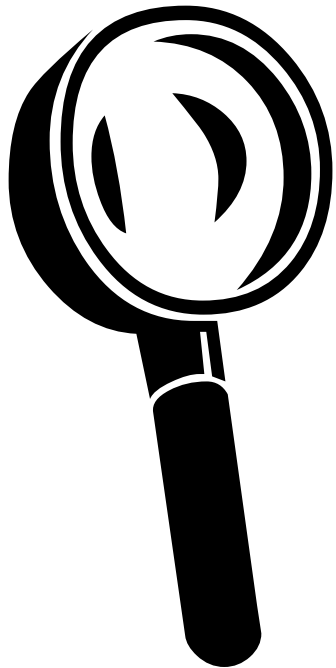


Mikrobiologický ústav uvádí

# NA STOPĚ PACHATELE



Díl osmý:

Acidorezistentní pachatelé a  
pachatelé stočení do spirály

Autor prezentace: Ondřej Zahradníček (kontakt:  
[zahradnicek@fnusa.cz](mailto:zahradnicek@fnusa.cz)). K praktickému cvičení pro Bi7170c

# Úvod: Plivátka v boji proti TBC

*V době první republiky vyvinula společnost za osobní angažovanosti prezidenta Masaryka a jeho „Ligy proti tuberkulóze“ velké úsilí v boji proti této nemoci. Významnou součástí byla osvěta, aby lidé neplivali na zem, ale používali plivátka.*



# Přehled jednotlivých částí

Klinická charakteristika acidorezistentních bakterií

Specifické vlastnosti acidorezistentních bakterií

Diagnostika acidorezistentních bakterií

Klinická charakteristika spirálních bakterií

Mikrobiologická charakteristika a dg. spirochet

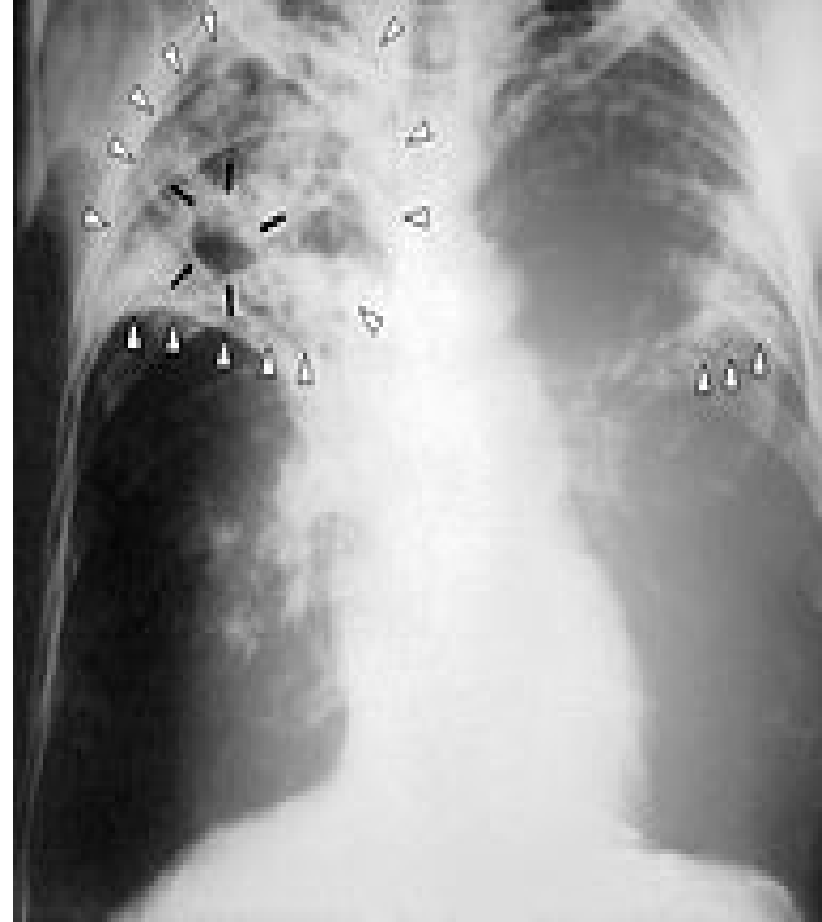
*Bonus 1: Rickettsie a chlamydie*

*Bonus 2: Rozšířené povídání o mikroskopii*

Klinická  
charakteristika  
acidorezistentních  
bakterií

# Příběh první

- Honza již několik let věděl, že je **HIV pozitivní**. Dobře věděl, že je mnohem zranitelnější než ostatní lidé, že ho každá infekce dostihne rychleji než jiné
- Přesto ho zaskočilo, že **v poslední době začal kašlat**. Jeho ošetřující lékaři zkoušeli různé možnosti, až nakonec na základě rentgenu, PCR vyšetření a kultivačního vyšetření dospěli k názoru, že se jedná o **miliární (zrnkovitou) formu tuberkulózy**.



<http://cs.wikipedia.org/wiki/Tuberkul%C3%B3za>

# Viníkem zde bylo...



- *Mycobacterium tuberculosis*, i když TBC může způsobovat například i *Mycobacterium bovis*.
- Zajímavostí tohoto mikroba je záliba v životě **uvnitř buněk**. S tím také souvisí skutečnost, že na mykobakteria se **špatně tvoří protilátková odpověď** (takže se nedá prokazovat antigen ani protilátky) a že hlavní slovo má **buněčná imunita** – i při vakcinaci.
- Jelikož při HIV infekci je právě buněčná imunita postižena, je TBC jednou z **oportunních infekcí**.

# Skutečný příběh

19. září 2007 15:17

Plzeňští kriminalisté našli muže, který má zřejmě TBC. Lékaři příznaky nemoci identifikovali u sedmačtyřicetiletého Marcela Pfeifera v pondělí, pacient jim slíbil, že přijde druhý den, ale už se neobjevil. Proto po něm bylo vyhlášeno pátrání.

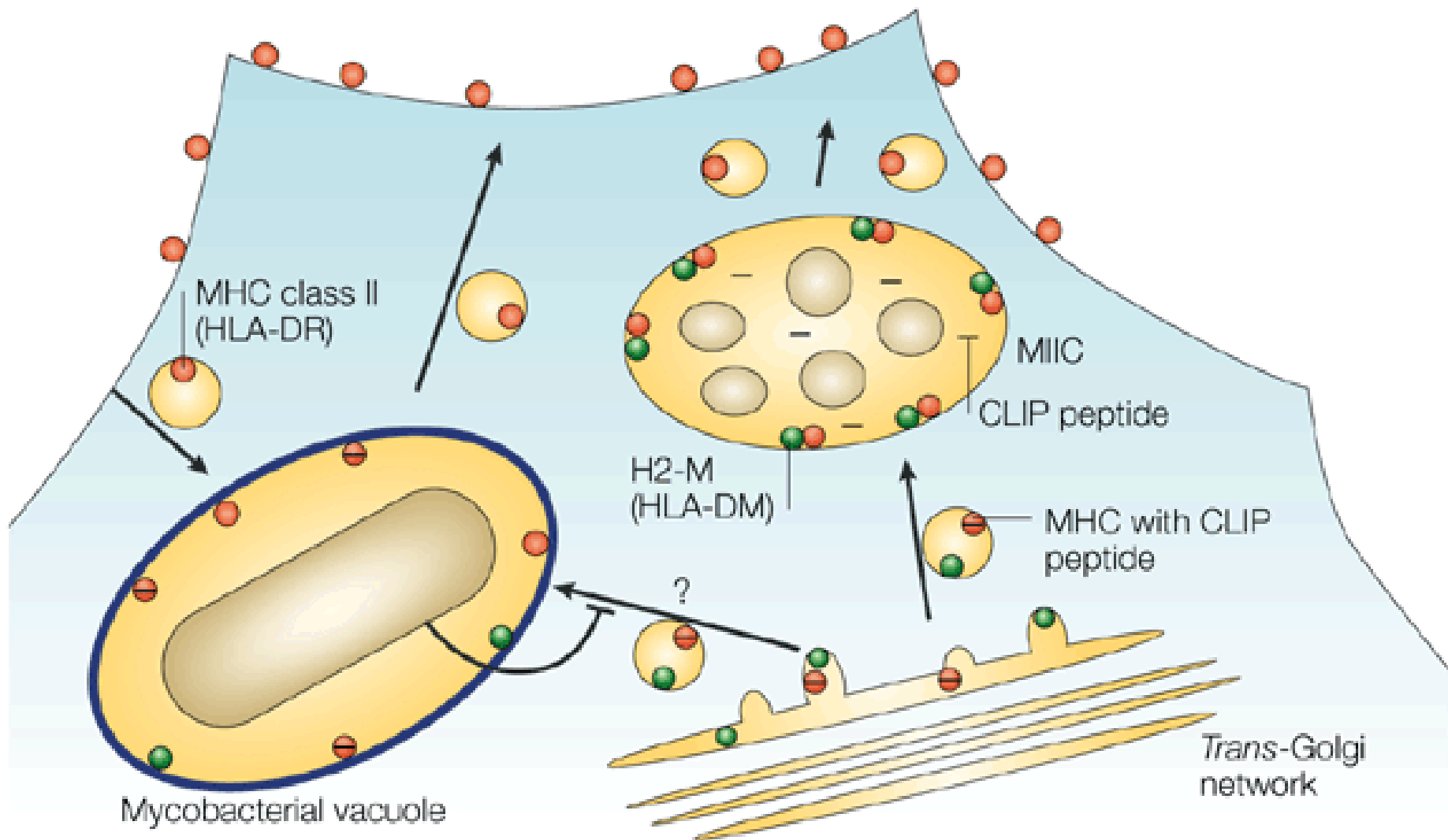
"Nemocný muž se dnes pohyboval po Slovanské třídě, v blízkosti křižovatky s Liliovou ulicí," uvedl mluvčí plzeňské policie Jaroslav Ibehej.

Kriminalistům po zveřejnění pátrání volala řada lidí. Poslední z nich policisty skutečně navedl na místo, kde Pfeifer byl. Nyní ho čeká převoz do zdravotnického zařízení v Janově na Rokycansku.

Tuberkulóza je nebezpečné nakažlivé onemocnění. Léčba pomalu se rozvíjející nemoci je velmi zdlouhavá. Po celou dobu je třeba být pod dohledem odborníků.

Kvůli zamezení šíření nákazy musí zdravotníci vyhledávat také lidi, kteří byli v kontaktu s tuberkulózním pacientem.

# *Mycobacterium* uvnitř buňky



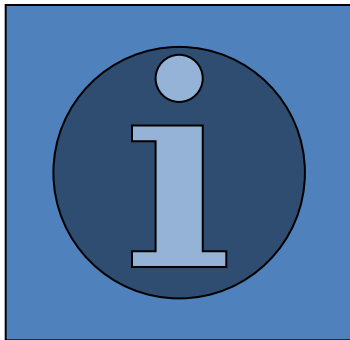


# Tuberkulóza

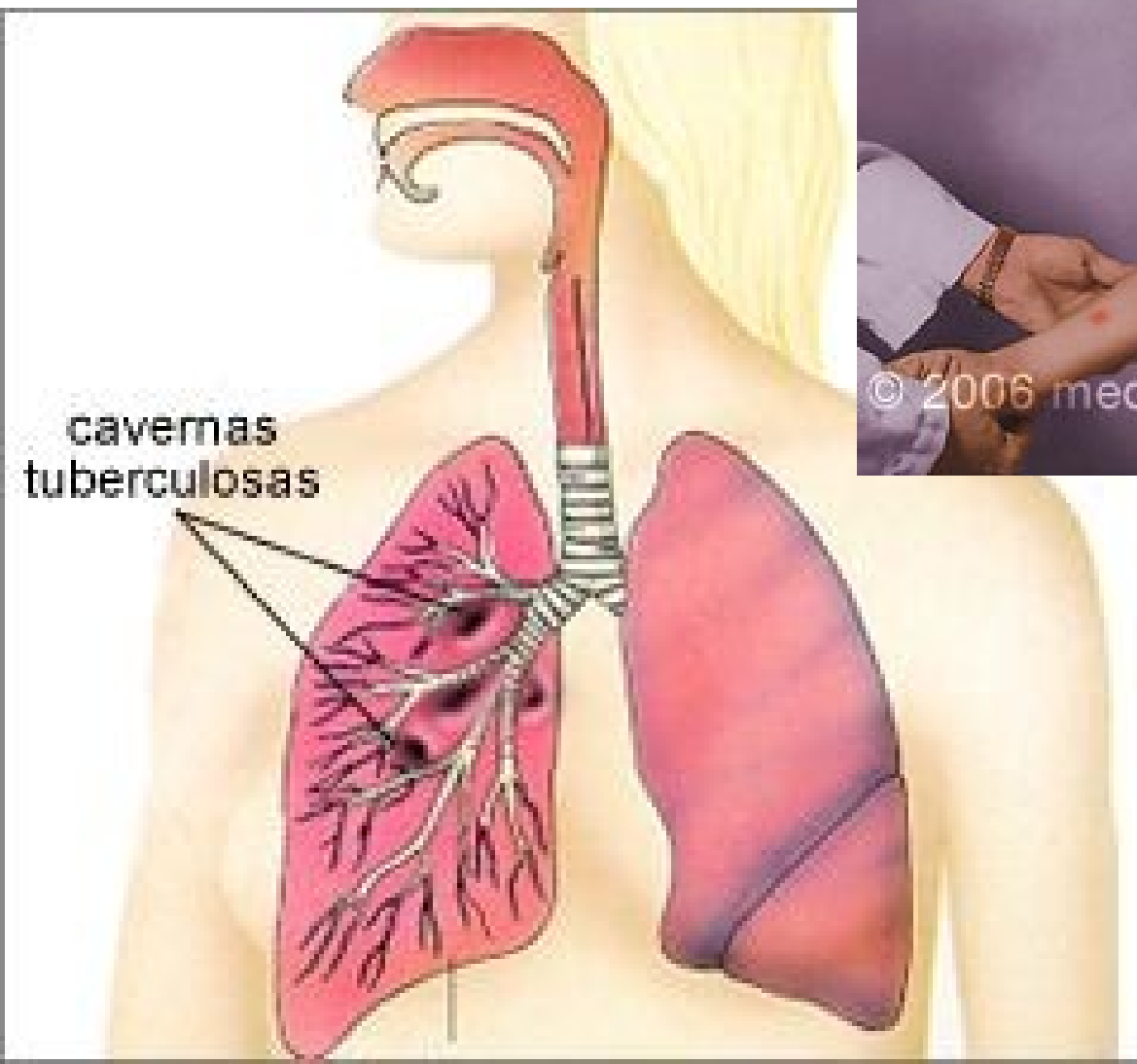
- Při prvotním styku s infekcí dojde ke vzniku tzv. **primárního komplexu**. Je to ložisko (obvykle v plicích) a k němu přiléhající mízní uzlina.
- Při další infekci vzniká tzv. **postprimární TBC**, která je horší. Zpravidla vznikne granulomatózní útvar, který později podléhá kaseifikaci („zesýrovatění“) a pak už se dále nezvětšuje. Paradoxně za většinu škod v organismu může reakce hostitelského organismu (pozdní přecitlivělost – vlastně druh alergie)
- Po letech se může ložisko znovu **aktivizovat**, zejména ve stáří, při podlomení imunity, nebo i při abúzu alkoholu. Takový člověk může být velmi nebezpečný pro své okolí.

# Intracelulární mikroby

- *Mycobacterium* je sice často přítomno uvnitř buněk, není však obligátně intracelulárním patogenem. Tím jsou naopak viry, a také chlamydie a rickettsie. Přečtěte si o nich v bonusovém materiálu!



# Tuberkulóza

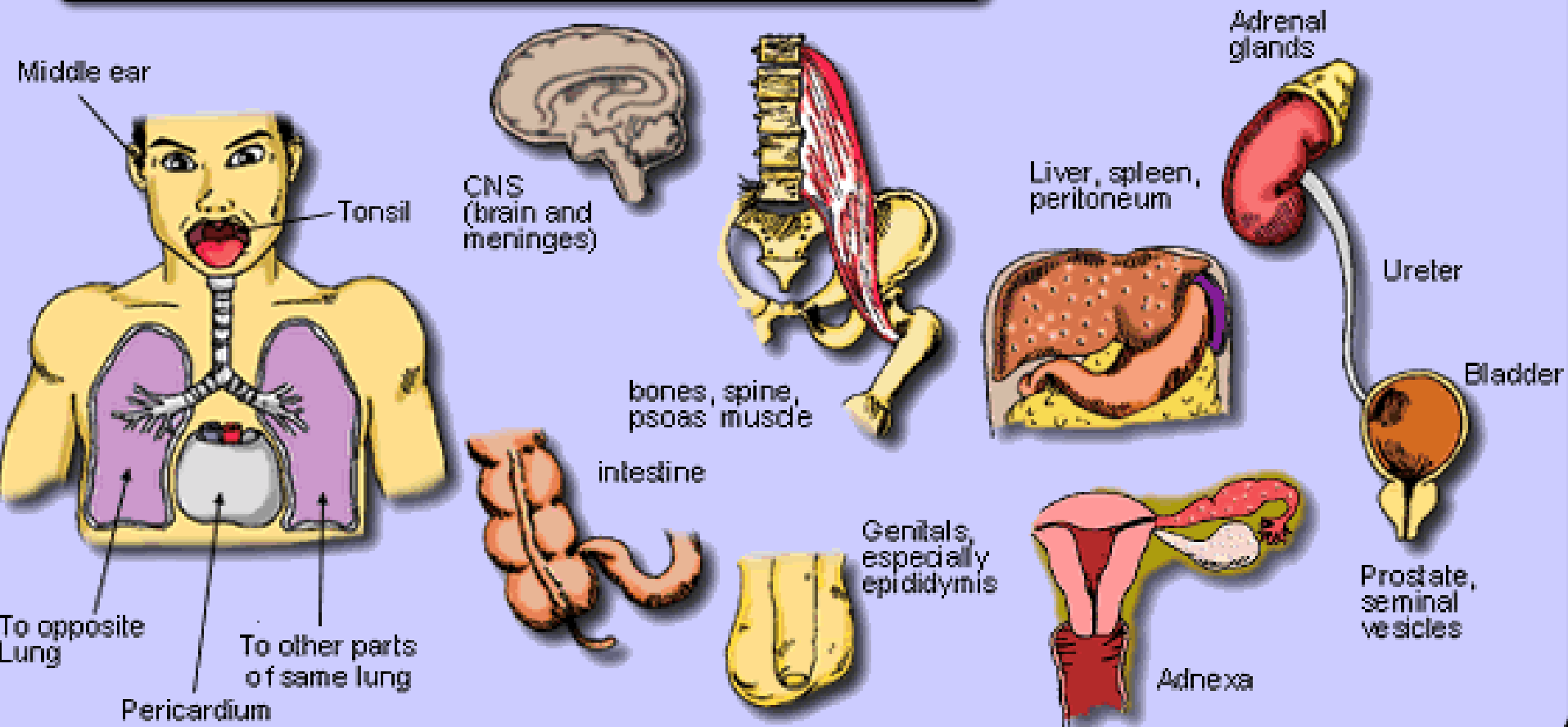


<http://www.stockmedicalart.com>

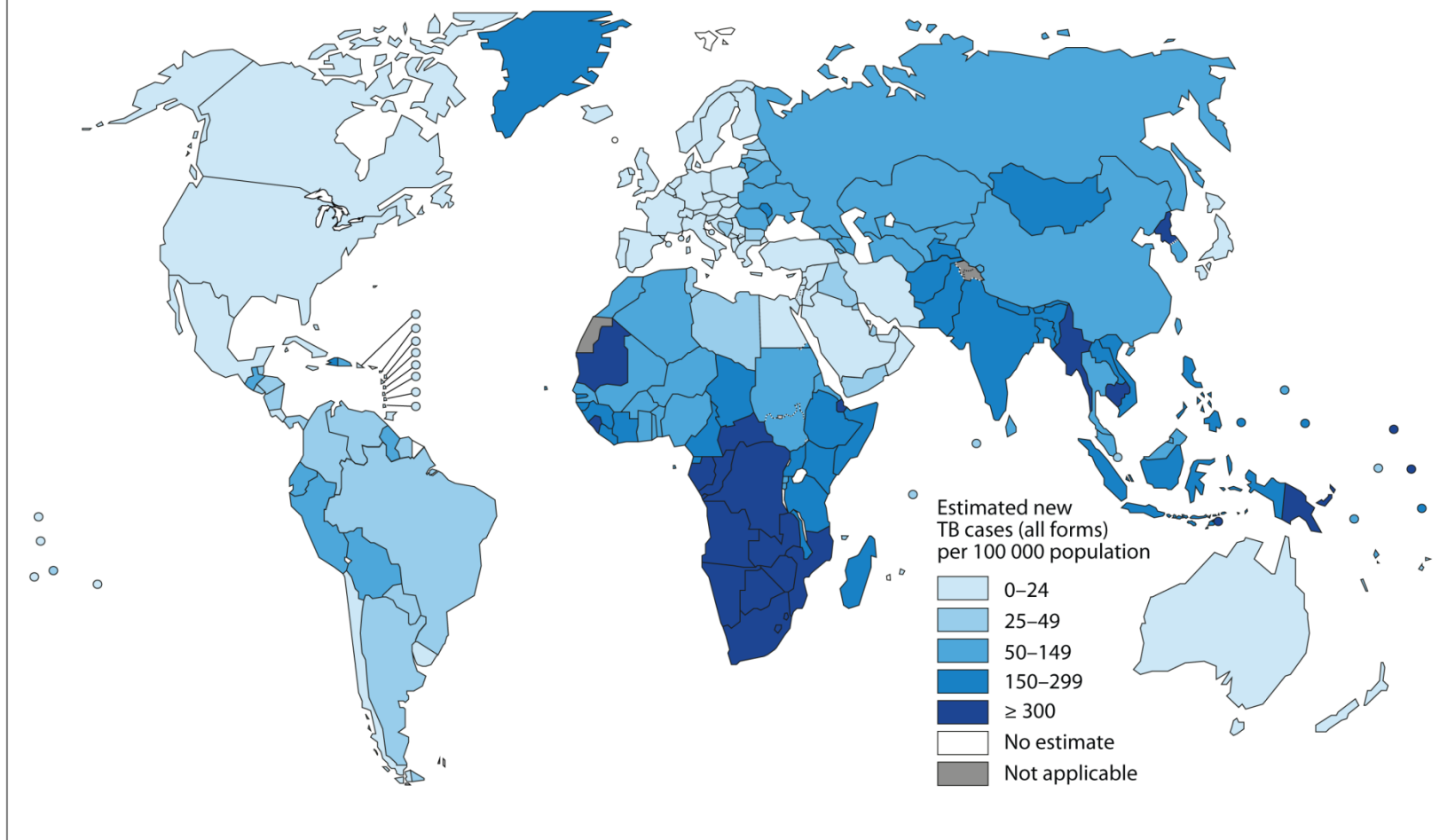
# Není jen plicní forma TBC

sitemaker.umich.edu (2x)

## Tuberculosis Affects Many Parts of the Body



## Estimated tuberculosis (TB) incidence rates, 2011



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries.

