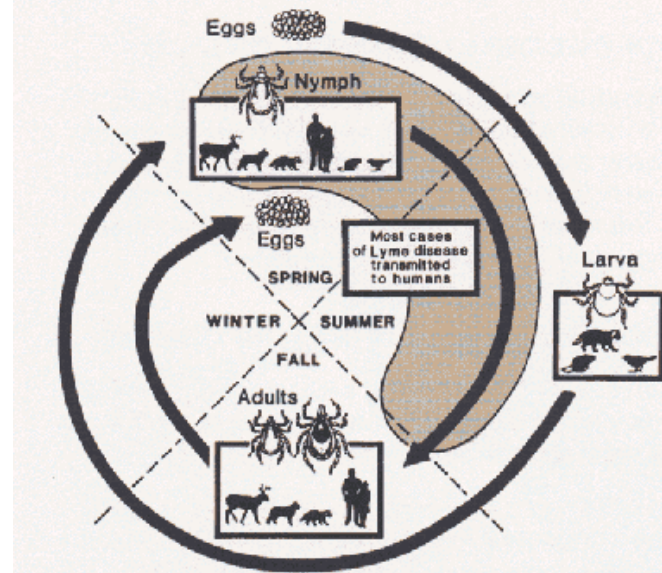


- Původci lymfské boreliózy (*Borrelia burgdorferi* sensu lato)
 - *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (postižení kloubů a myokardu)
 - *B. afzelii* (kožní příznaky)
 - *B. garinii* (neuroborelióza)
 - *B. lusitaniae*, *B. japonica*, *B. bissetti*
- Původci návratných horeček (*B. recurrentis*, *B.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

Lymeská borelióza

- Zoonóza
- Přenos členovci, především klíšťaty (u nás *Ixodes ricinus*)
- Rezervoár: středně velcí a malí savci, hlodavci
- Incidence v ČR: 40-60/100 000 ob.
- Protilátky nalézáme u 10 % zdravých osob
- Prodělané onemocnění chrání jen částečně
- Lék volby: peniciliny, tetracykliny

Life cycle of Lyme disease ticks



Infekce probíhá ve 3 fázích:

➤ Časně lokalizované st.

- *erythema migrans*
- nespecifické příznaky

➤ Časně diseminované st.

- borreliový lymfocytom (nejčastěji na ušních boltcích)
- neurologické, revmatologické či kardiální projevy

➤ Pozdní diseminované st.

- únavnost
- *acrodermatitis chronica atrophicans* - papíroztenčená kůže (končetiny, trup, obličej)
- encefalitida, artritida, kardiomyopatie



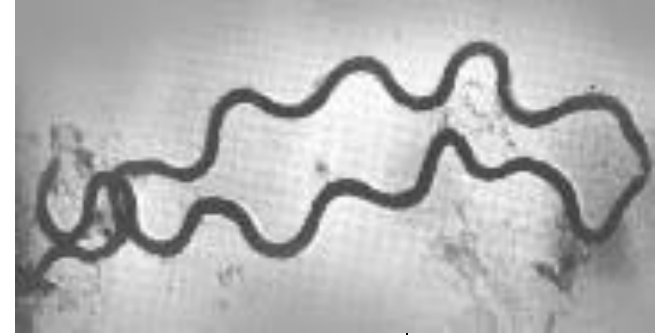
Průkaz



➤ Borrelie:

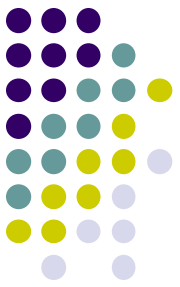
- Především sérologie, popř. PCR
- Sérologii se stanovují IgM (svědčí pro časnou infekci) a IgG protilátky metodou ELISA
- Pozitivní nálezy se ověřuje Western blotem, ten je specifitější metodou

Treponema pallidum



- Původce syfilis (poddruh *T. pallidum* subsp. *pallidum*)
- Syfilis je **klasická pohlavní nemoc**, přenáší se výhradně sexuálně.
- **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