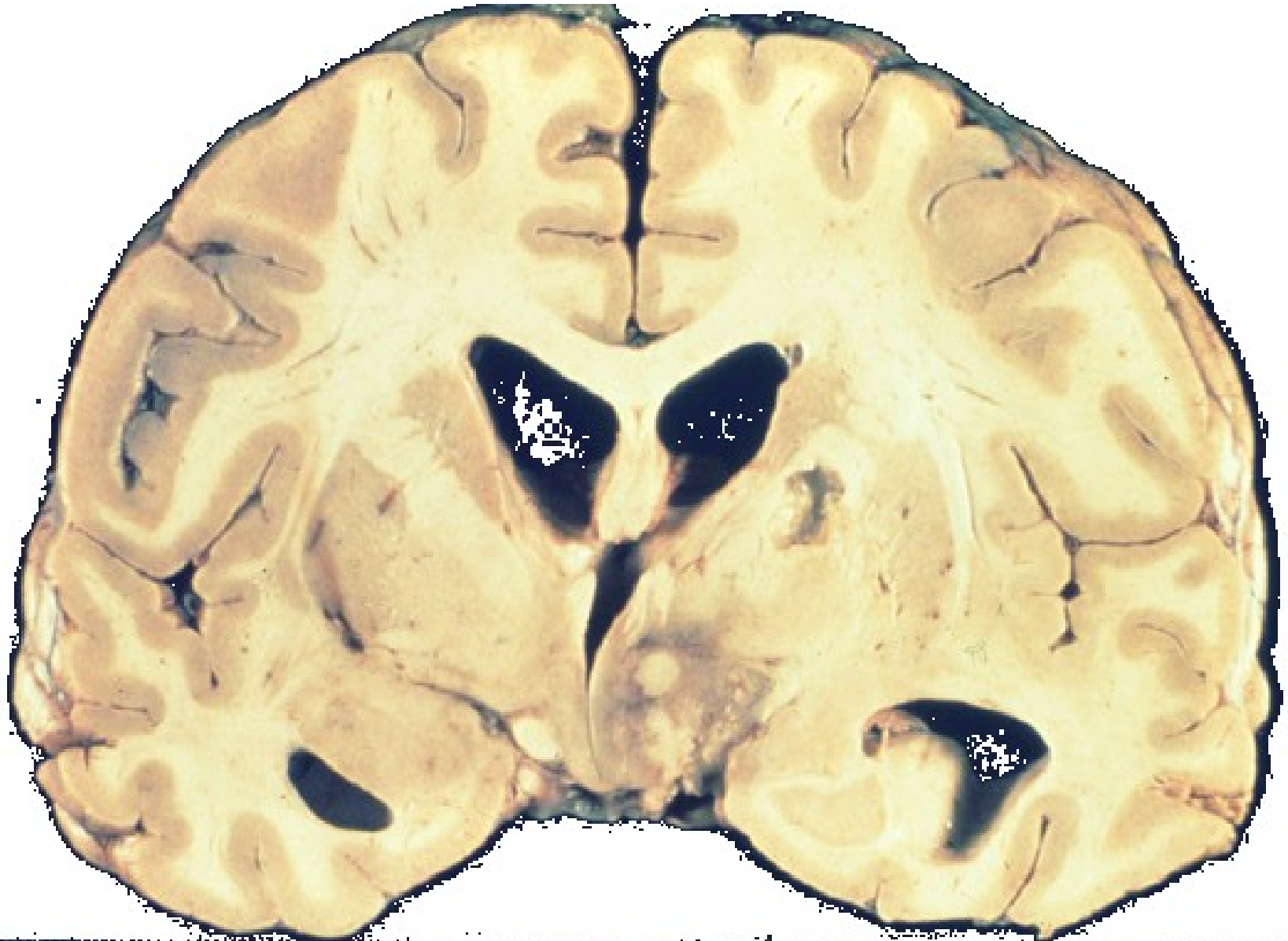
**Dotted and dashed lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.**

Source: *Global Tuberculosis Report 2012*. WHO, 2012.



# Tuberkulom mozku

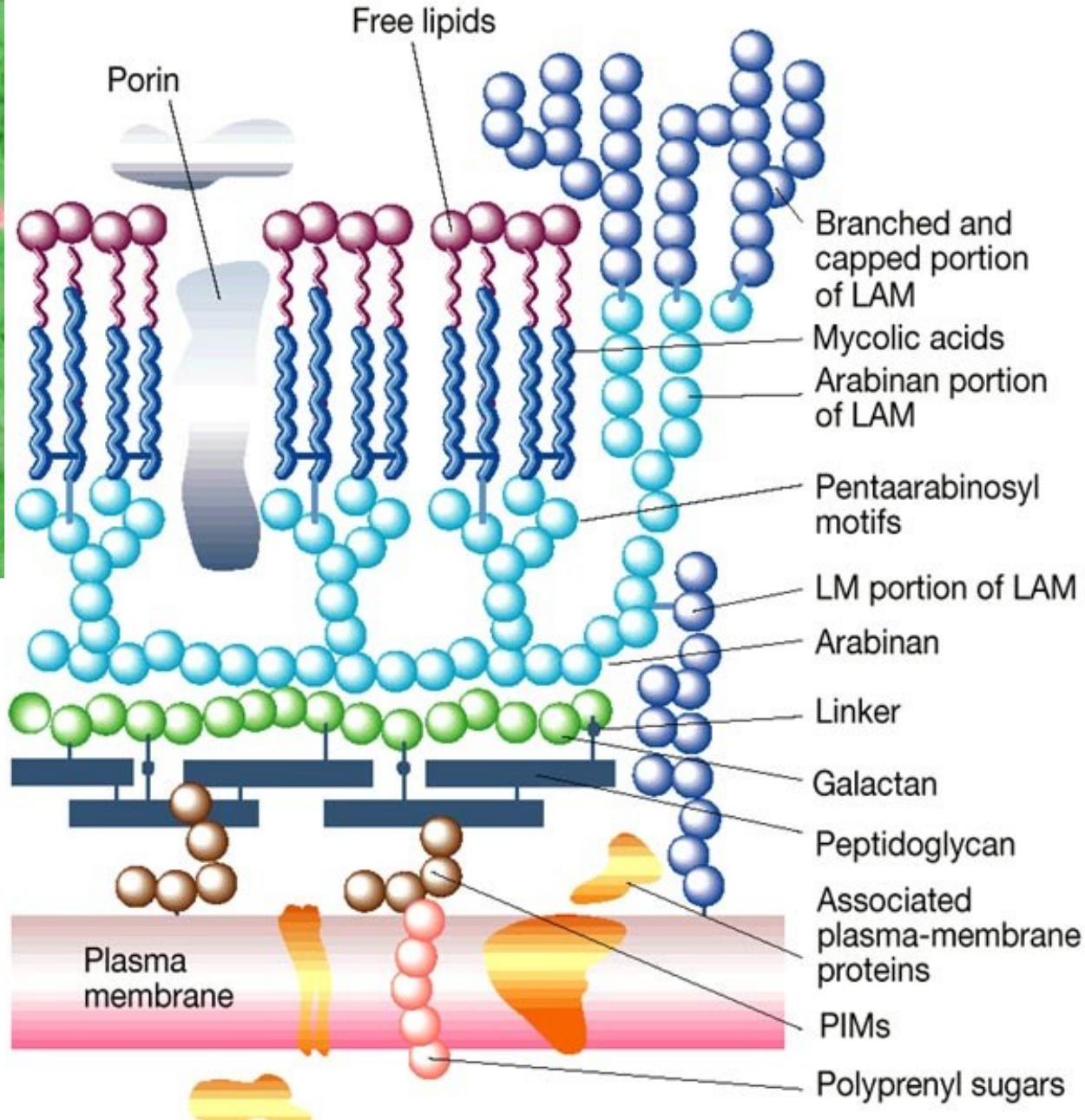
<http://pathology.mc.duke.edu>



# Další zvláštnosti mykobakterií

- Jejich buněčná stěna je vysoce hydrofobní, jsou v ní tzv. mykolové kyseliny. Téměř se nebarví podle Grama, jsou nutná speciální barvení.
- Rostou pomalu, mají dlouhou generační dobu, proto jsou pro kultivaci nutné speciální půdy.
- Jsou velmi odolná k desinfekčním prostředkům. Nelze použít prostředky spektra „A“, proti běžným bakteriím, je nutné „T“ (proti TBC), případně „M“ (proti atypickým mykobakteriím).
- Jsou též odolná k antimikrobiálním látkám.





www.primer.ru

# Buněčná stěna mykobakterií



# Příběh druhý

- Pan Hassan žil v **pouštní části Súdánu**, zmítané neustálými válkami a nepokoji.
- V poslední době se od něj začali odvracet i ti přátelé, kteří ještě neuprchli ani nebyli povražděni. **Znetvoření obličeje** pana Hassan bylo neklamnou známkou, že pan Hassan trpí onemocněním, které se **v těchto zeměpisných šířkách ještě stále vyskytuje až příliš často**.
- Naštěstí se pan Hassan setkal s pracovníky jedné **nevládní organizace**, kterým rovněž byla diagnóza jasná. Pomocí **dapsonu** se podařilo panu Hassan pomoci.

# Viníkem je

- *Mycobacterium leprae*, mikrob ještě zvláštnější než tuberkulózní mykobakterium
- Původce nákazy objevil v roce 1873 norský lékař Gerhard Henrik Armauer Hansen, proto bývá *Mycobacterium leprae* také označován jako Hansenův bacil.
- Jeho generační doba je ještě výrazně delší. In vitro kultivace se podařila teprve nedávno a trvala celý jeden rok (pro praxi nepoužitelné)

# *Mycobacterium leprae*

- Nemoc často probíhá bez příznaků a není příliš nakažlivá. Výjimkou je kožní forma s vředy, která nakažlivá je. Občas se vyvine destruktivní forma, která napadá Schwannovy buňky a makrofágy v periferních nervech. Znetvořuje obličej i další části těla.
- Základní léčba lepry není drahá, bohužel v zemích, kde se lepra vyskytuje, je i tato poměrně nízká cena příliš vysoká
- Proto se problémem lepry zabývá řada nadací, nevládních a charitativních organizací a podobně.

# Lepra



<http://blanicti-zoldneri.tym.cz/clanky/lepra.html>



<http://abicko.avcr.cz/archiv/2002/10/obsah/9-gallery.html>

- Dlouhá inkubační doba – 2, 3, 7 ... let
- **Tuberkuloidní lepra**
  - Na kůži necitlivé depigmentované skvrny, zduřelé periferní nervy
  - Výrazná celulární imunita
  - Spontánní zhojení
- **Lepromatózní lepra**
  - Nedostatečná celulární imunita
  - Dochází ke splývání a zduření kožních lézí, obočí vypadává, propadá se nos, slepota, ztráta prstů

# Lepra

[www2.bc.cc.ca.us](http://www2.bc.cc.ca.us) (2x)



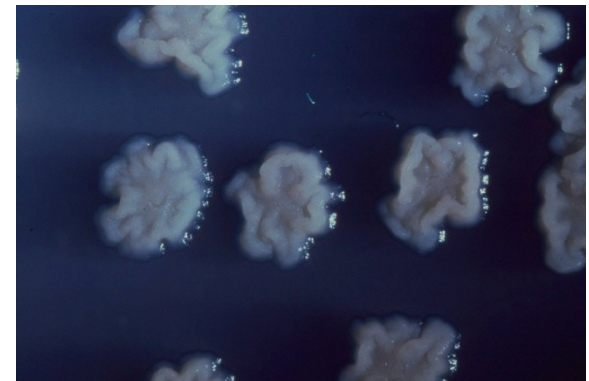


# Příběh třetí

- Pan Piraňa byl zuřivým akvaristou. Poslední měsíc měl problém: musel do akvárií nořit jen levou rukou, protože na pravé měl vřed.
- Po vyšetřování byl jeho případ uzavřen jako tzv. **fish tank granuloma**, běžný u akvaristů. Podobná nemoc plavců se nazývá **swimming pool granuloma**.
- Původci jsou...

# Atypická mykobakteria

- Kromě *M. tuberculosis* a *M. leprae* existuje i spousta dalších mykobakterií. Některá, např. *Mycobacterium marinum*, patří mezi tzv. atypická mykobakteria, která občas způsobují infekce ran a jiné problémy.
- Některá jiná mykobakteria jsou nepatogenní a jsou normální součástí lidské mikroflóry, např. *M. smegmatis*.



# Infekce *M. marinum*





# Příběh čtvrtý

- Paní Píšťelková si už delší dobu hmatala pod kůží krku **drobné útvary**.
- Nedávno se stalo, že jeden z těchto útvarů se **otevřel na povrch** a v ústí se objevil velmi hustý, žlutý páchnoucí hnis. To už paní Píšťelkovou donutilo zajít k lékaři.
- Lékaři poslali **hnis na mikrobiologické vyšetření**. Vyšetření **trvalo dlouho**, ale nakonec se ukázalo, že...

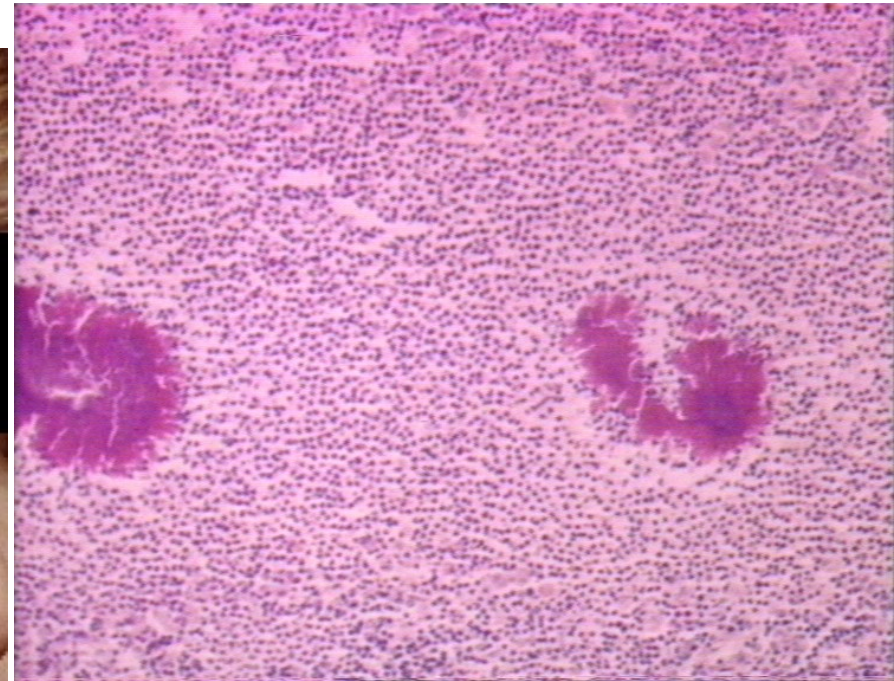
# ...jde o aktinomykózu



<http://en.wikipedia.org>

- tedy že viníkem je *Actinomyces sp.*
- Aktinomycety jsou vláknité bakterie, v podstatě grampozitivní, ale barví se Gramem špatně, protože jejich buněčná stěna je hodně hydrofobní a obsahuje hodně mykolových kyselin.
- Aktinomycety se běžně vyskytují v ústní dutině zdravých osob. Odtud se za různých okolností mohou dostat do měkkých tkání krku, tváře či hrudníku. Jsou to anaerobní bakterie, či přinejmenším nejlépe rostou za anaerobních podmínek.
- Podobné aktinomycetám jsou nokardie, které jsou naopak striktně aerobní. Jinak však mají hodně podobné vlastnosti.

# Aktinomykóza

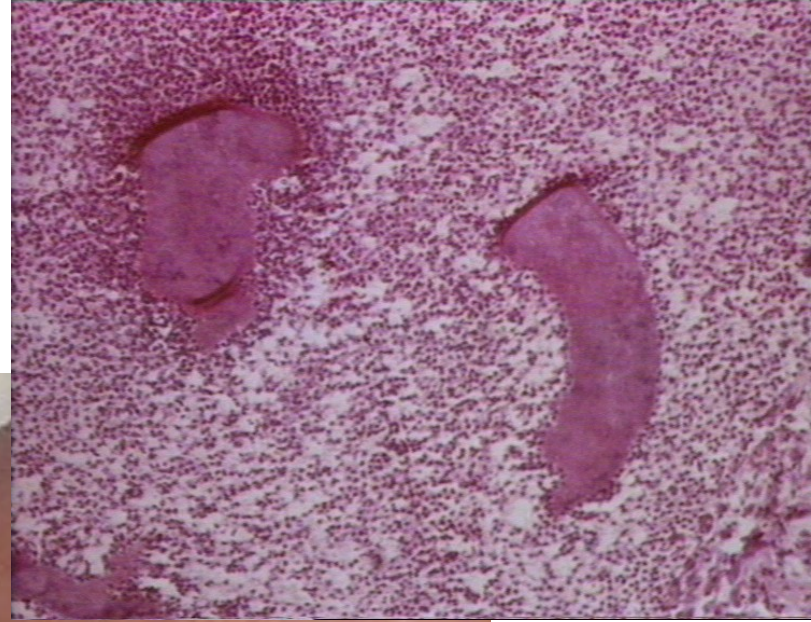


pathmicro.med.sc.edu (3x)

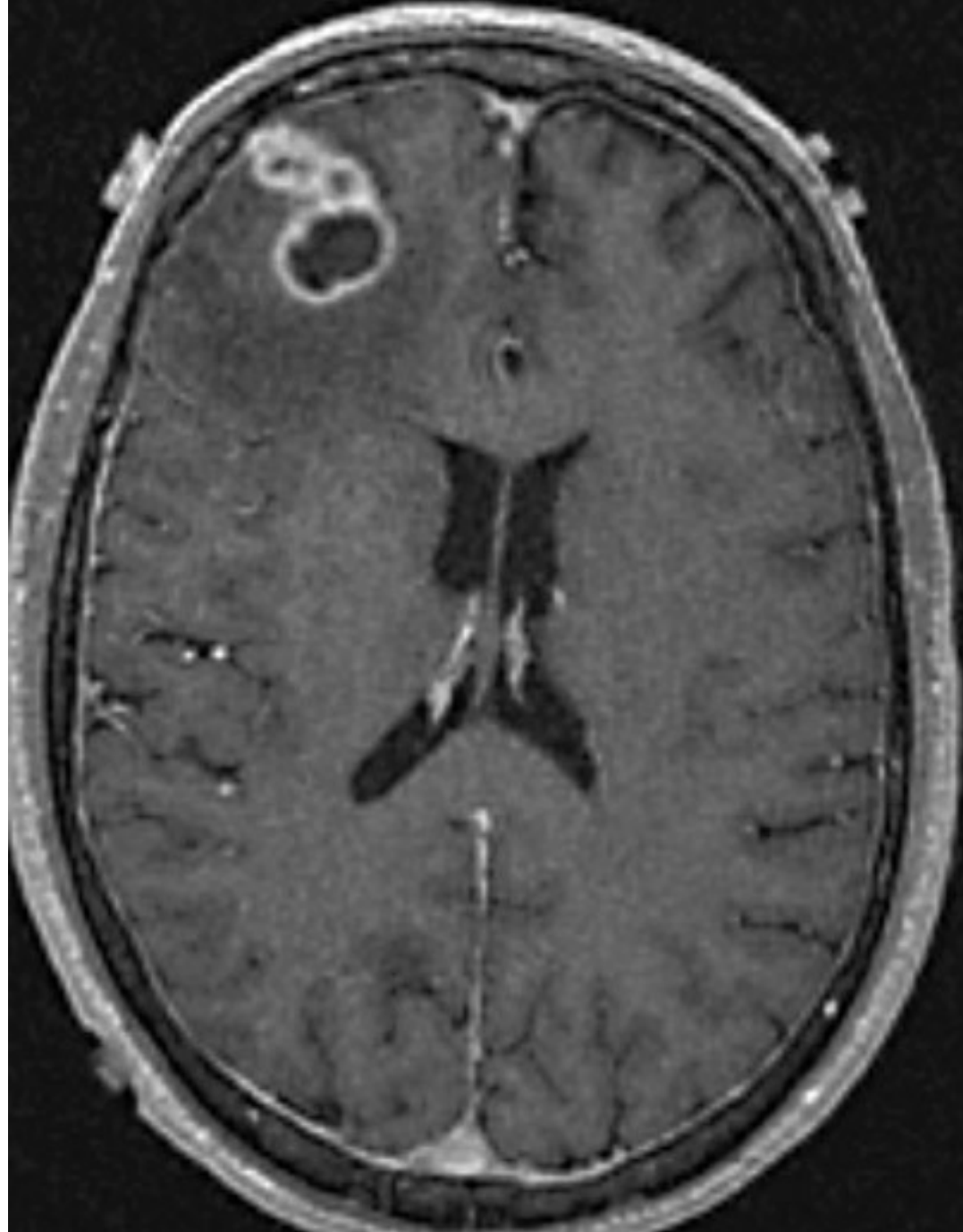
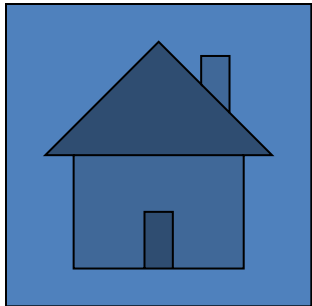




# Nokardióza



# Nokardióza mozku na CT

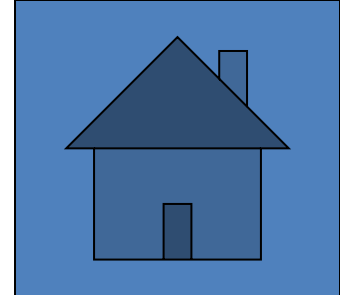


# Specifické vlastnosti acidorezistentních bakterií

# Acidorezistence a alkalirezistence

- Aby mohly na něco působit kyseliny či alkálie, musí to „něco“ být hydrofilní, tedy komunikovat s vodným prostředím. Pro mykobakteria však tohle neplatí.
- Nejsme tedy schopni je kyselinami či alkáliemi ničit.
- Nejsme také schopni je kyselinami odbarvovat, pokud tedy se je nějakým zázrakem podařilo obarvit.
- Totiž: většina barviv je také hydrofilních, a tudíž se mykobakteria i špatně barví, zpravidla je nutno barvit je za horka, aby se vůbec obarvila.
- Nokardie a aktinomycety jsou na rozdíl od mykobakterií acidorezistentní jen zčásti. Barvíme je proto podle Grama, ale musíme počítat s tím, že se barví nerovnoměrně a špatně.

# Co z toho vyplývá pro klinika?



- Pokud klinik pošle vzorek (sputum, moč, hnis či cokoli jiného) „na bakteriologickou kultivaci“, nemůže očekávat, že vyšetření odhalí případnou přítomnost mykobakterií.
- Chce-li klinik zjistit, zda má pacient TBC, musí poslat vzorek zvlášť a na průvodce výrazně označit, že má být vyšetřen kultivačně či pomocí PCR na tuberkulózu. V tom případě laboratoř provede příslušné procedury.



# Diagnostika acidorezistentních bakterií

# Jak pátrat po mykobakteriích

- **Mikroskopie:** Používá se Ziehl-Neelsenovo a fluorescenční barvení
- **Kultivace:** Používá se speciálních půd, přičemž vlastní kultivaci předchází moření, obvykle louhem. Cílem moření je usmrtit ostatní bakterie, které by při svém rychlém růstu byly kultivačně úspěšnější. Alkalirezistentní mykobakteria moření snadno přežijí.
- **Automatická kultivace:** Používá se různých typů kultivačních automatů – mohou detekovat kultivační pozitivitu mnohem dříve než klasická kultivace
- **Biochemické rozlišení:** je možné, je však vyhrazeno specializovaným laboratořím
- **Pokus na zvířeti:** občas se používá morče
- **PCR diagnostika:** stále důležitější

# Defilé zločinců:

## *Mycobacterium tuberculosis*

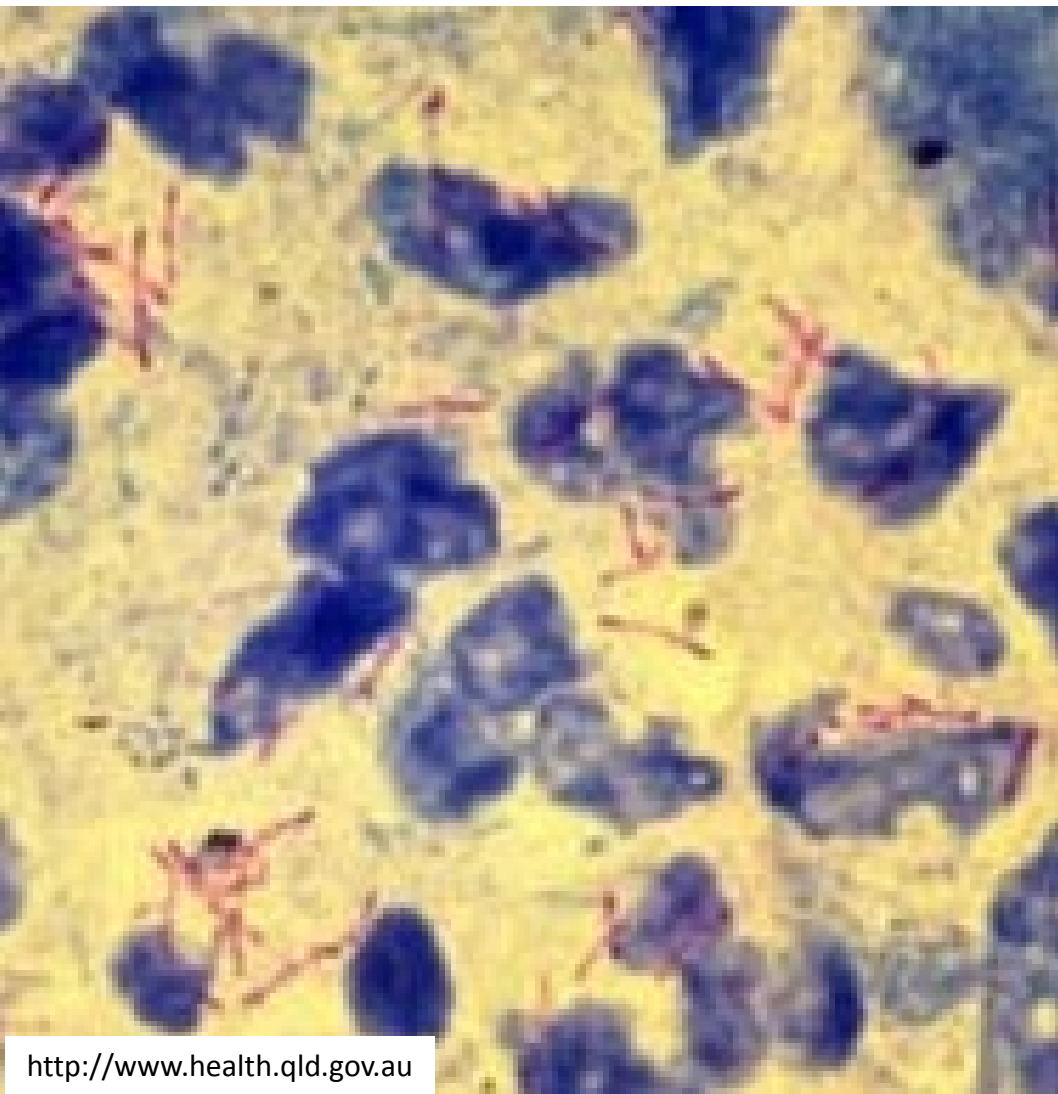


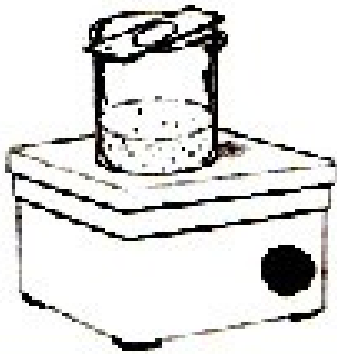
Foto O. Z.

# Postup barvení dle Ziehl-Neelsena

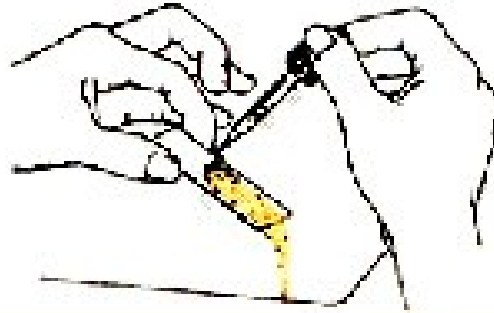
- **V prvním kroku** barvíme karbolfuchsinem (Gabbetem) za horka až do výstupu par. Bez zahřívání by mykobakteria nešlo obarvit, leda při použití koncentrovanějšího karbolfuchsinu (modifikace podle Kinyouna).
- **V druhém kroku** odbarvujeme cca 15 s „kyselým alkoholem“, což je směs alkoholu s minerální kyselinou, nejčastěji kyselinou chlorovodíkovou, poté opláchneme vodou
- **Ve třetím kroku** dobarvujeme pozadí, tj. vše, co jsme ve druhém kroku odbarvili. Dobarvujeme cca 30 s **malachitovou zelení** nebo **metylénovou modří**. Opět opláchneme, osušíme a pozorujeme imerzí.
- **Výsledkem** jsou červené acidorezistentní tyčinky na **modrém** nebo **zeleném** pozadí

# Ziehl-Neelsenovo barvení

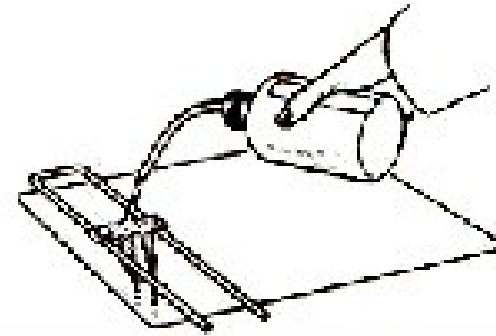
Varianta s  
vodní lázní



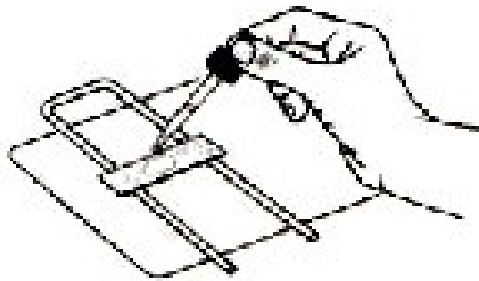
**1** Cover smear with carbolfuchsin. Steam over boiling water for 8 minutes. Add additional stain if stain boils off.



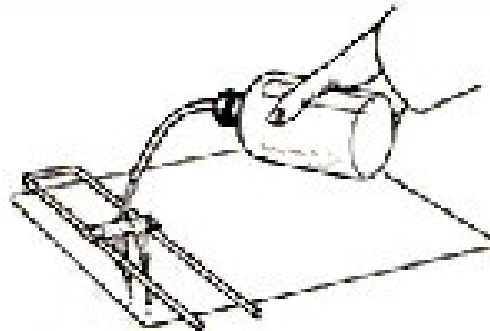
**2** After slide has cooled decolorize with acid-alcohol for 15 to 20 seconds.



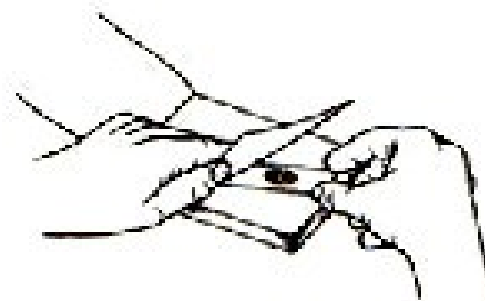
**3** Stop decolorization action of acid-rinsing briefly with water.



**4** Counterstain with methylene blue for 30 seconds.



**5** Rinse briefly with water to remove excess methylene blue.

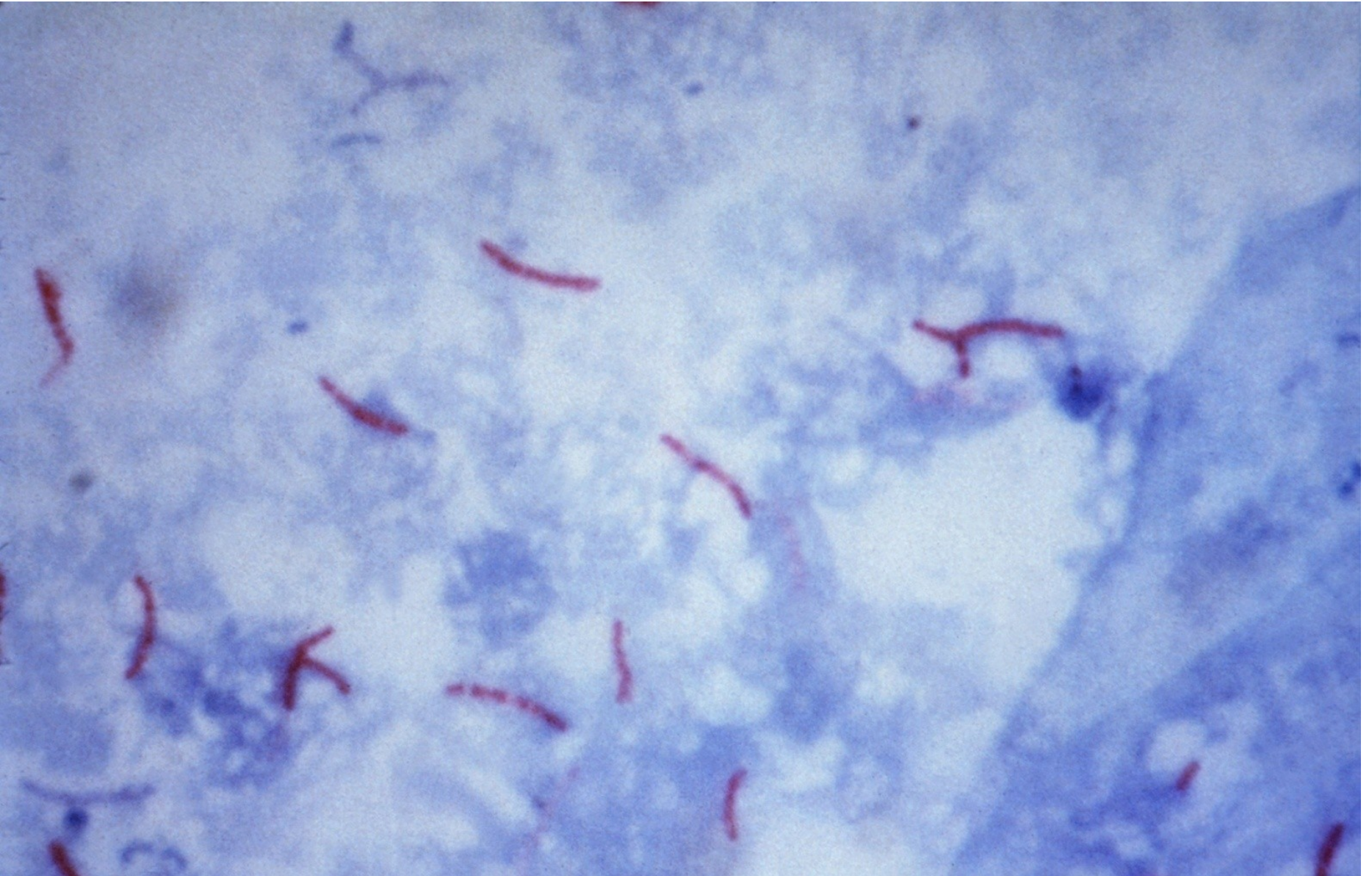


**6** Blot dry with bibulous paper. Examine directly under oil immersion.

Ziehl-Neelsen acid-fast staining procedure

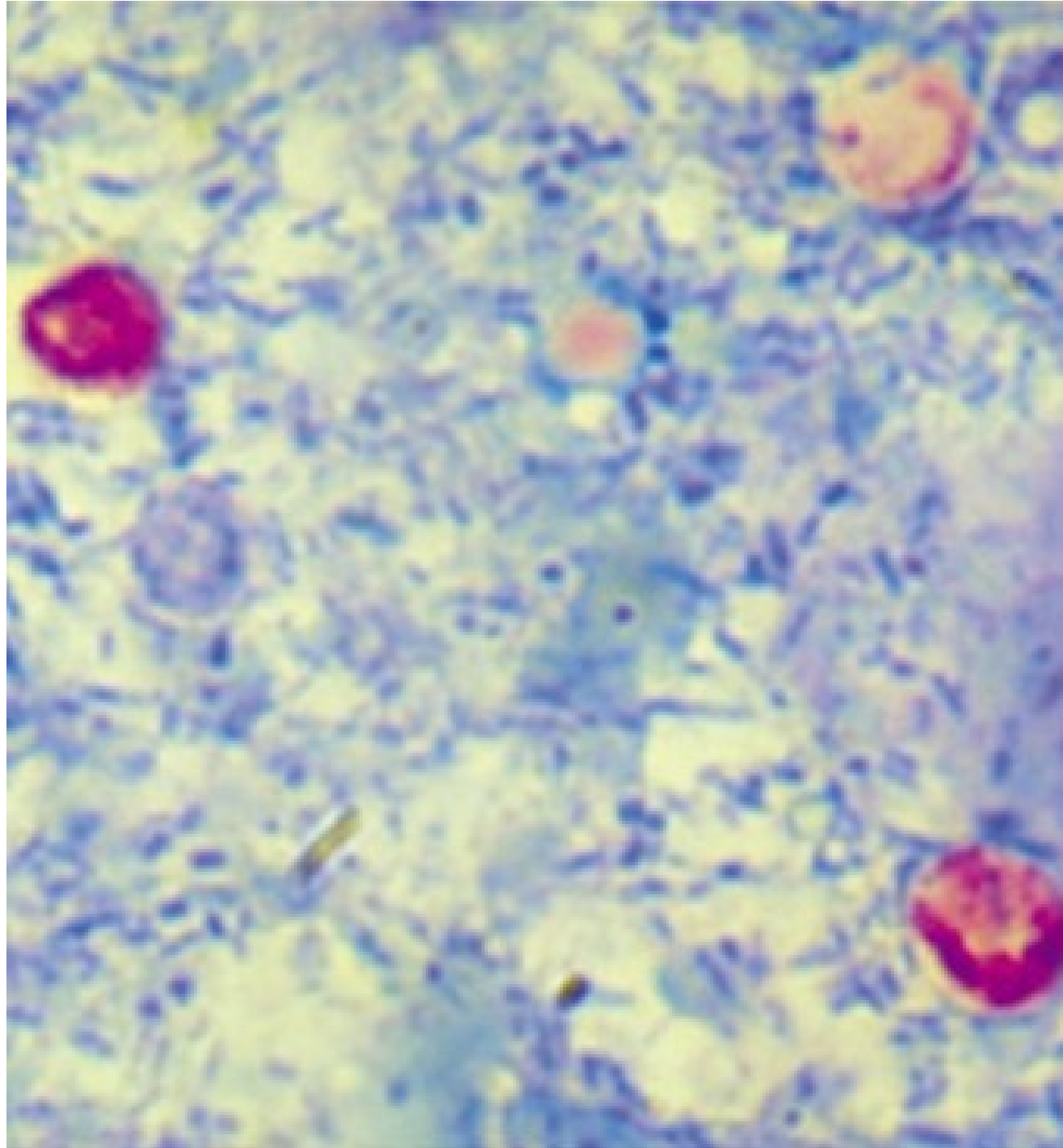


# Ziehl-Neelsenovo barvení



Zajímavostí je,  
že Ziehl-  
Neelsenovo  
barvení lze  
použít i pro  
skupinu  
parazitů, tzv.  
střevní kokcidie  
(kryptosporidia  
a cyklospory).