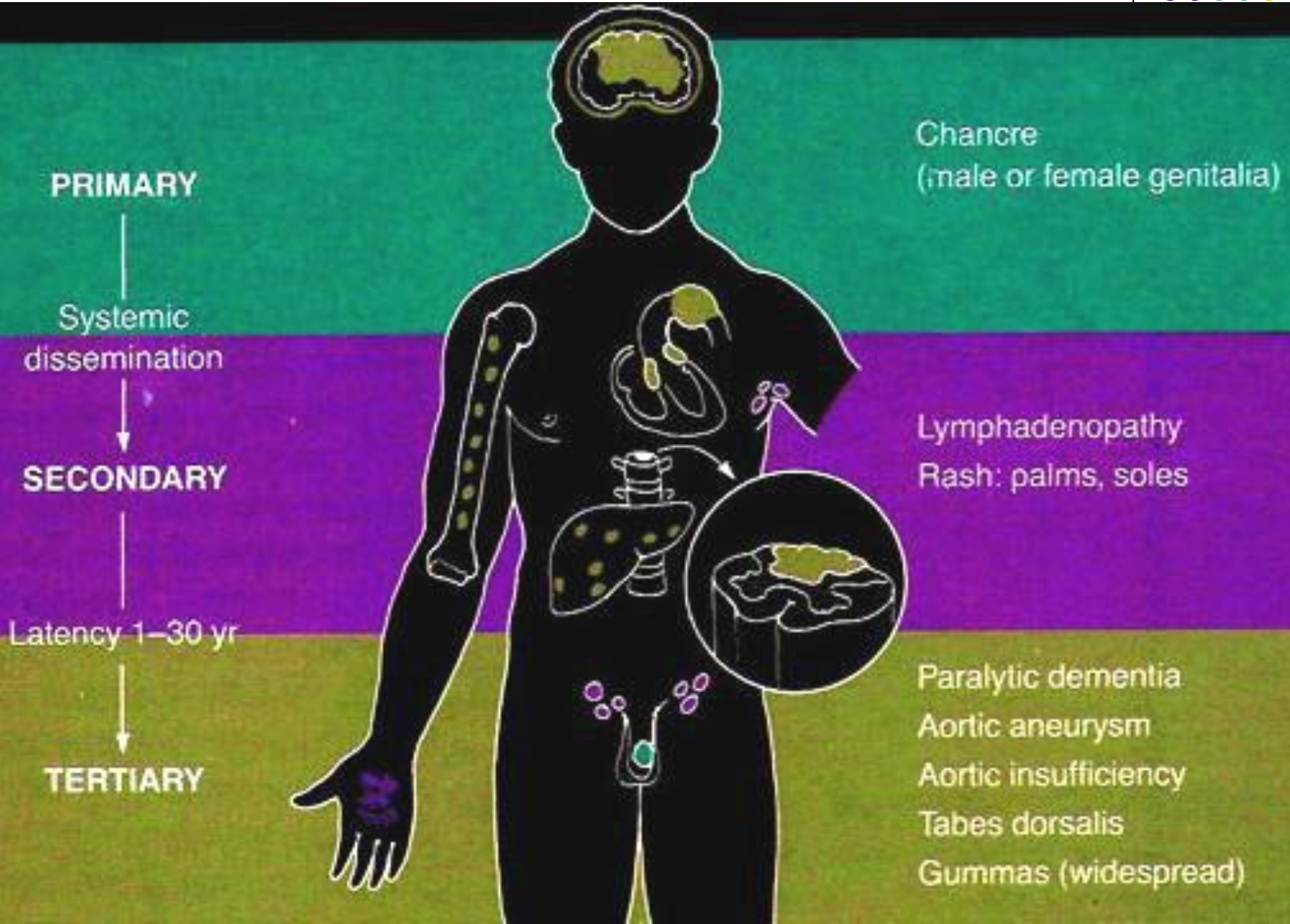
➤ Časná syfilis

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

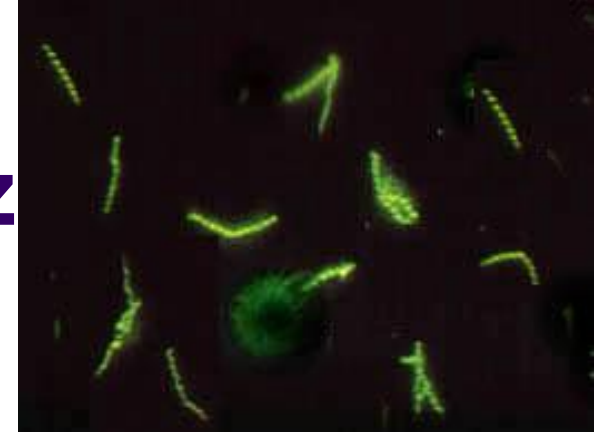
➤ Pozdní syfilis

- Latentní syfilis (cca 3-20 let)
- Terciální syfilis (gummata, kardiovaskulární lues, neurosyfilis, tabes dorsalis)

➤ 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)- raritní
- 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 **konfirmasiace**.
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, **konfirmasiace** se provádí pomocí velmi spolehlivých treponemových testů
- Indikací ke **konfirmasiaci** 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