## Kryptosporodia



# Kultivace mykobakterií

- Před kultivací musí být provedeno moření.
- Používáme tekutou půdu Šulovu či Baničovu a vaječné půdy Ogawovu či Löwenstein-Jenssenovu. Vaječné půdy jsou tuhé vzhledem ke koagulaci vaječného bílku – neobsahují agar.
- I pevné půdy se nalévají do zkumavek a uzavírají zátkou. Není to jen kvůli ohrožení personálu, ale především kvůli vyschnutí půdy.
- Výsledky se odečítají po 1 (kontrola kontaminace) 3, 6 a pro jistotu i 9 týdnech kultivace. (Pozitivní výsledky se obvykle nacházejí po šesti týdnech).



# Vzhled kolonií mykobakterií

<http://www.stockmedicalart.com/>



# K tekuté Šulově půdě

- I pozitivní zkumavka je na první pohled čirá, protože nárůst mykobakterií je patrný jen u dna („modrej bordel“, jak to trefně označila studentka J. H. 😊)

*(Poznámka: Bordel případně může být i bílý)*



# Testy antituberkulotické citlivosti (nikoli antibiotické!)

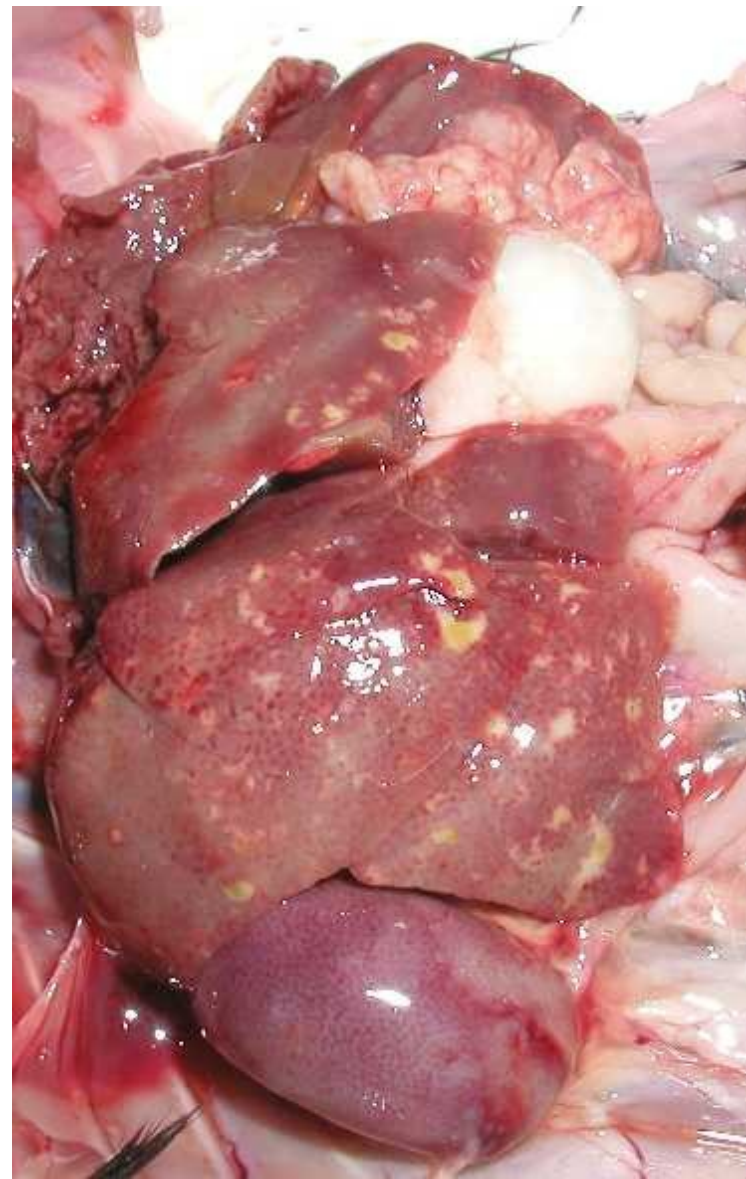
- **Antituberkulotika** jsou zvláštní látky, až na výjimky odlišné od antibiotik.
- Vždy se užívají kombinace tří či čtyř: rychle totiž vznikají rezistence, navíc některá působí jen intra- a jiná zase extracelulárně.
- Nelze používat difúzní diskové testy.
- Antituberkulotika proto přidáváme přímo do (pevné) kultivační půdy. Přidáme kontrolu růstu.
- **Mykobakterium roste → je rezistentní**
- **Mykobakterium neroste → je citlivé**

# Přehled běžně užívaných antituberkulotik

Antituberkulotikum	Zkratka
Isoniazid	H, INH
<b>Ethambutol</b>	<b>E</b>
<b>Rifampicin</b>	<b>R</b>
Pyrazinamid	Z
<b>Streptomycin</b>	<b>S, STM</b>

Tuberkulózní játra  
pokusného morčete

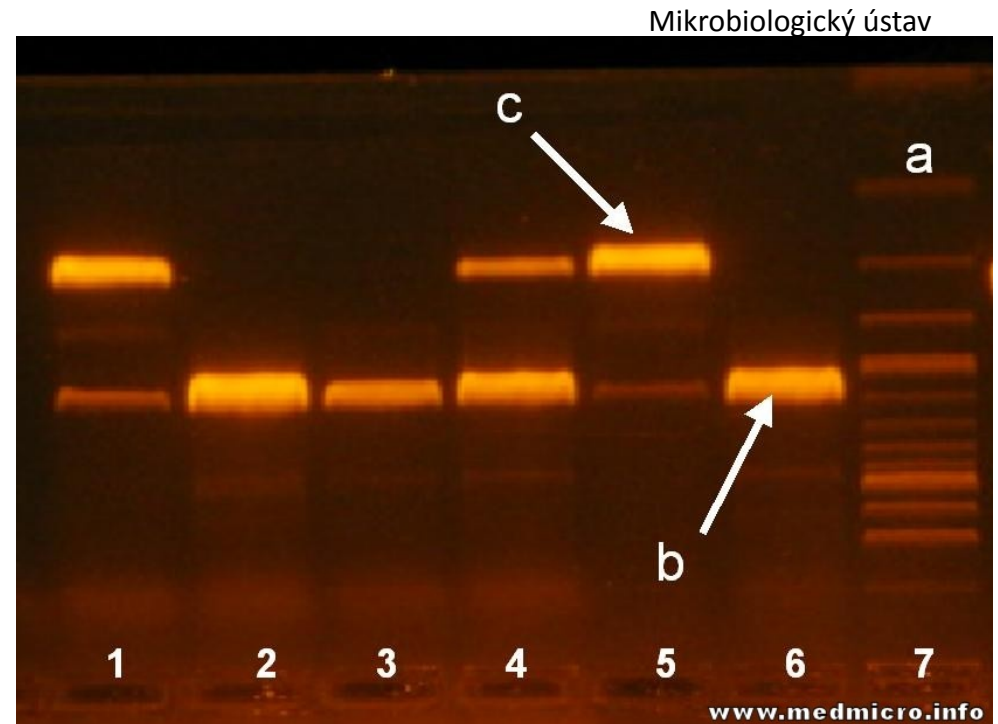
Věnovala dr. Jana Svobodová a dr. Lev  
Mezenský



# PCR v diagnostice TBC

- 1, 2, 3, 4 = pacienti
- 5 = pozitivní kontrola
- 6 = negativní kontrola
- 7 = ladder (žebříček)
- horní řádek = proužek vzorku (c)
- dolní = IC (b)

PCR je metodou, která se v diagnostice TBC používá více než v diagnostice jiných bakterií. Je to proto, že diagnostiku výrazně urychluje, přičemž u TBC příliš nehrozí riziko kontaminace z prostředí.



# PCR kit pro diagnostiku TBC





# Nepřímý průkaz TBC

- Nejdůležitějším typem imunity u TBC je buněčná imunita. Tvorba **protilátek** se vyskytuje, ale měřitelná množství jsou přítomna jen u části případů.
- Pozitivní nález protilátek lze považovat za známku infekce, zato však negativní nález má minimální informační hodnotu.
- **Buněčnou imunitu** lze testovat:
  - **kožním (tuberkulinovým) testem**, zvláště po vakcinaci
  - **testem uvolňování IFN-gama** (reakce pacientových buněk na antigenní výzvu)

# Kožní testy (Mantoux)

- Používají se pro **ověření účinnosti očkování**, ale také k průkazu případné latentní infekce (i když spíše jsou už nahrazeny testem produkce IFN gama).
- Na testy je potřeba **celý pacient**, nejde tedy o laboratorní test. Test provádějí dermatovenerologická či jiná specializovaná pracoviště. V poslední době se opouští a nahrazují následujícím typem testů
- **Pozitivní** jsou tyto testy v případě, že je aktivována buněčná imunita; jde vlastně o jistý typ opožděné alergie.

# Test uvolnění interferonu gama (Quantiferon<sup>©</sup> TB-GOLD)

- Moderní možností k ověření buněčné imunity je vyšetření **indukovaného uvolňování interferonu gama**, v praxi se používá prakticky výhradně komerčně dostupný test Quantiferon TB-GOLD.
- Bylo prokázáno, že při tuberkulóze, a to i latentní, dochází k tomu, že **tuberkulózní antigeny aktivují T-lymfocyty** a ty tvoří velká množství interferonu gama.
- Podobně lze tyto T-lymfocyty aktivovat nespecificky např. takzvaným **mitogenem**, ten se proto používá jako pozitivní kontrola.

# Quantiferon – tři zkumavky

- Odebírá se nesrážlivá (heparinizovaná) krev do tří zkumavek (potřebujeme lymfocyty!)
- První zkumavka obsahuje **mitogen (MIT)** – zde by mělo za normálních okolností **vždy** dojít ke stimulaci tvorby interferonu gama.
- Druhá zkumavka obsahuje **antigeny TBC (TB)** – zde by mělo dojít ke stimulaci tvorby interferonu gama **pouze u infekce TBC.**
- Třetí zkumavka **neobsahuje nic (NIL)** – zde by za normálních okolností **nemělo docházet** ke stimulaci tvorby interferonu gama.

# Quantiferon – hodnocení

- Koncentrace interferonu se měří metodou ELISA.
- Za **pozitivní** lze považovat výsledek, kdy T-lymfocyty reagují na stimulaci antigenem mykobakteria, avšak ve zkumavce neobsahující nic nedochází k tvorbě interferonu.
- Za **negativní** lze považovat výsledek, kdy T-lymfocyty reagují na stimulaci mitogenem, ale nereagují na stimulaci antigenem mykobakteria.
- **Neurčitý výsledek** se objeví (1) v případě, že T-lymfocyty nejsou aktivovány ani mitogenem, nebo naopak (2) se tvorba interferonu objeví i ve zkumavce, kde nic nebylo.

# Příklad hodnocení\*

\*může se lišit u jednotlivých typů testu

NIL [IU/ml]	TB minus NIL [IU/ml]	MIT minus NIL [IU/ml]	Výsledné hodnocení testu	Přítomnost infekce <i>M. tuberculosis</i>
≤ 8,0	< 0,35	≥ 0,5	Negativní	Nepravdě- podobná
	≥ 0,35 a < 25% hodnoty NIL	≥ 0,5		
	≥ 0,35 a ≥ 25% hodnoty NIL	libovolná hodnota	Pozitivní	Pravděpodobná
	< 0,35	< 0,5	Neurčitý	Nelze určit
≥ 0,35 a < 25% hodnoty NIL		< 0,5		
> 8,0	libovolná hodnota	libovolná hodnota		



# Quantiferon – zásady odběru

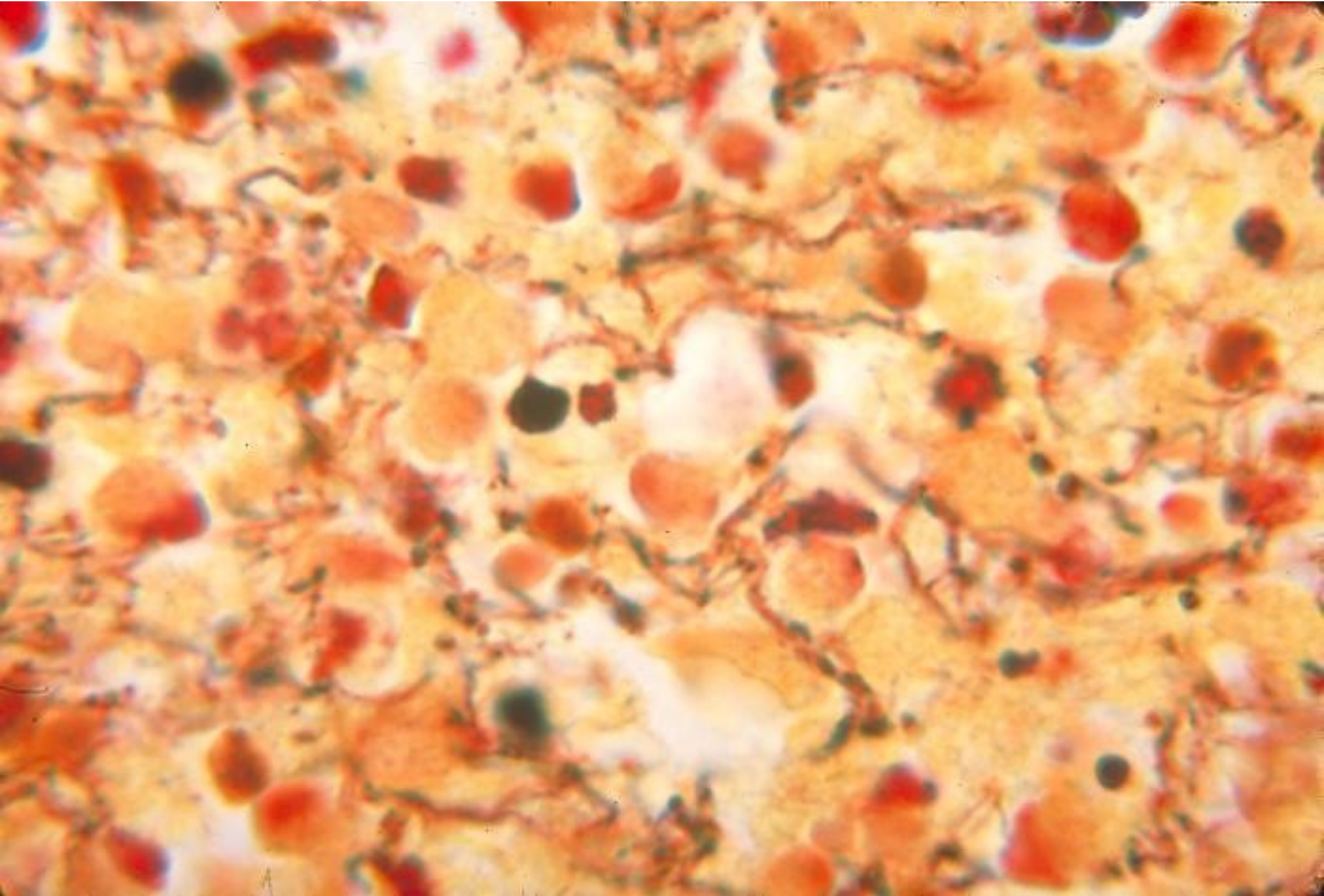
- Uchovávat prázdné odběrové zkumavky důsledně při **4–25°C**.
- Odebrat **správný objem krve** (3 x 1 ml).
- Po odběru opakovaným obrácením zkumavky **dostat do kontaktu vzorek krve s lyofilizovanými antigeny** přítomnými na vnitřním povrchu zkumavky.
- Zkumavky **po odběru uchovávat při teplotě 17–27 °C**.
- Vzorek dopravit do laboratoře k dalšímu zpracování co **nejdříve, nejpozději 16 hodin po odběru**.

# Mikroskopie nokardií a aktinomycet

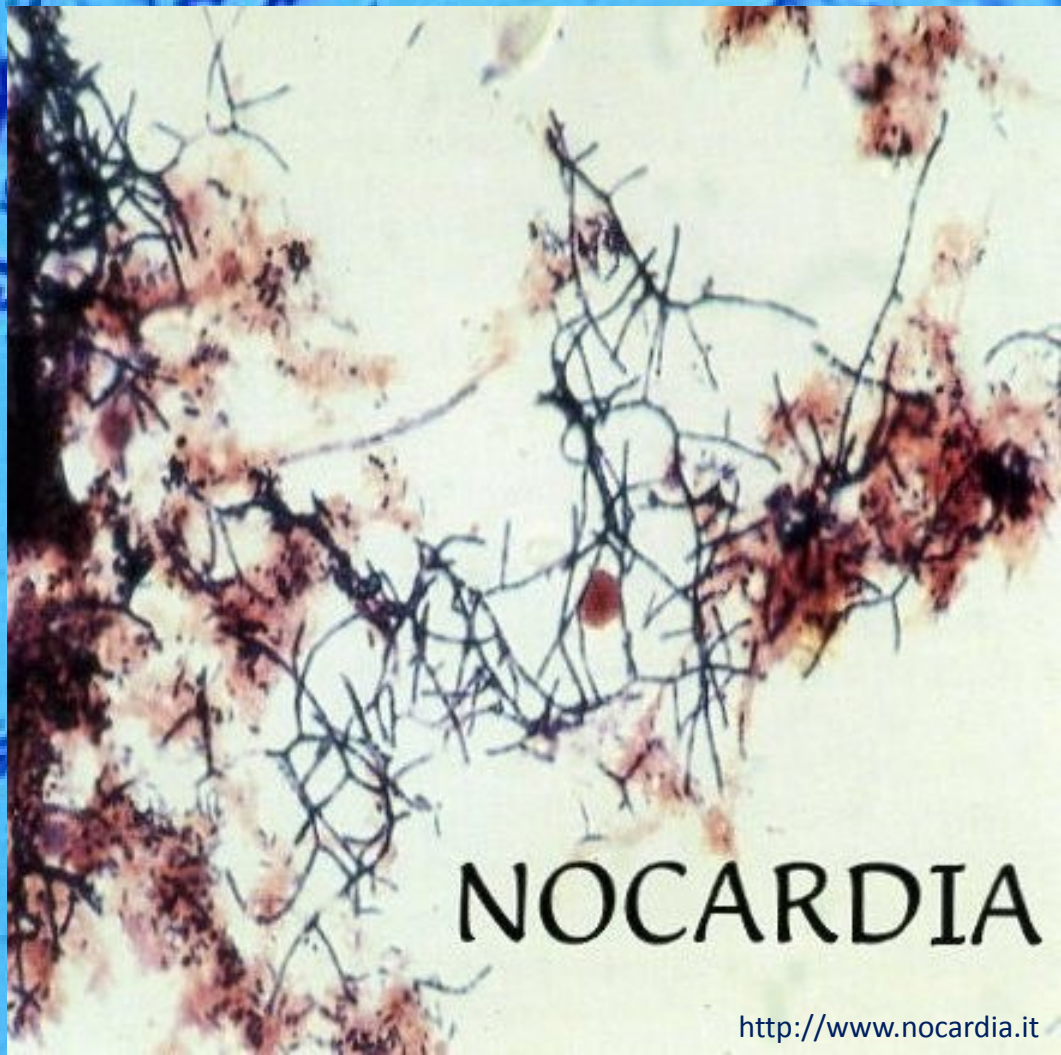
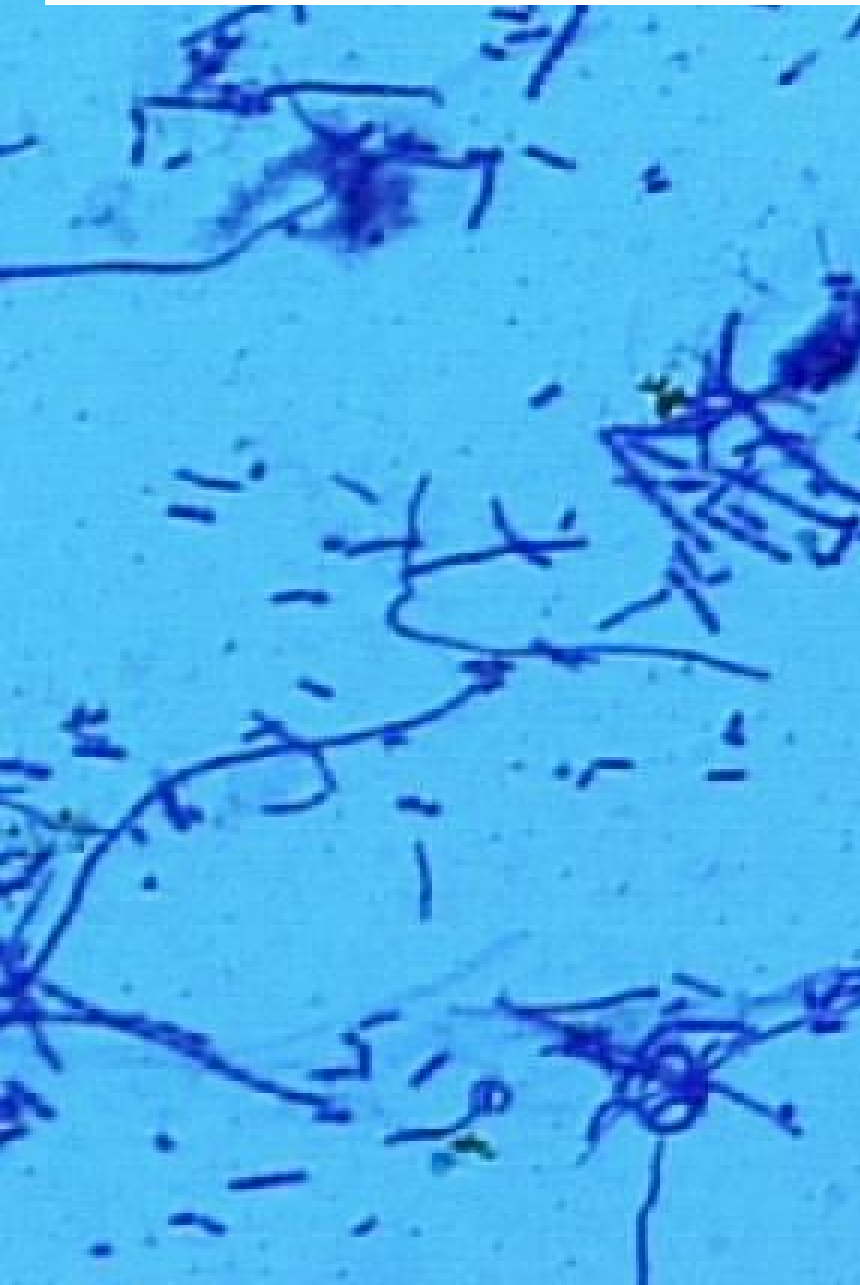
- Částečně rezistentní aktinomycety a nokardie se dle Grama barví, i když špatně. Jsou také pleomorfní (různotvaré).
- Obě jsou typické **větvenými vlákny**, která se barví **grampozitivně**, ačkoli některé části vláken se mohou jevit gramnegativně nebo mohou zůstat zcela nezbarvené.
- Někdy se v mikroskopii také mohou objevit krátké (kokoidní) formy.