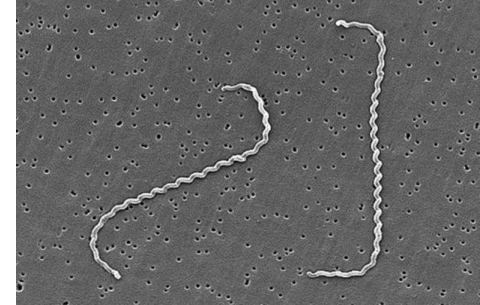
Přehled nejdůležitějších nepřímých testů na lues



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

TPHA – *T. pallidum* pasivní hemaglutinační test

Rod *Leptospira*

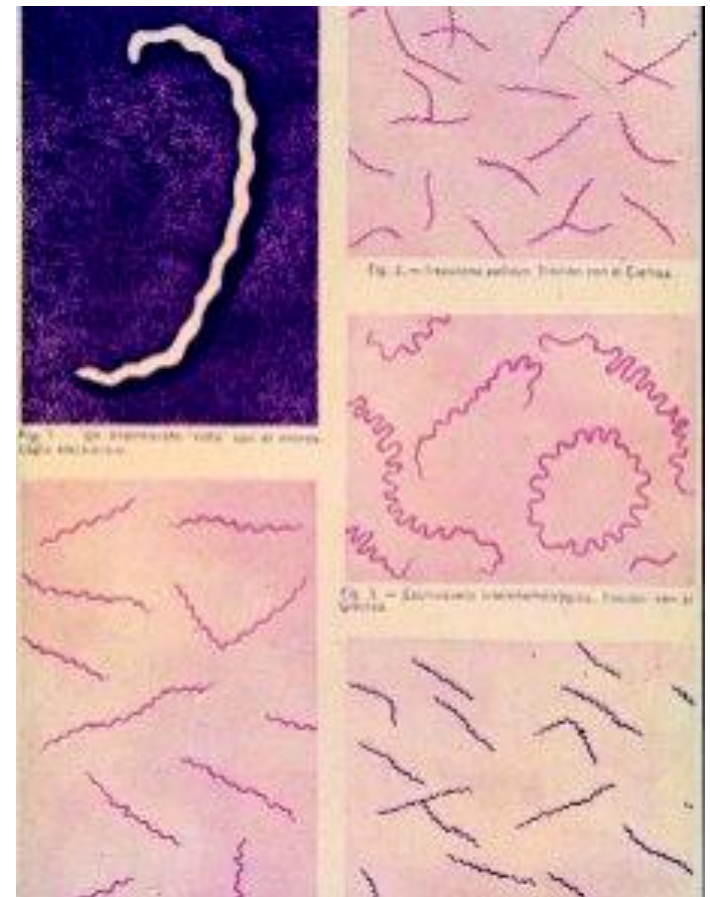
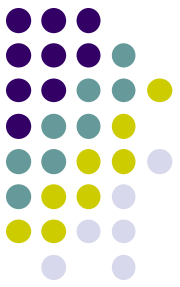


- Jemné pravidelné závity, na koncích háčkovitě ohnuté
- Způsobují zoonózy- tzv. leptospirózy, člověk se nakazí kontaktem s močí infikovaného zvířete (myšovití hlodavci, prase, skot)- koupání, konzumací kontaminované vody či potravy
- **Blat'ácká horečka** (serovar **Grippotyphosa**)- chřipkovité příznaky, dobrá prognóza
- **Weilova choroba** (serovar **Icterohemorrhagiae**)- 1. fáze podobná blat'ácké horečce, ve 2. fázi nastupuje ikterus, renální selhání, krvácivé projevy na kůži a sliznicích

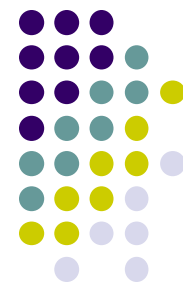
Průkaz

➤ Leptospiry:

- Používá se zástinová mikroskopie a kultivace ve speciálním médiu, PCR

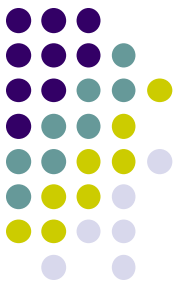


Borreliie: úvod k úkolům 1 až 3



- 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	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

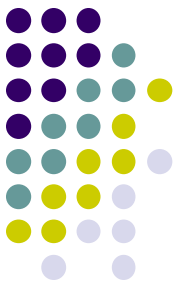
CAL	6	J	22	30
K+	7	K	23	31
K-	8	L	24	32
1	9	17	25	N
2	10	18	26	34
3	11	19	27	35
4	12	20	28	36
5	13	M	29	37

Úkol 2: 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
- Odečtěte tedy výsledky IgG i IgM u našich pacientů.