# *Actinomyces israelii*

pathmicro.med.sc.edu



# *Nocardia asteroides*



**NOCARDIA**



# Kultivace nokardií a aktinomycet

- I když jsou oba rody v mnohém podobné, jedno se liší: nokardie jsou striktně aerobní, aktinomycety rostou za anaerobních podmínek
- Popište kolonie na KA a krevním VL agaru. Všimněte si, které bakterie rostou za aerobních podmínek a které za anaerobních

<http://filebox.vt.edu>

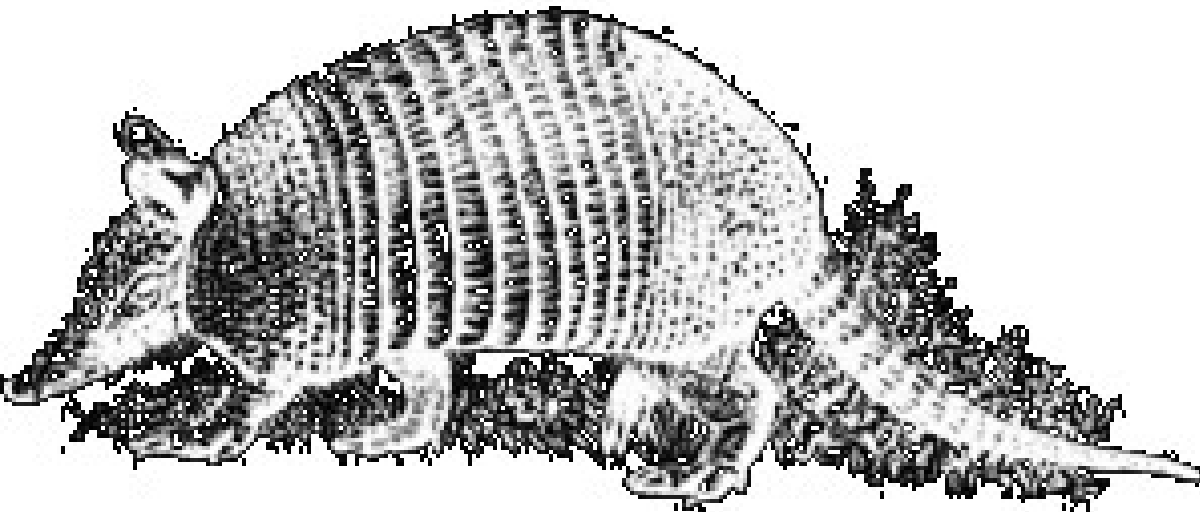


# Citlivost nokardií a aktinomycet na antibiotika

- **Antibiotická citlivost** se na rozdíl od mykobakterií dá u nokardií a aktinomycet stanovit difusním diskovým testem. Musíme ale počítat s tím, že rostou pomalu a špatně.
- U **nokardiózy** se v léčbě používá ko-trimoxazol, případně ampicilin či makrolidy.
- U **aktinomykózy** se používá penicilin, popřípadě doxycyklin a další antibiotika.

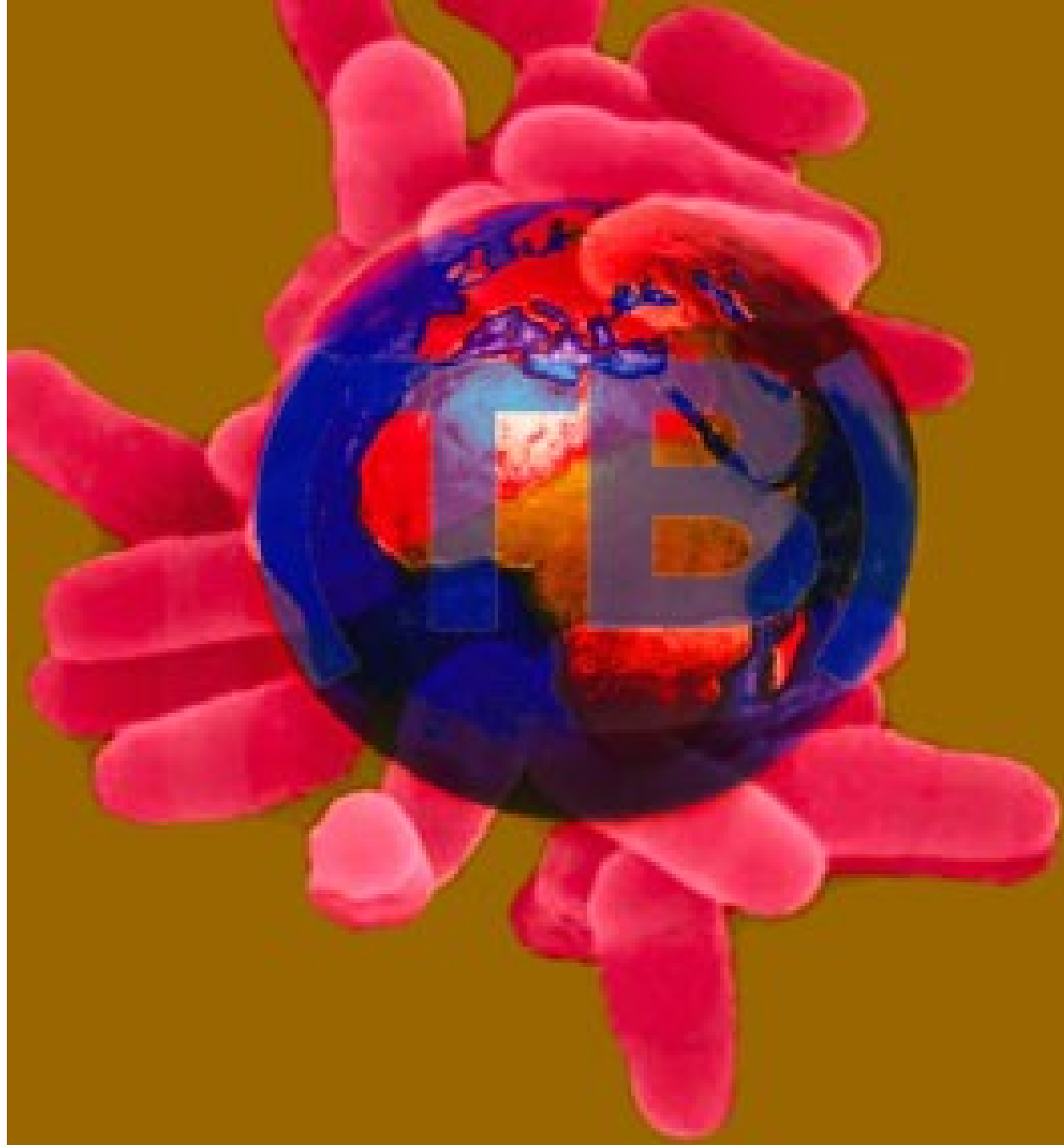
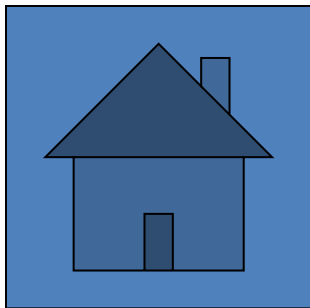
# Diagnostika lepry leprominovým testem

- **Pásovec devítipásý (anglicky nine banded armadillo)**
- Je nezbytný při výrobě **leprominu**
- Tato látka je používána v **leprominovém testu**, který je obdobou tuberkulinového testu u TBC





Logo jednoho kongresu o TBC



Klinická  
charakteristika  
spirálních  
bakterií

# 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 pravděpodobností jde o to, co si myslela Růženka. Pro jistotu ještě odebrala sérum na průkaz protilátek...



[www.med.sc.edu](http://www.med.sc.edu)



[www.borrelia.de](http://www.borrelia.de)

# Erythema migrans

- Toto je obrázek erythema migrans studenta M. M., který laskavě souhlasil s využitím ve výuce

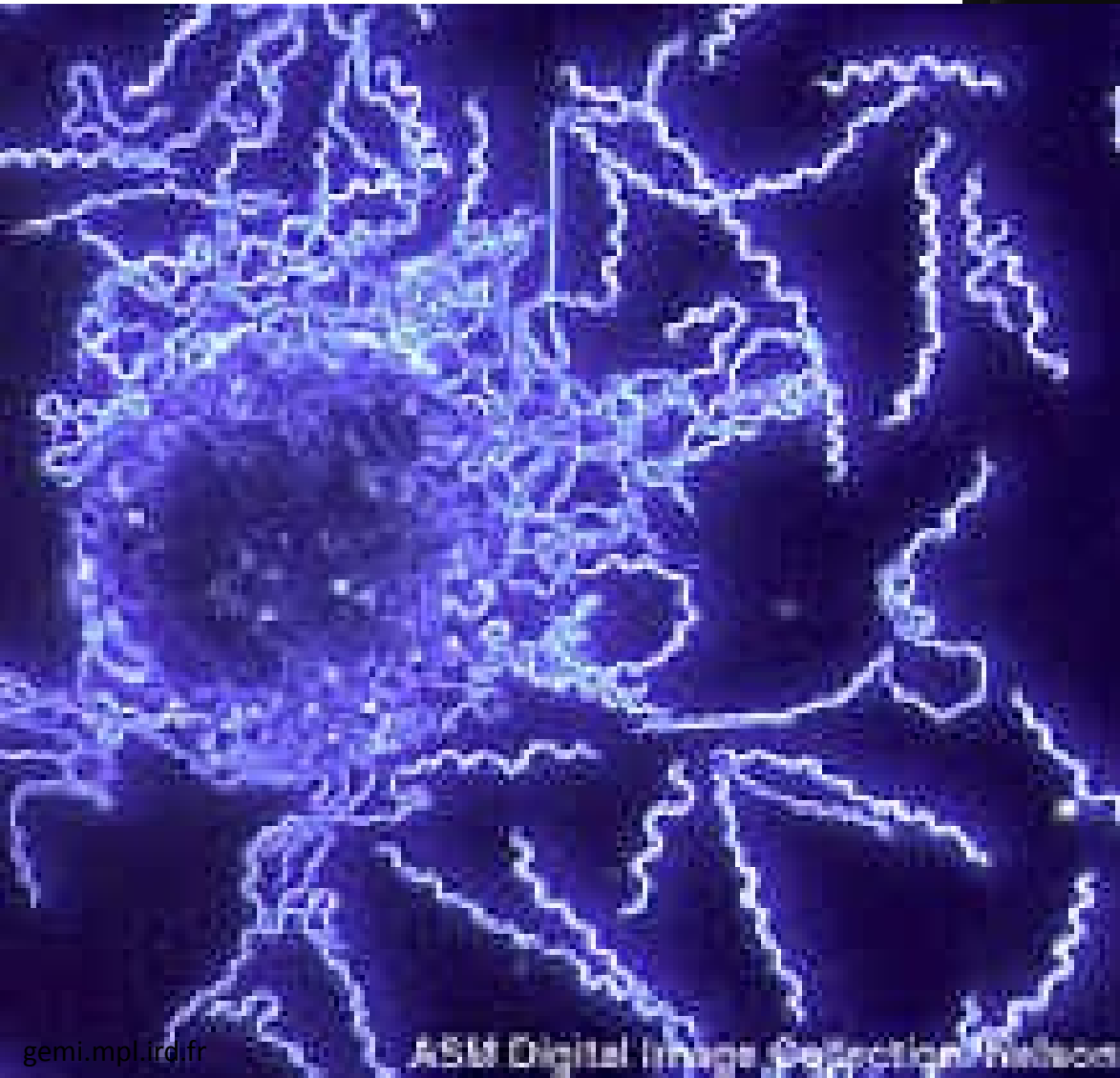




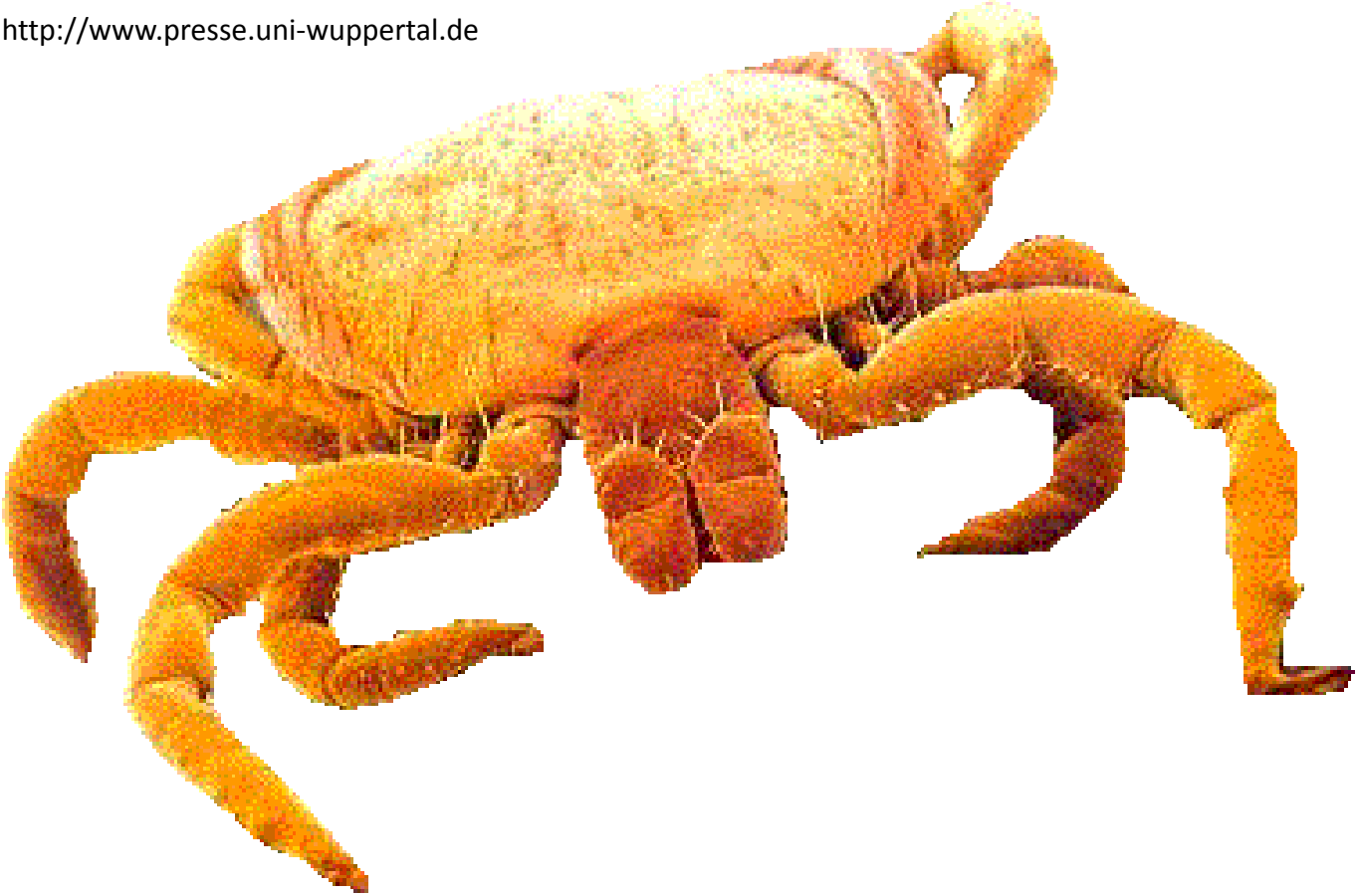
# Viníkem byla

- *Borrelia afzelii*, jedna z borrelií, vyvolávajících Lymeskou nemoc a patřících do druhu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (= „v širším slova smyslu“)
- Tento druh „v širším slova smyslu“ se rozpadá na řadu genomospecies. 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*)