Úkol 3: Borrelie – PCR



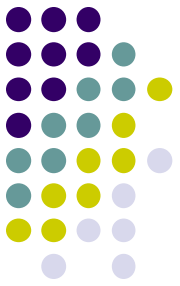
- PCR je reakce přímého průkazu, je tedy **průkaznější než hledání protilátek**, zvláště u čerstvé infekce
- K reakci PCR jsou indikováni z našich pacientů **pouze pacienti L a N.**
- Zjistěte, který pacient je pozitivní
- Pozitivita = svítí proužek detekované reakce
- Interní kontroly tentokrát nebyly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

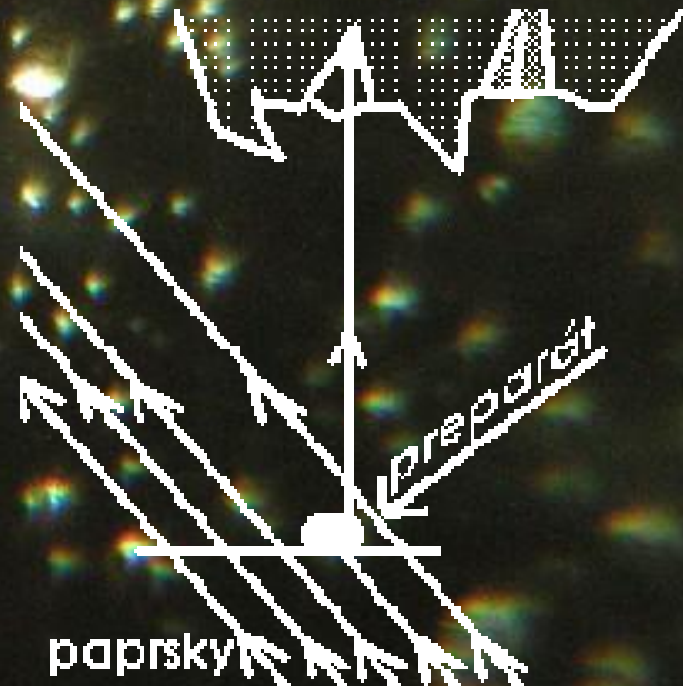
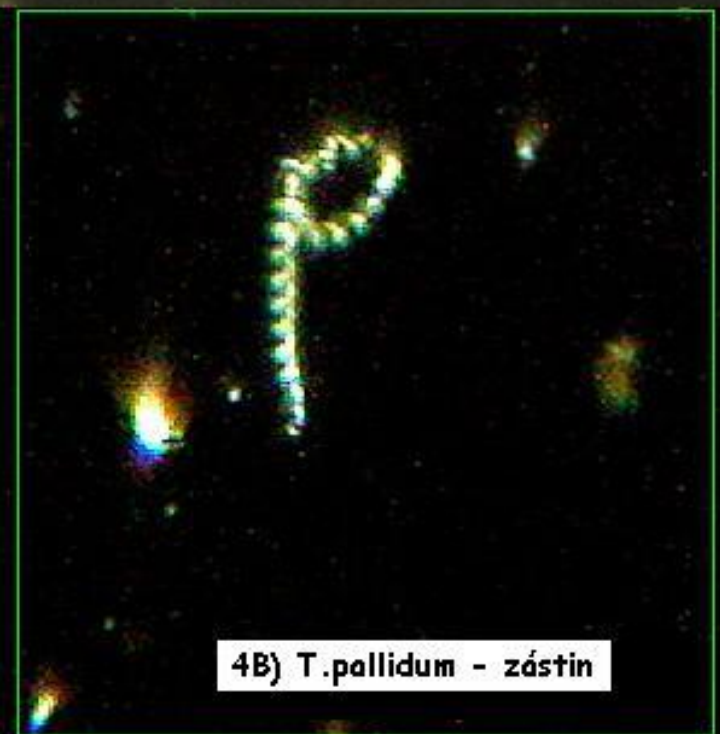


- 4b- mikroskopie v zástinu– prohlédněte si obrázky a obkreslete si je do protokolu (princip i vzhled *Treponema pallidum*)
- 4c- přímá IMF – prohlédněte si ještě další obrázek a zakreslete výsledek přímé imunofluorescence

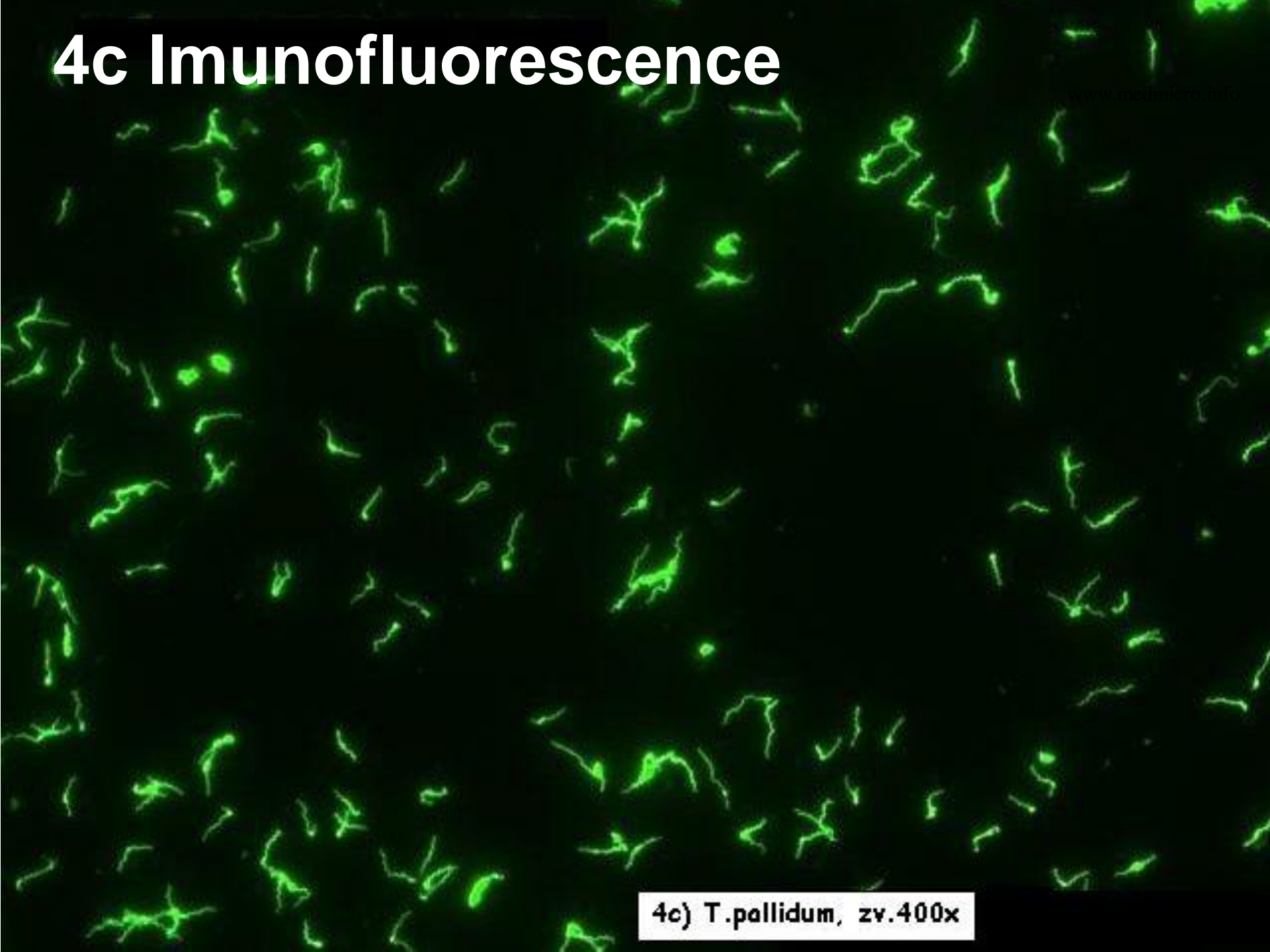
4b Zástinová mikroskopie

*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)