# *Borrelia burgdorferi*

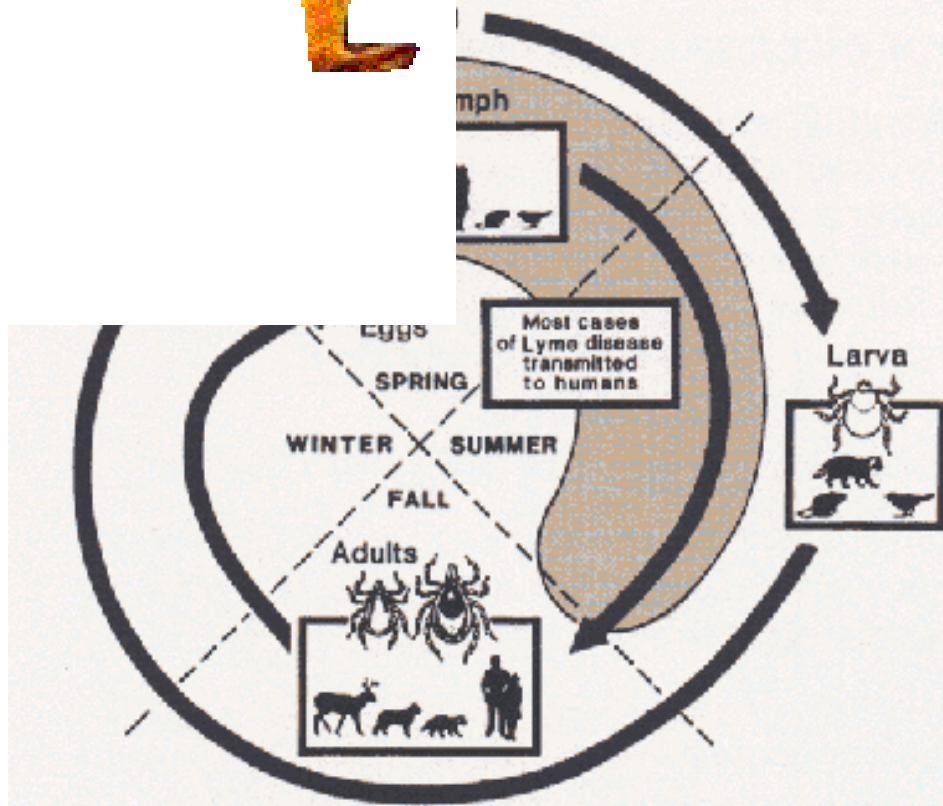




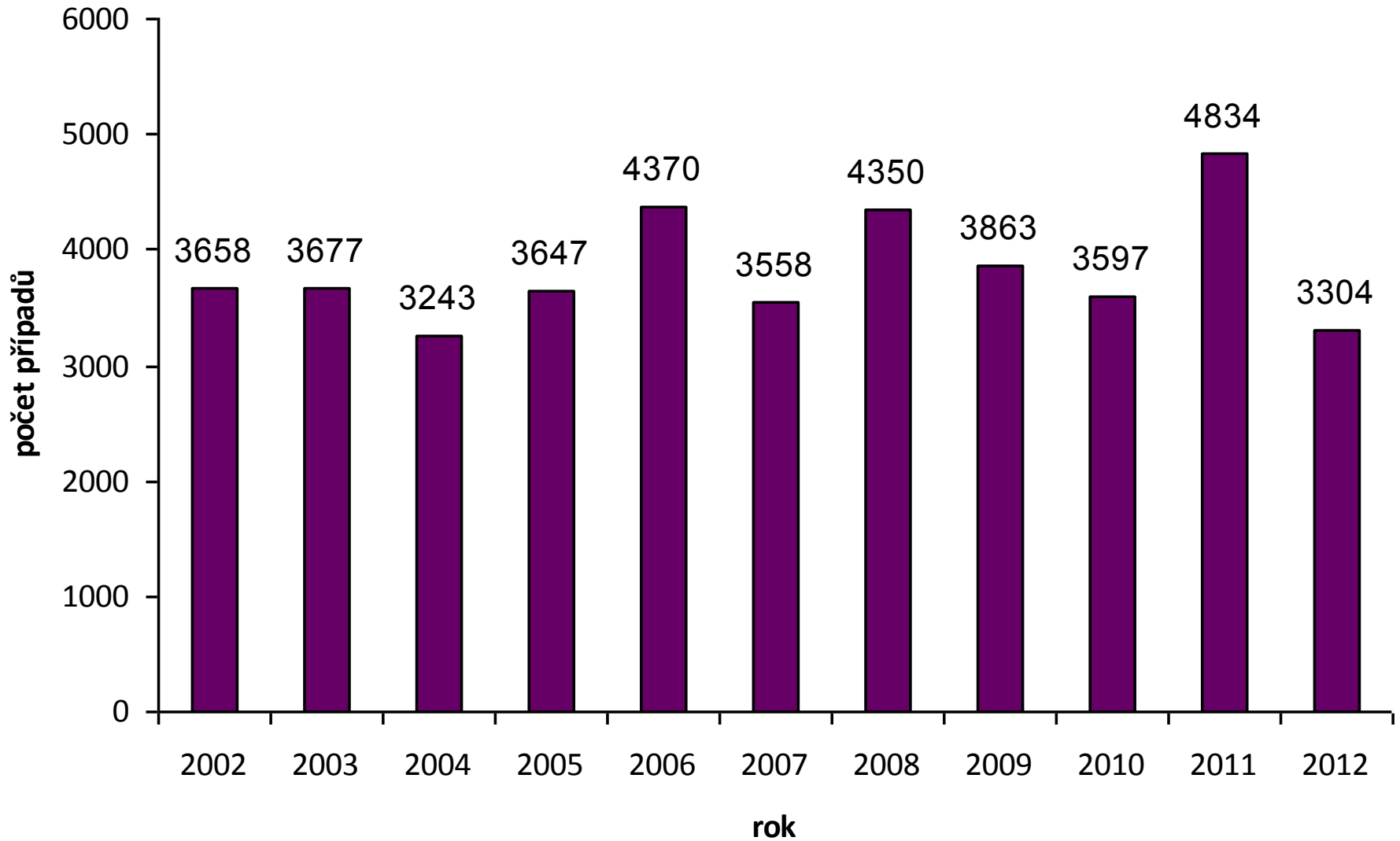


Lymeská nemoc –  
zoonóza,  
přenášena klíšťaty

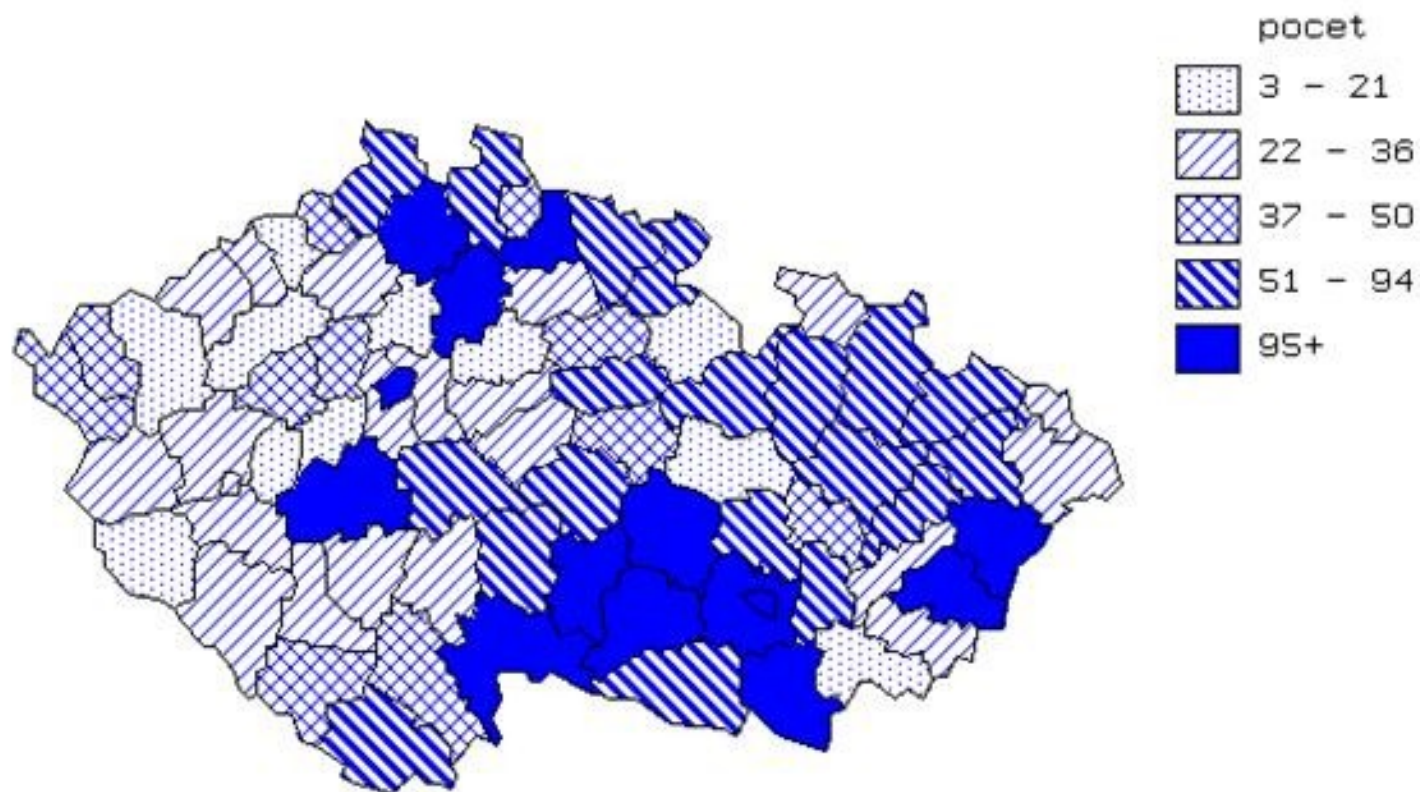
e disease ticks



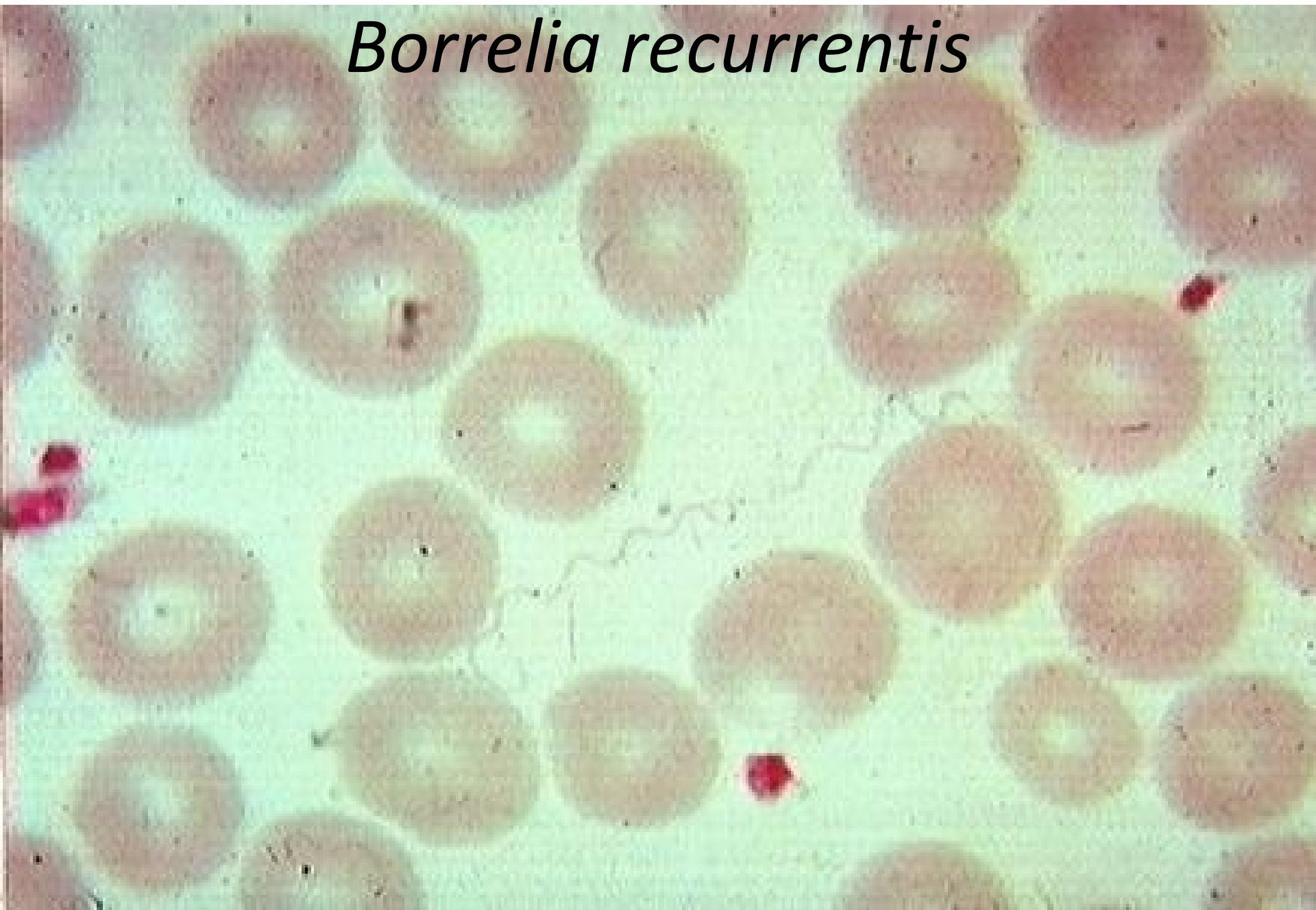
## Počet případů Lyme ské borreliózy v ČR



# Počet onemocnění Lymeskou boreliózou v ČR v roce 2011 podle okresu nákazy, Epidat



# *Borrelia recurrentis*

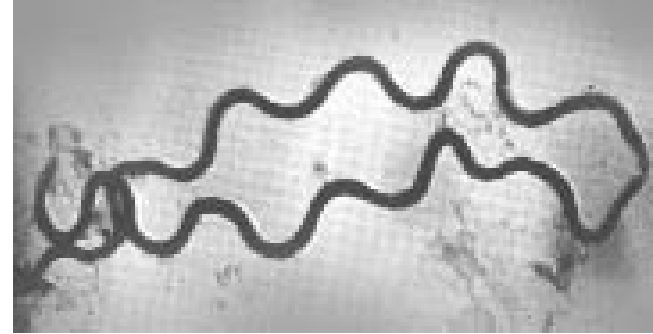


# Příběh druhý (vymyšlený, ale základ vychází ze skutečného příběhu)

- Když Lou zjistila, že „perník“ opravdu potřebuje, a čím dál víc, nebylo pro ni daleko k rozhodnutí **vydělat 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 Lou byla těhotná. Zároveň si ale našla vředy na genitáliích a gynekoložka jí odebrala krev na serologické vyšetření. To vyšlo pozitivní. Lou odmítla interrupci ze zdravotních důvodů, jednak se na vše přišlo dost pozdě, jednak touha po dítěti byla silnější.
- Lou byla léčena, bohužel nevhodně zvoleným antibiotikem. Dítě se narodilo nemocné a po dvou týdnech zemřelo na sekundární klebsielovou sepsi



# Viníkem zde bylo

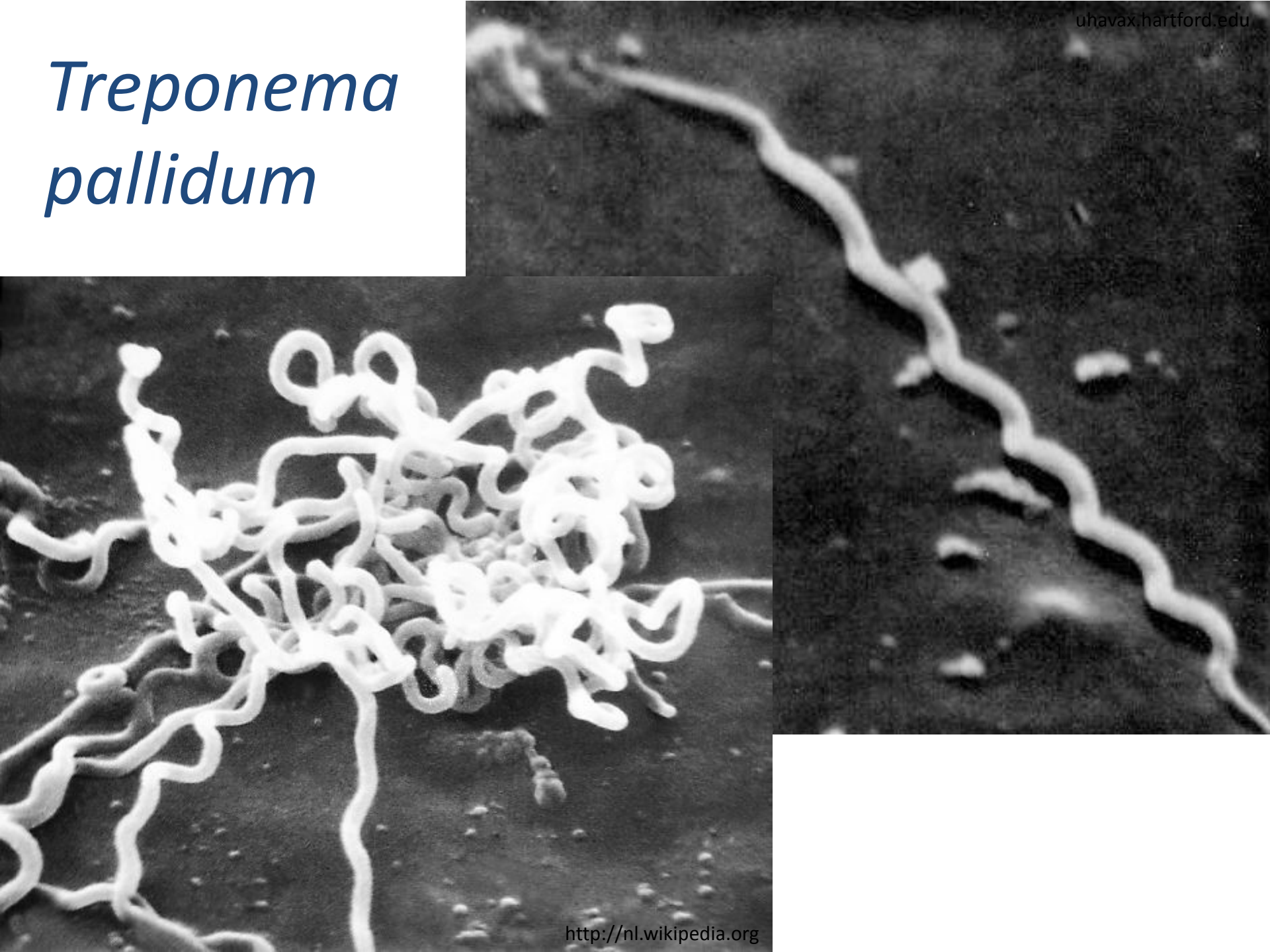
- *Treponema pallidum ssp. pallidum*, původce syfilis (lues, příjice)
- Syfilis je klasická pohlavní nemoc. Přenáší se výhradně sexuálně. Jde ovšem o systémové onemocnění – v pokročilých stádiích postihuje celé tělo postiženého člověka (gummata, disekce aorty, neurolues, psychické příznaky)
- Některé poddruhy *T. pallidum* a některá jiná treponemata způsobují jiné, jinak přenášené choroby (framboesie – yaws, *T. pertenue*)
- Některá treponemata způsobují orální infekce (*T. denticola* – vztah k parodontitidě), nebo jsou i nepatogenní



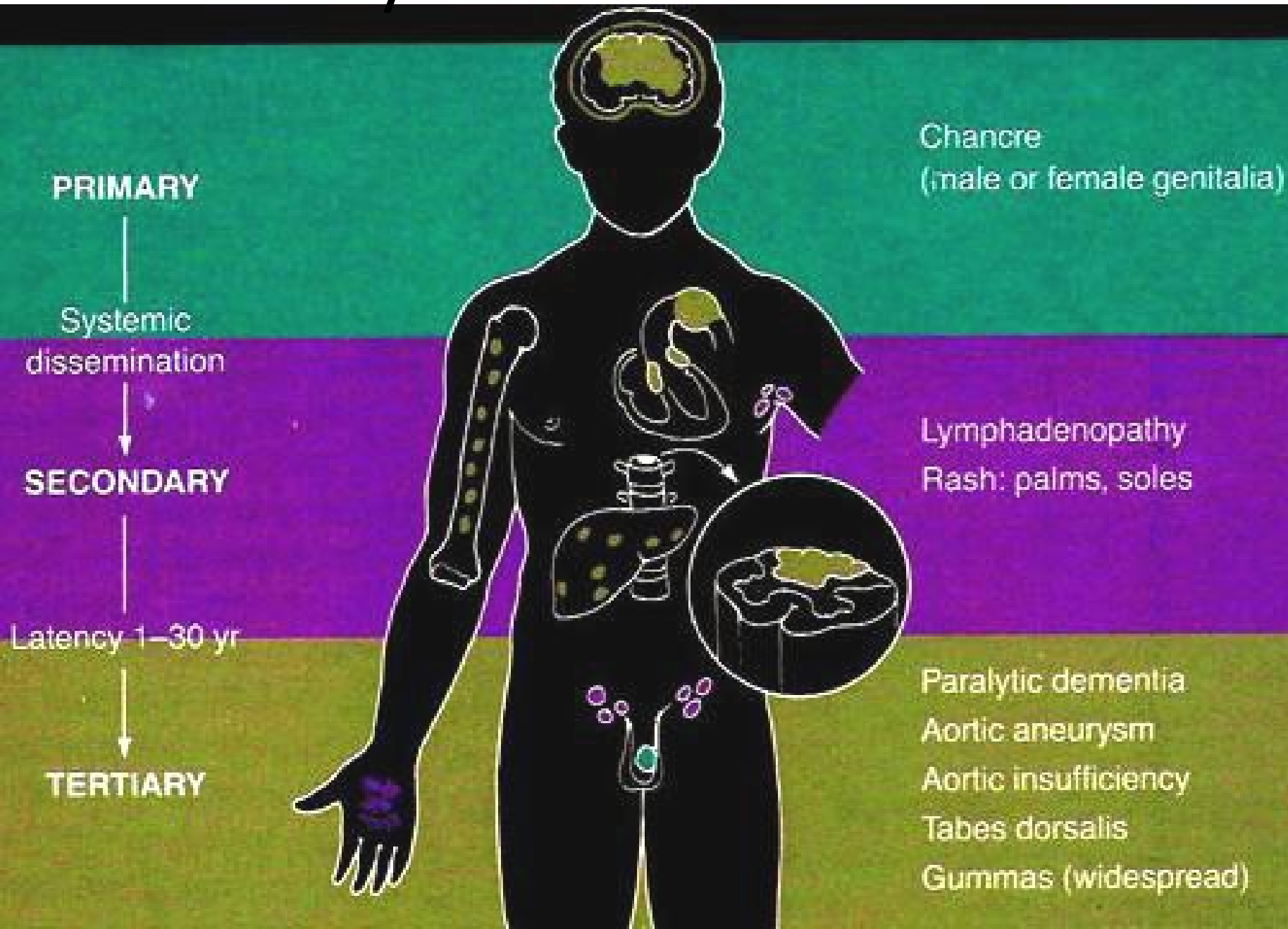
# Gramatická poznámka

- *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.