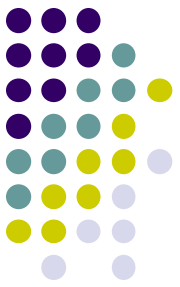


4c Immunofluorescence



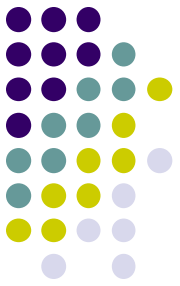
4c) *T.pallidum*, zv.400x

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



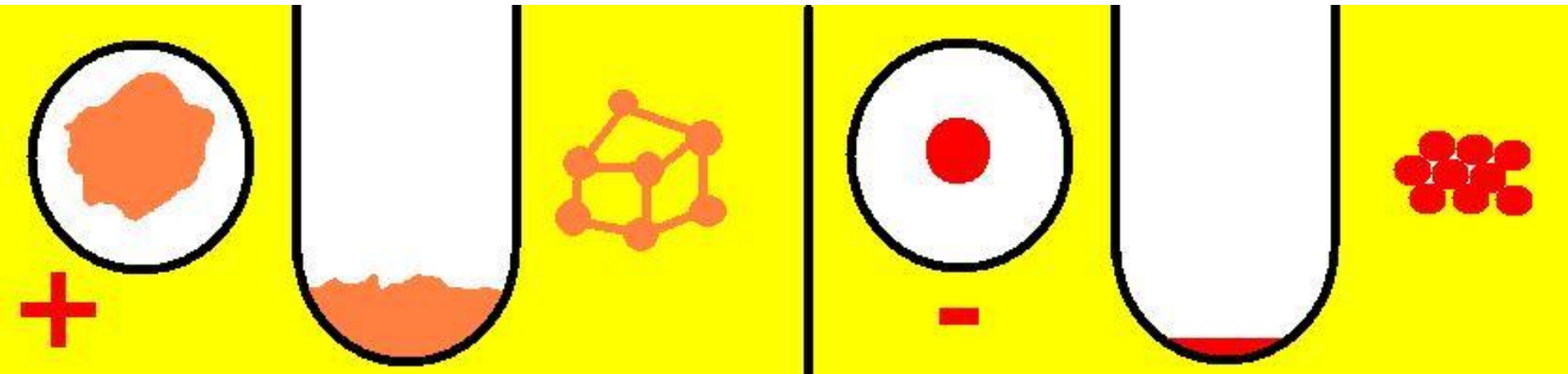
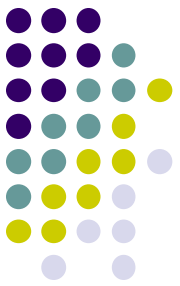
- V úkolu 5 vybereme ze screeningových pacientů ty, které je třeba konfirmovat
- V úkolu 6 potvrdíme jejich diagnózu a učiníme konečný závěr
- Pracujeme s pěticí pacientů:
 - A = těhotná žena (běžný screening, není zvýšené riziko syfilis)
 - B = pacient s dva dny trvající lézí, která vypadá jako ulcus 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 proved'te 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)

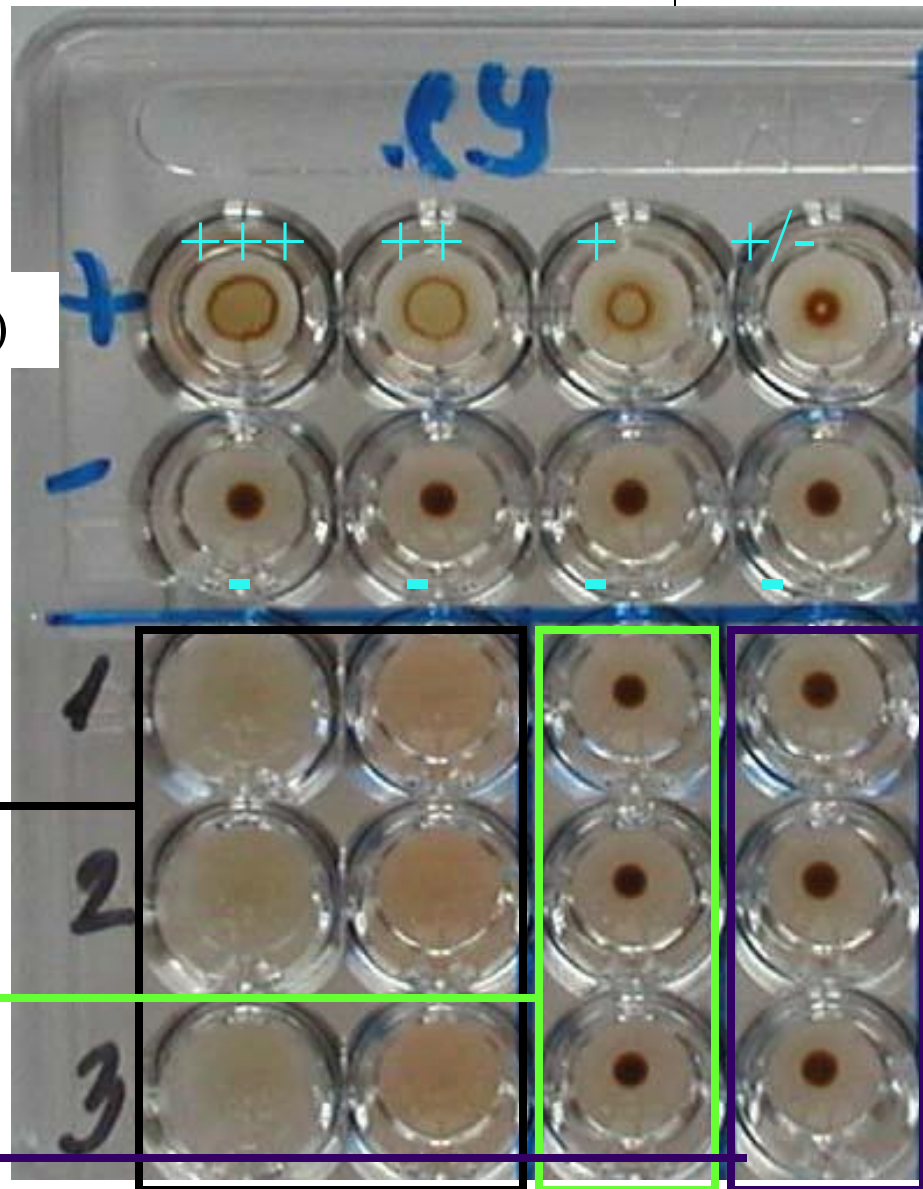
Negativní kontrola

Pacienti (1, 2, 3)

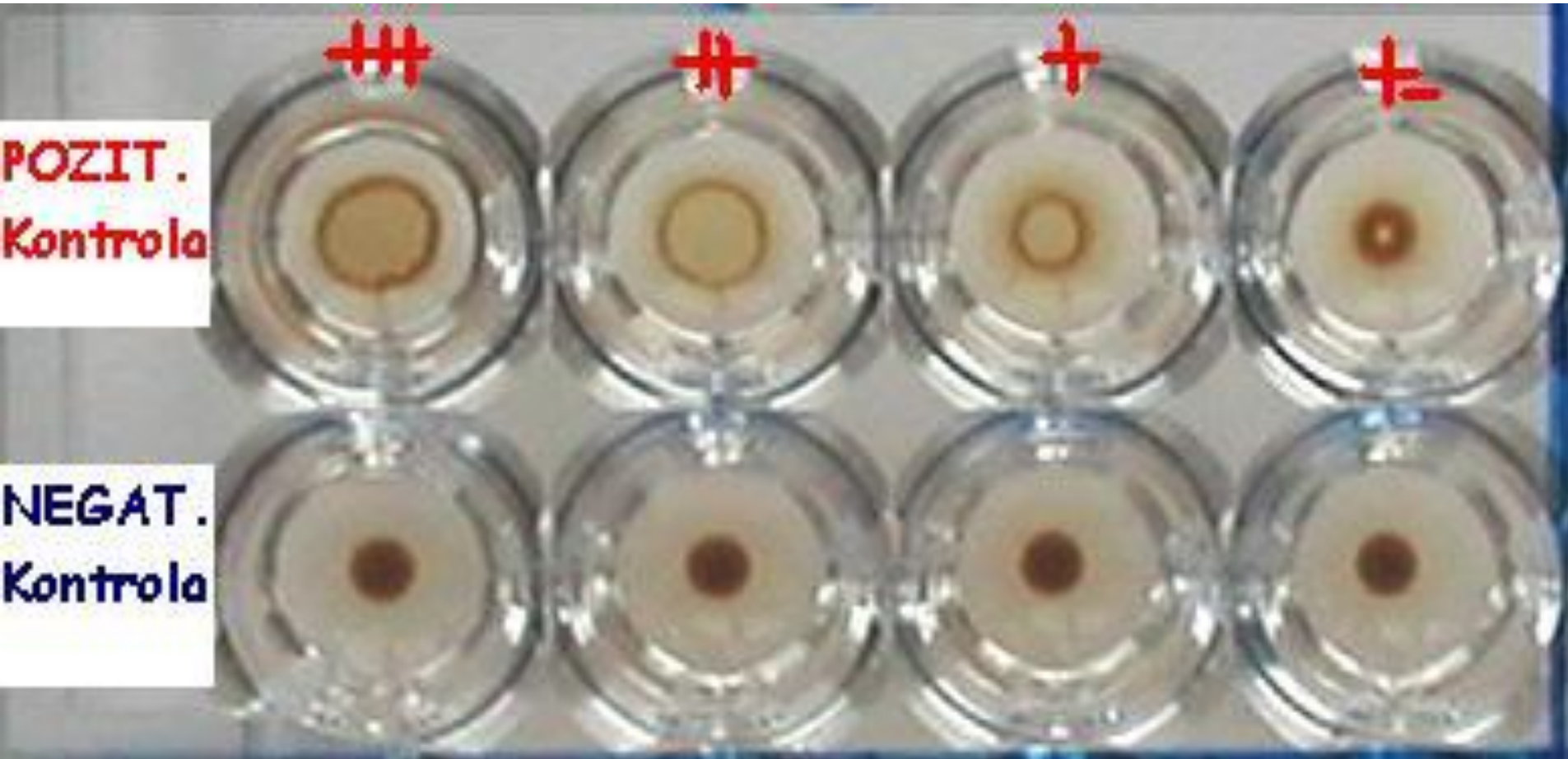
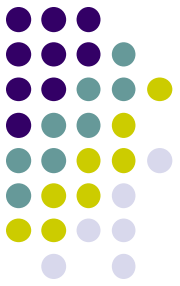
Technické důlky