# *Treponema pallidum*



# Průběh syfilis



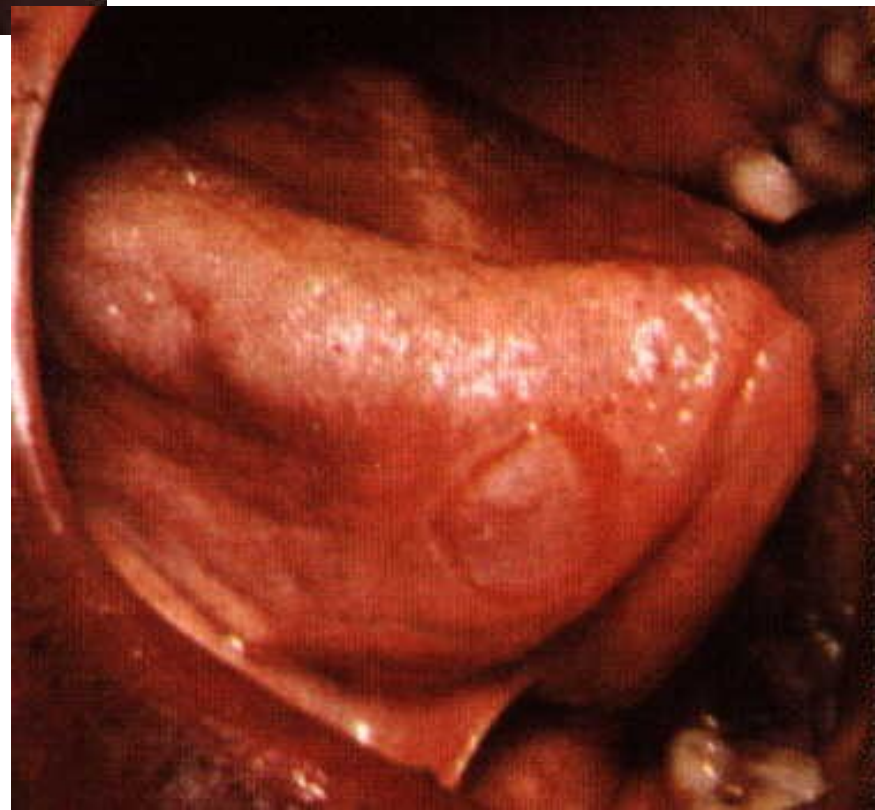


primární syfilis  
(„šánkr“)

uhavax.hartford.edu (2x)

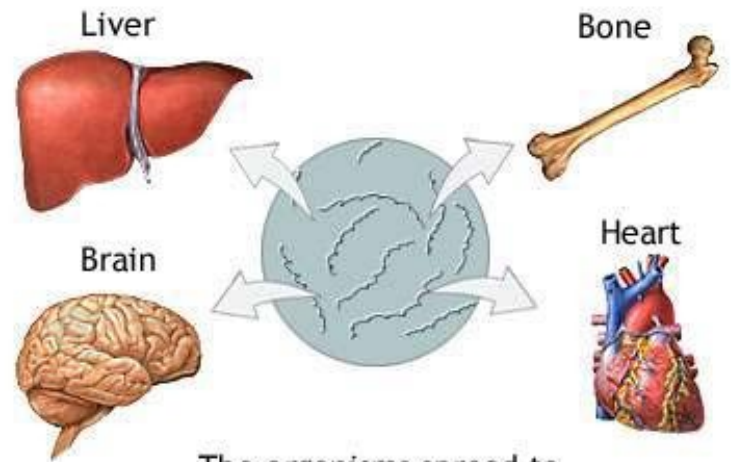
## Průběh syfilis

sekundární  
syfilis



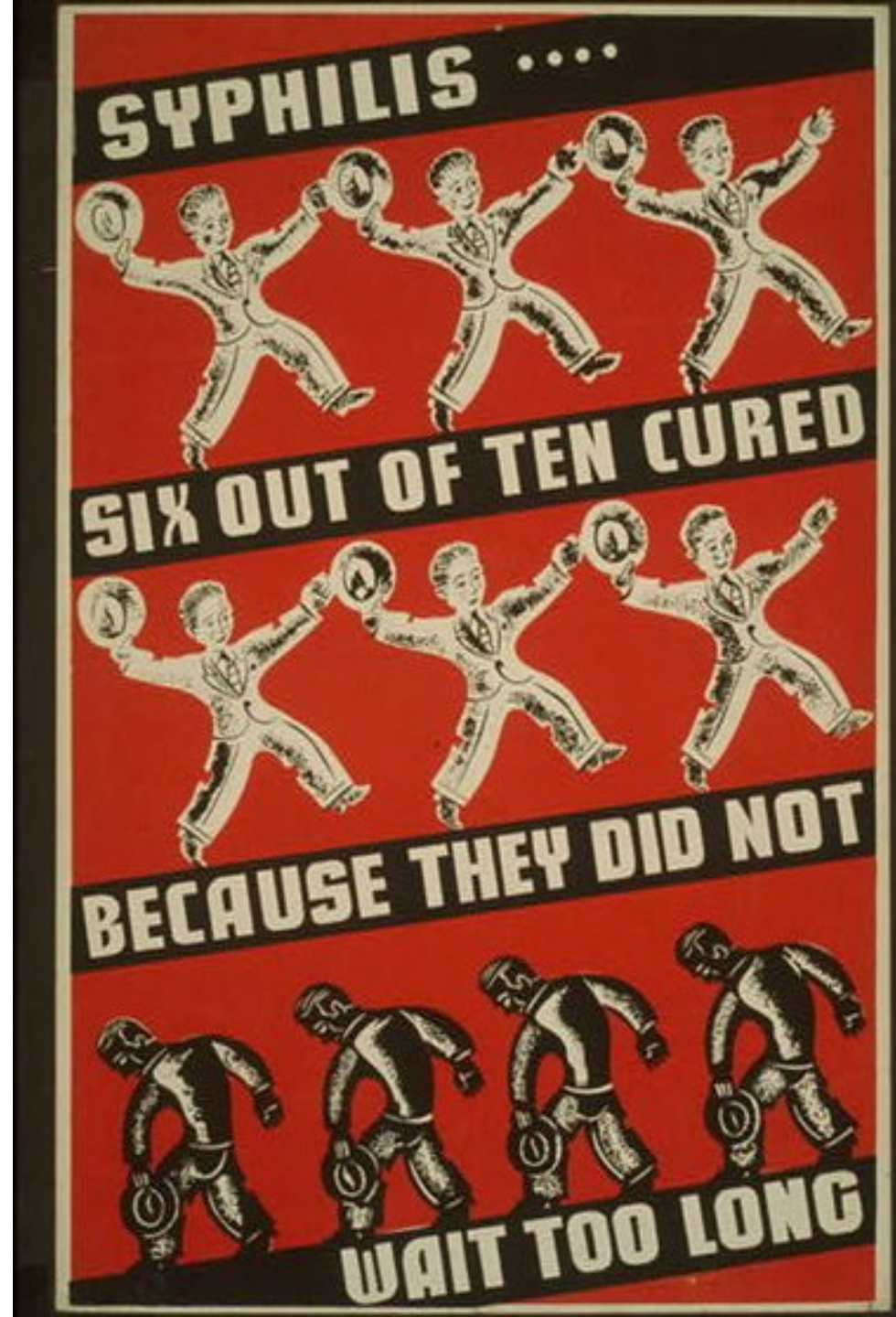


# Terciárni syfilis

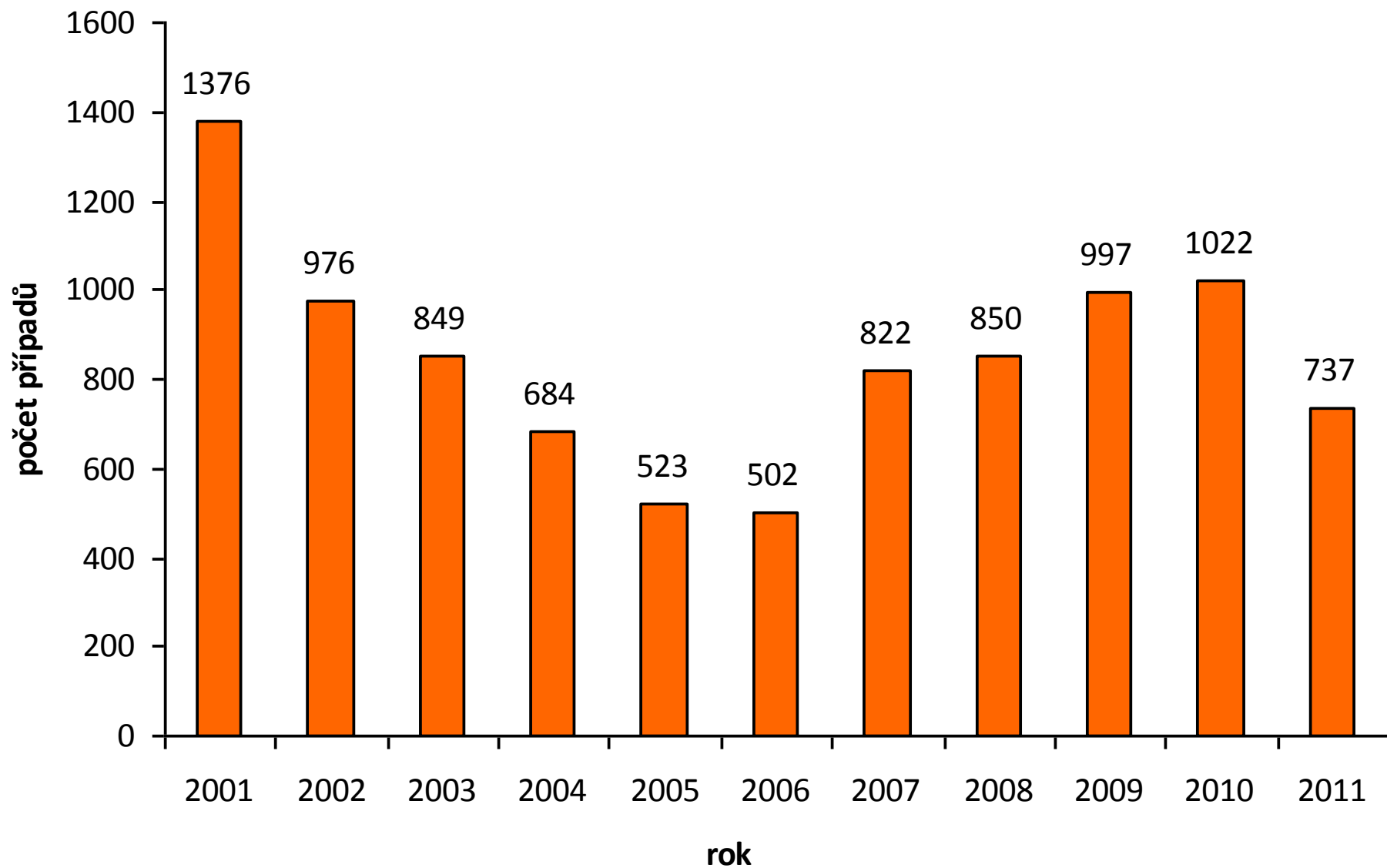


The organisms spread to various organs causing lesions or gummas

# Syphilis



## Počet případů lues v ČR

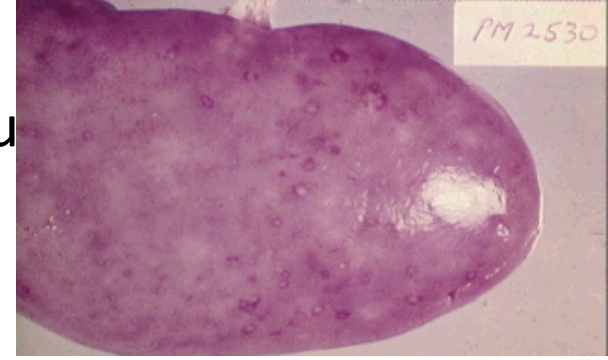




# Yaws (framboesie)



Ledvina postižená  
příslušnou chorobou



# Příběh třetí

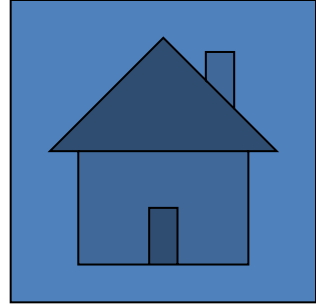
www.med.sc.edu

- 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

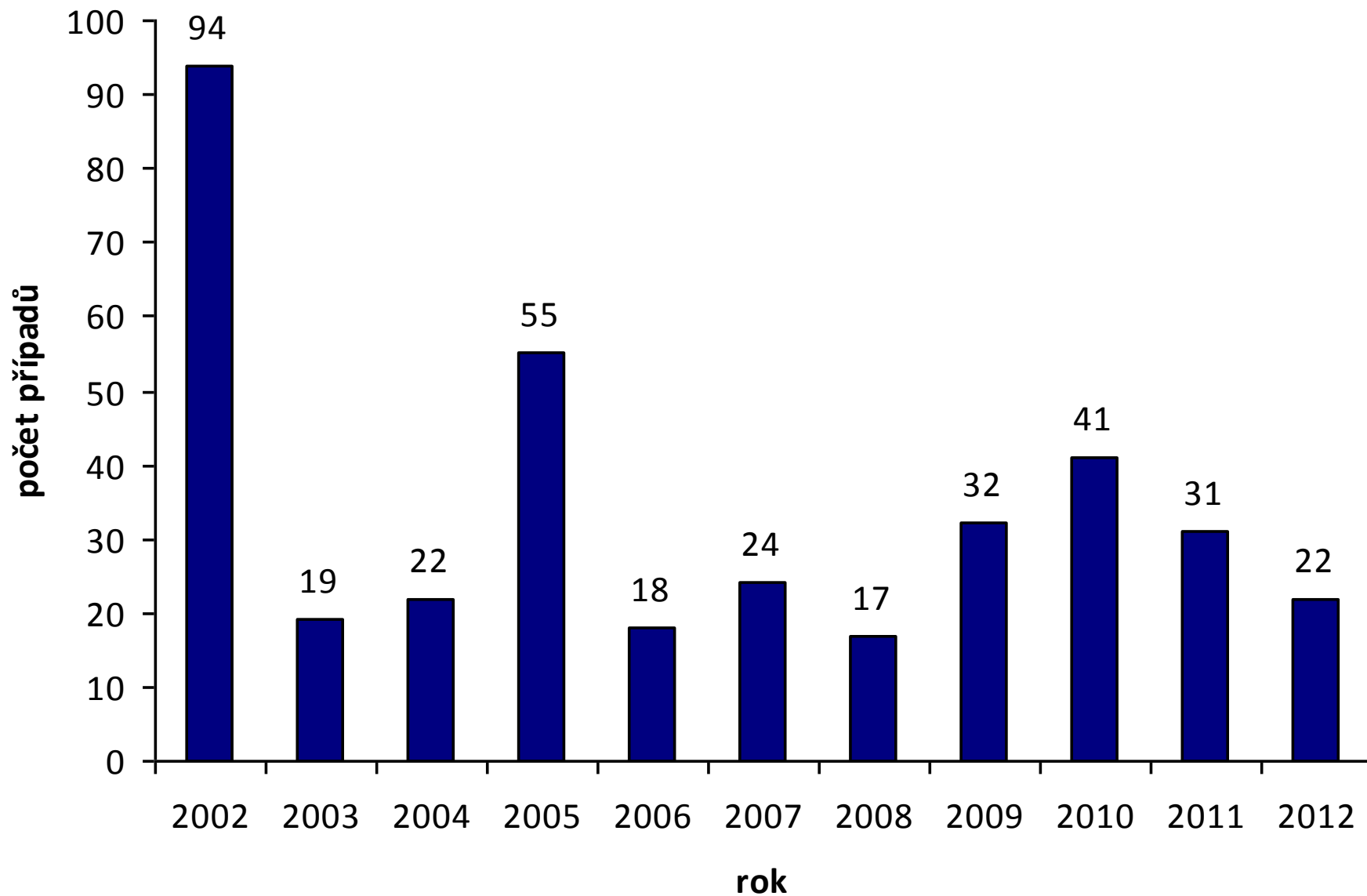


# Viníkem je...



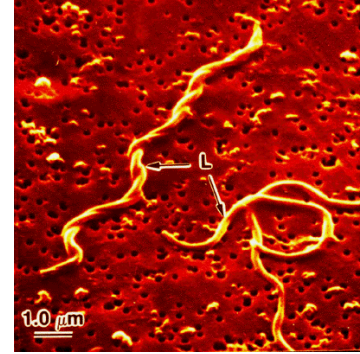
- *Leptospira interrogans* ser. Icterohemorrhagiae
- Dříve se jednotlivé serovary leptospir považovaly za samostatné druhy, nyní se všechny patogenní považují za součást druhu *Leptospira interrogans* (druhý druh *Leptospira biflexa* je nepatogenní)
- Příznaky mohou být různé, od „chřipkotyfových“ příznaků serovaru Grippotyphosa (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 😊)*

## Výskyt leptospirózy v ČR



Mikrobiologická  
charakteristika a  
diagnostika  
spirochet

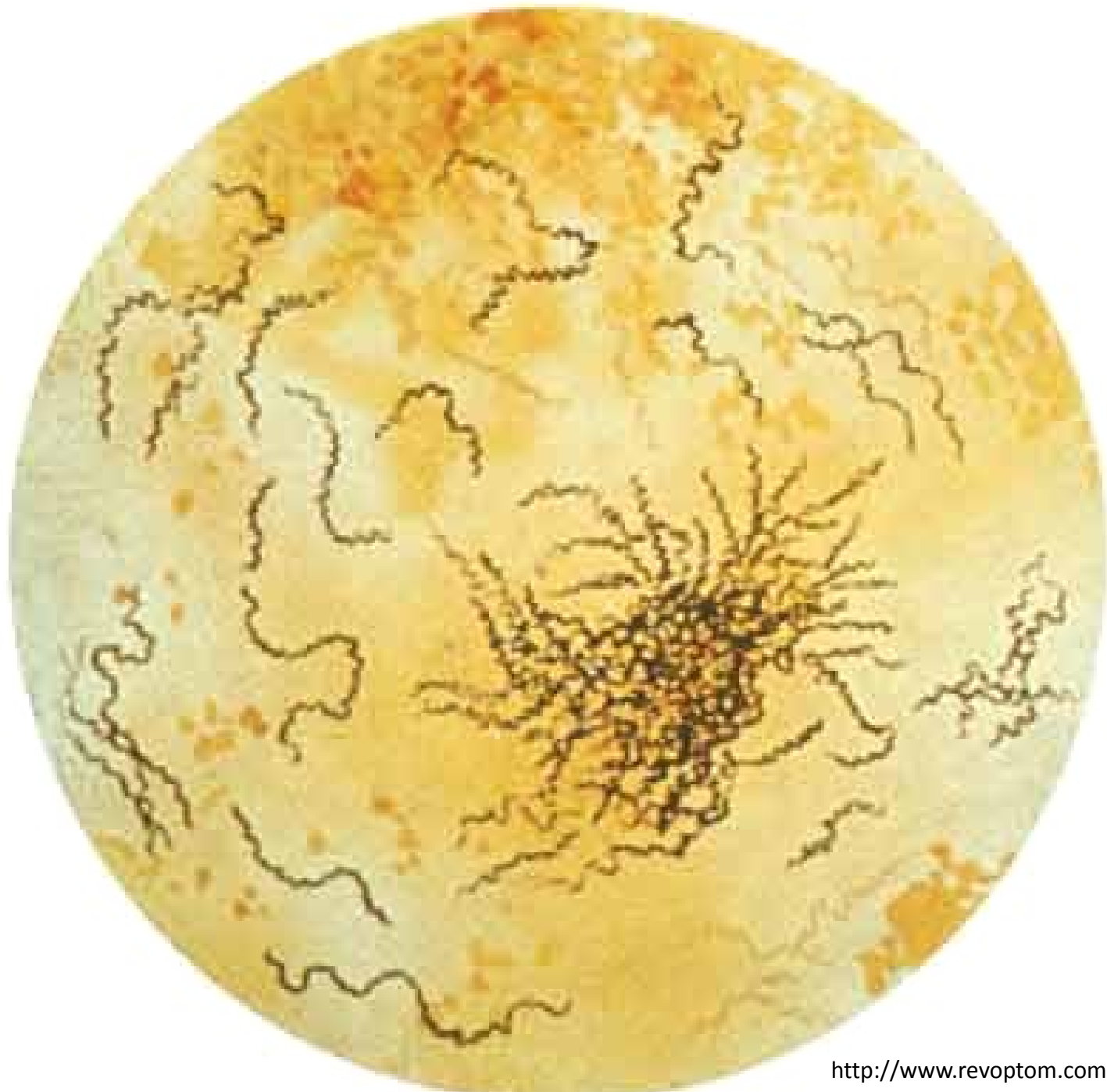
# Spirochety



- Borrelie (ale také treponemata a leptospiry) jsou spirochety, tedy spirální bakterie.
- Jejich buněčná stěna je blízká gramnegativní, ale podle Grama se nebarví už proto, že jsou hrozně tenoučké. Mikroskopovat je lze pouze pomocí zástinu, fázového kontrastu, fluorescence anebo imunofluorescence (což není totéž!)
- Spirochéty se obtížně kultivují
  - (borrelie a leptospiry lze kultivovat ve speciálních médiích)
  - *T. pallidum* nelze v podmínkách *in vitro* kultivovat