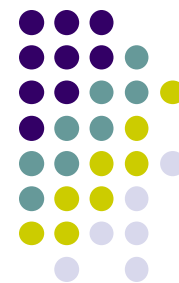
Kontrola

Vlastní reakce



TPHA – hodnocení:



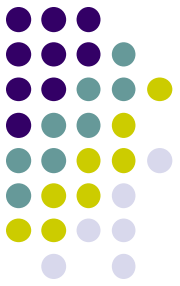


Výsledky – screening

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

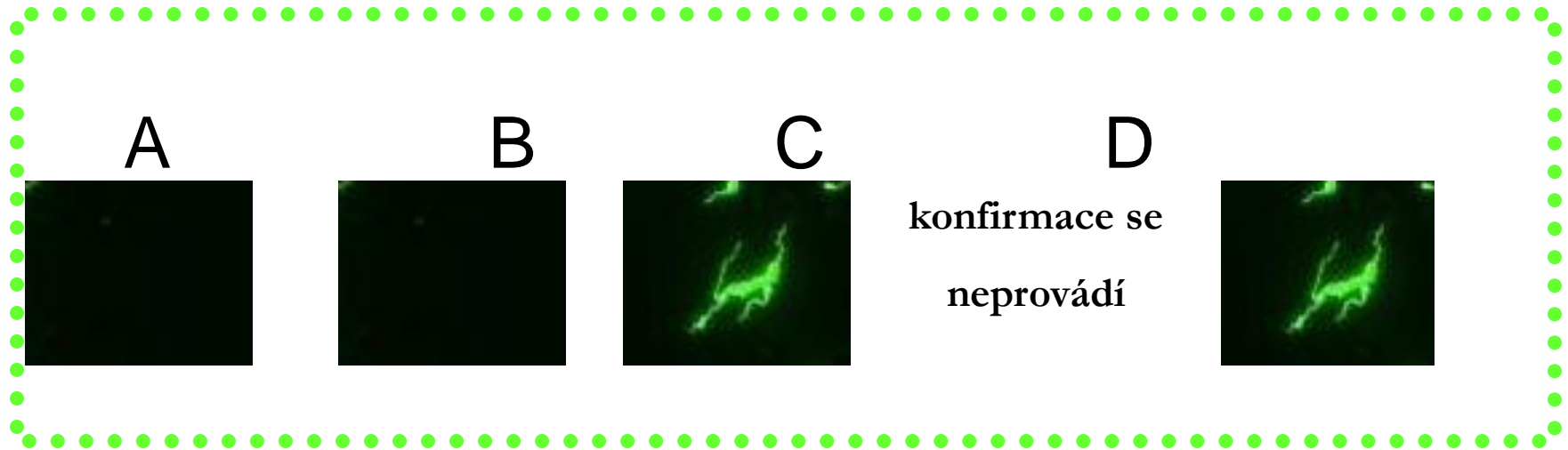
**Výsledek je sice negativní, ale konfirmační reakce budou provedeny s ohledem na klinickou situaci*

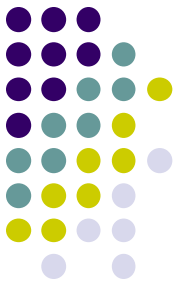
Úkol 6: Konfirmace syfilis



Konfirmační reakce I

Výsledky reakce FTA-ABS:





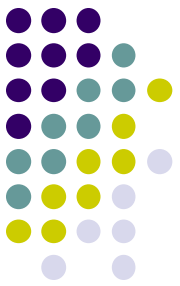
Konfirmační reakce II

➤ Hodnocení ELISA reakce:

- Nejprve spočítejte cut off a nahradte 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 - confirmace

	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	konfirmasiace neprovedena					Dárce je v pořádku
E	+++	+	+	+	+	Jde o kongenitální syfilis. Vyšetříme také krev matky.

Úkol 7: diagnostika leptospir

- Prohlédněte si obrázek a obkreslete jej