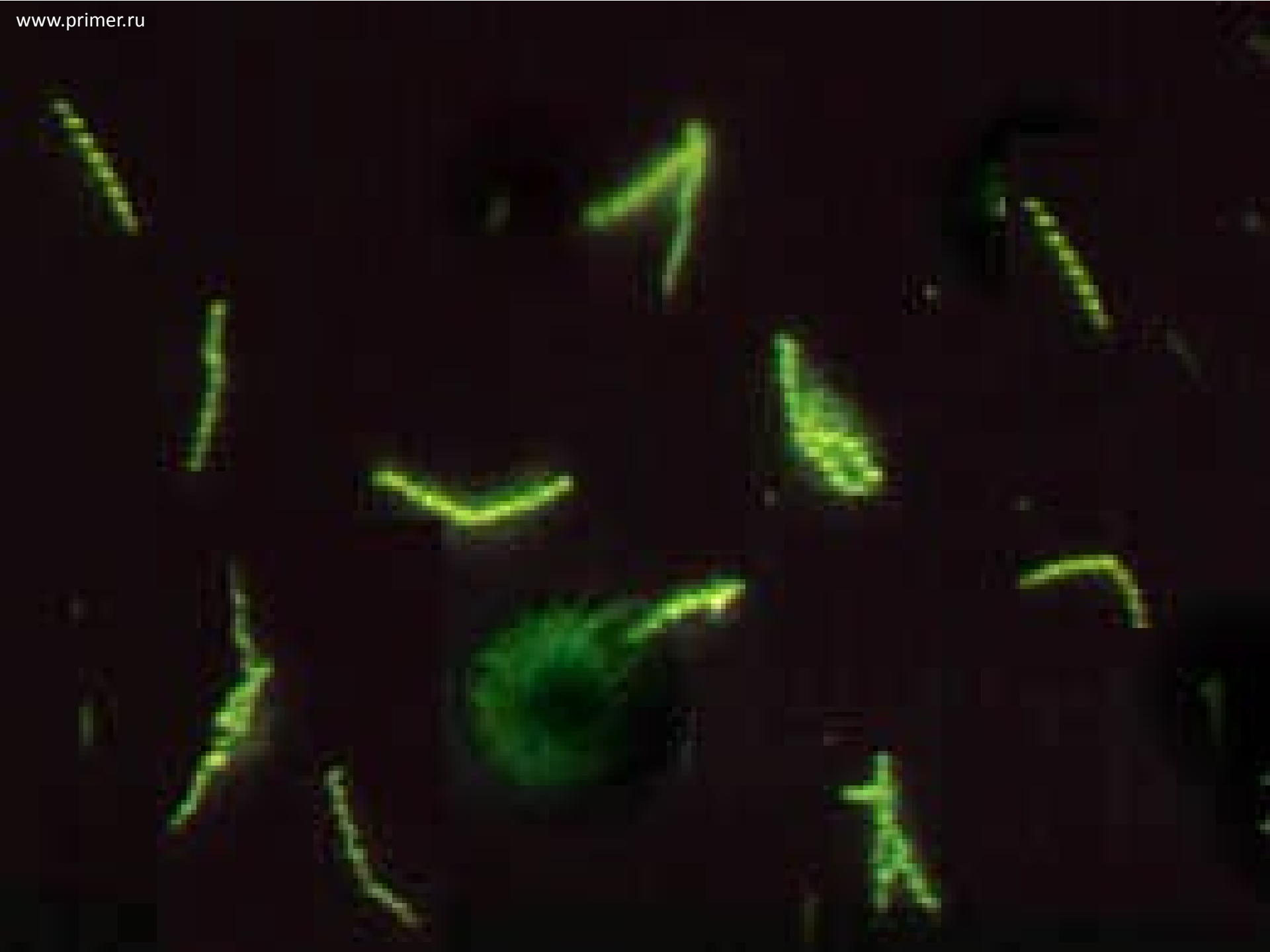


*Treponem  
pallidum*



# 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. *Zde je výjimka – kromě seškrabu z vředu lze posílat i plnou krev, i když výtěžnost vyšetření je menší.*



# Přímý průkaz syfilis – přehled

- RIT – Rabbit infectivity test. Z etických důvodů i z důvodu pracnosti se použití RIT minimalizuje.
- Zástin – hledají se zářící treponemata na tmavém pozadí
- Přímá IMF – další, avšak pracná přímá metoda
- PCR – i z krve

# New Zealand Rabbit užívaný k RIT

[www.rockinjawrabbits.com](http://www.rockinjawrabbits.com)

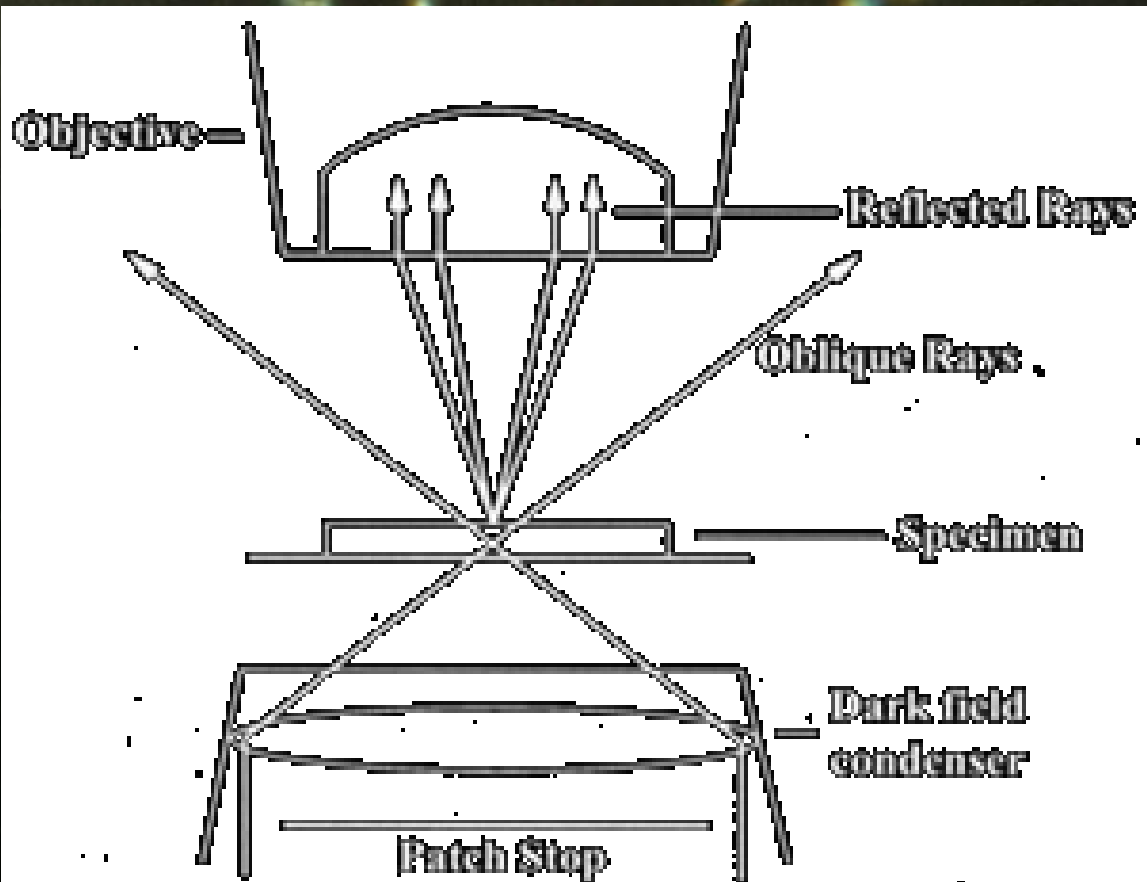


# Zástinová mikroskopie

\*anglicky dark field,  
z toho anglický název  
zástinové  
mikroskopie „dark  
field microscopy“

Mikrobiologický ústav

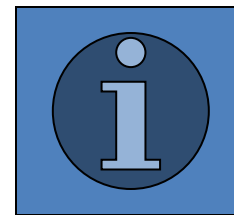
Pouze paprsky lomící se na preparátu dopadají do oka pozorovatele. A proto oko pozorovatele vidí temné pole\* se zářícím(-i) objektem(-y)



4B) T.pallidum - zástin

# Poznámky k mikroskopii

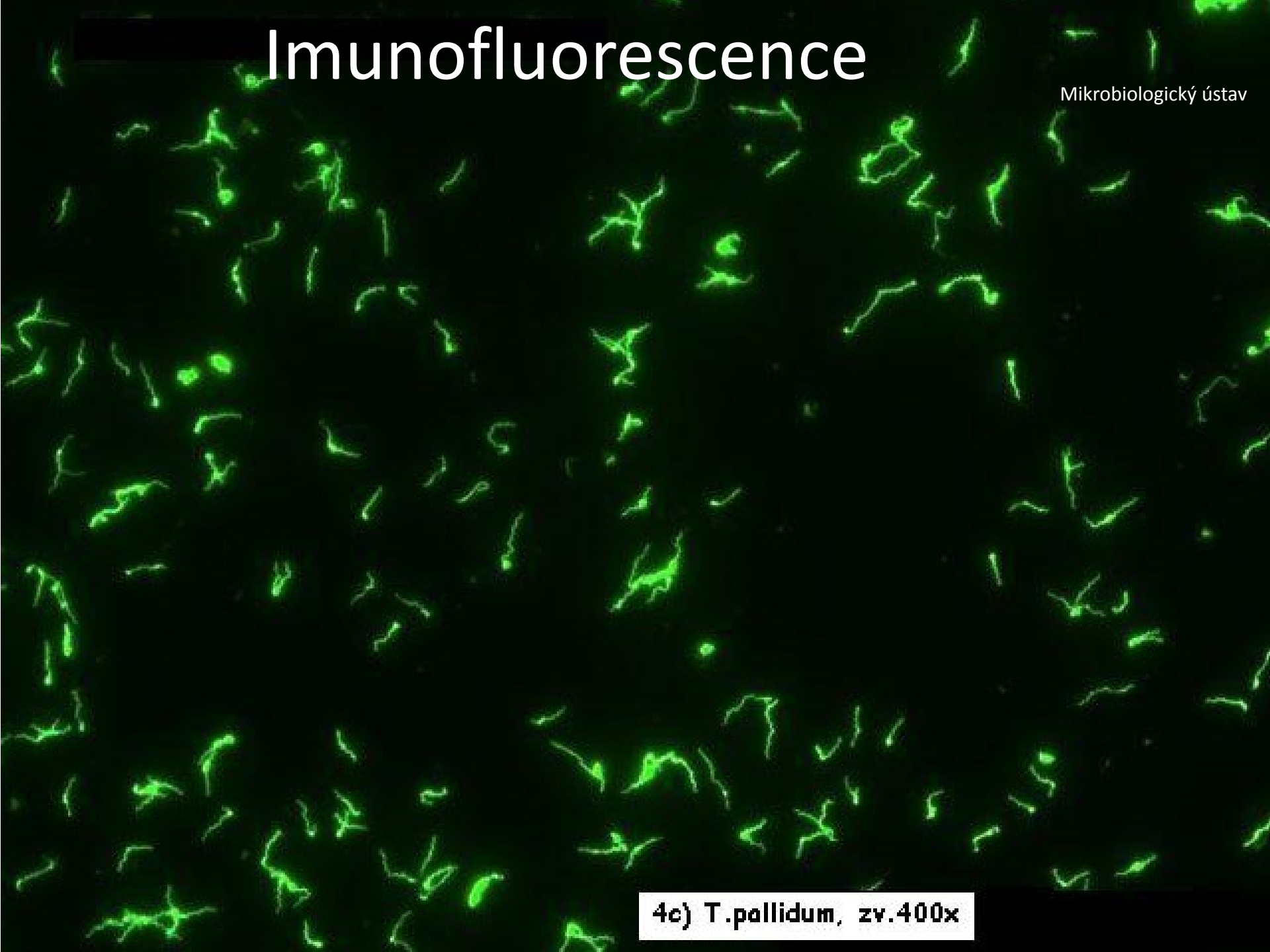
- Setkáváme se s různými typy mikroskopie:
- **Nativní preparáty** – používá se krycí sklíčko, nefixuje se, nepoužívá se většinou imerzní systém
- **Barvené preparáty** – fixuje se, po obarvení se zpravidla prohlíží imerzí
- **Zástinová mikroskopie** – jde o zvláštní případ nativního preparátu; většinou se však používá imerzní systém
- **Fluorescenční mikroskopie**; pokud je fluorescenčním barvivem značená protilátka či antigen, nejde o fluorescenci jako takovou, ale o imunofluorescenci; ta už je kombinací mikroskopie a serologie
- *Více najdete v bonusovém materiálu*





# Imunofluorescence

Mikrobiologický ústav



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

# 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

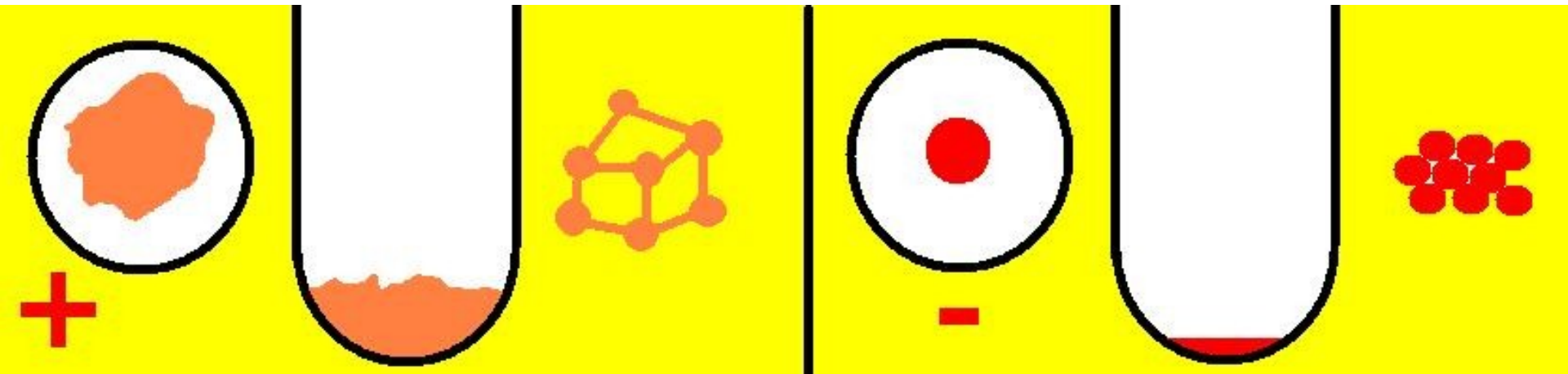
Historický	BWR – Bordet Wassermann	Netr.
Screeningové	RRR – Rapid Reagin Test <i>či RPR nebo VDRL test</i>	
	TPHA/TPPA*	Treponemové
Konfirmační	ELISA	
	FTA-ABS (nepř. imunofluor.)	
	Western Blotting	
<i>Historický, popř. superkonfirmace</i>	<i>TPIT (Treponema Pallidum Imobilizační Test) = Nelson</i>	

\*TPHA – Tr. pasivní hemaglutinační test  
 TPPA – dtto, místo krvinek polycelulóza

# RRR a TPHA

- U **RRR** je pozitivní důlek se zákaem (vypadá podobně jako pozitivní kontrola). Panelem je třeba příliš netřepat a nenaklánět.
- **TPHA**: Jde o aglutinaci na nosičích – červených krvinkách. Bramboře podobný útvar je pozitivní, tečka negativní

# 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 (Mikrobiologický ústav)

Pozitivní kontrola (různá míra positivity)

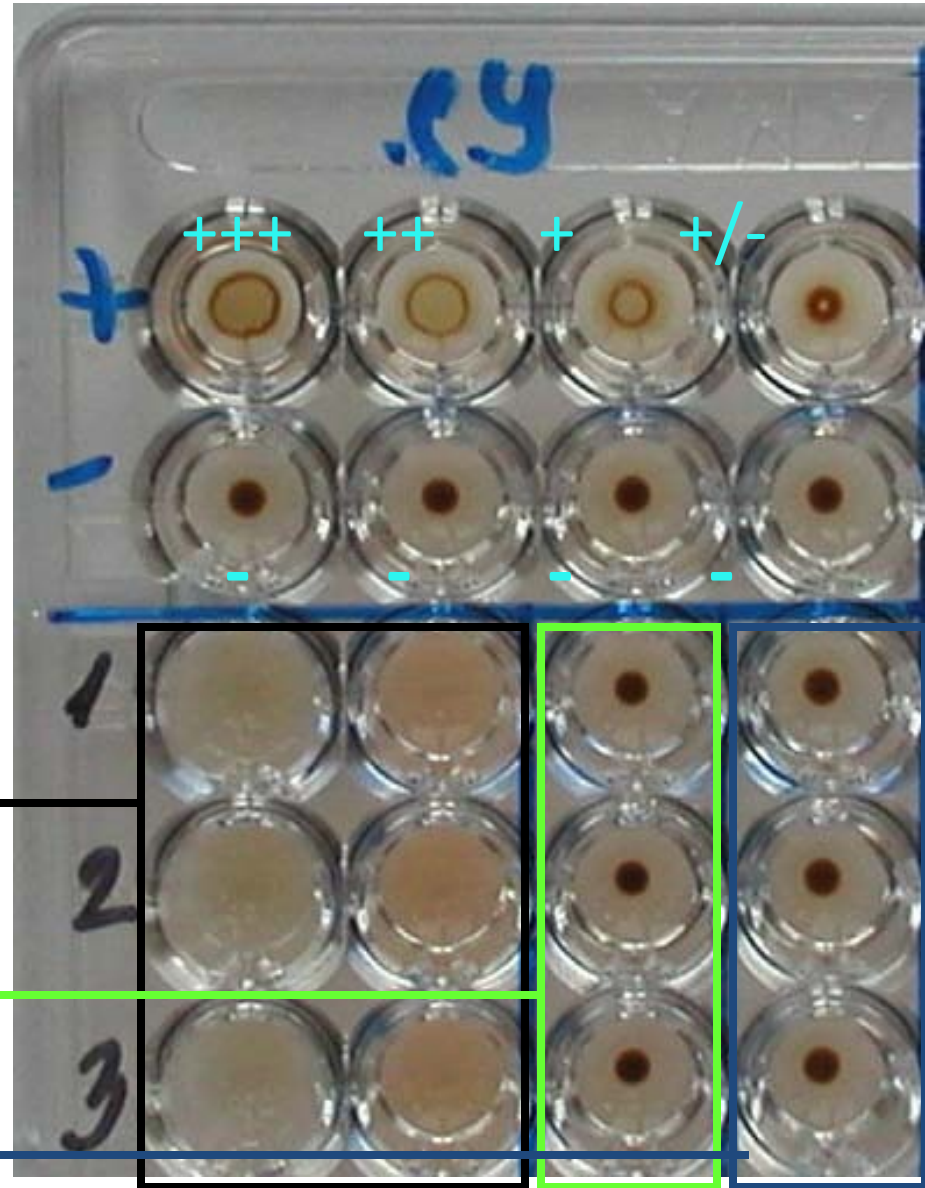
Negativní kontrola

Pacienti (1, 2, 3)

Technické důlky

Kontrola

Vlastní reakce

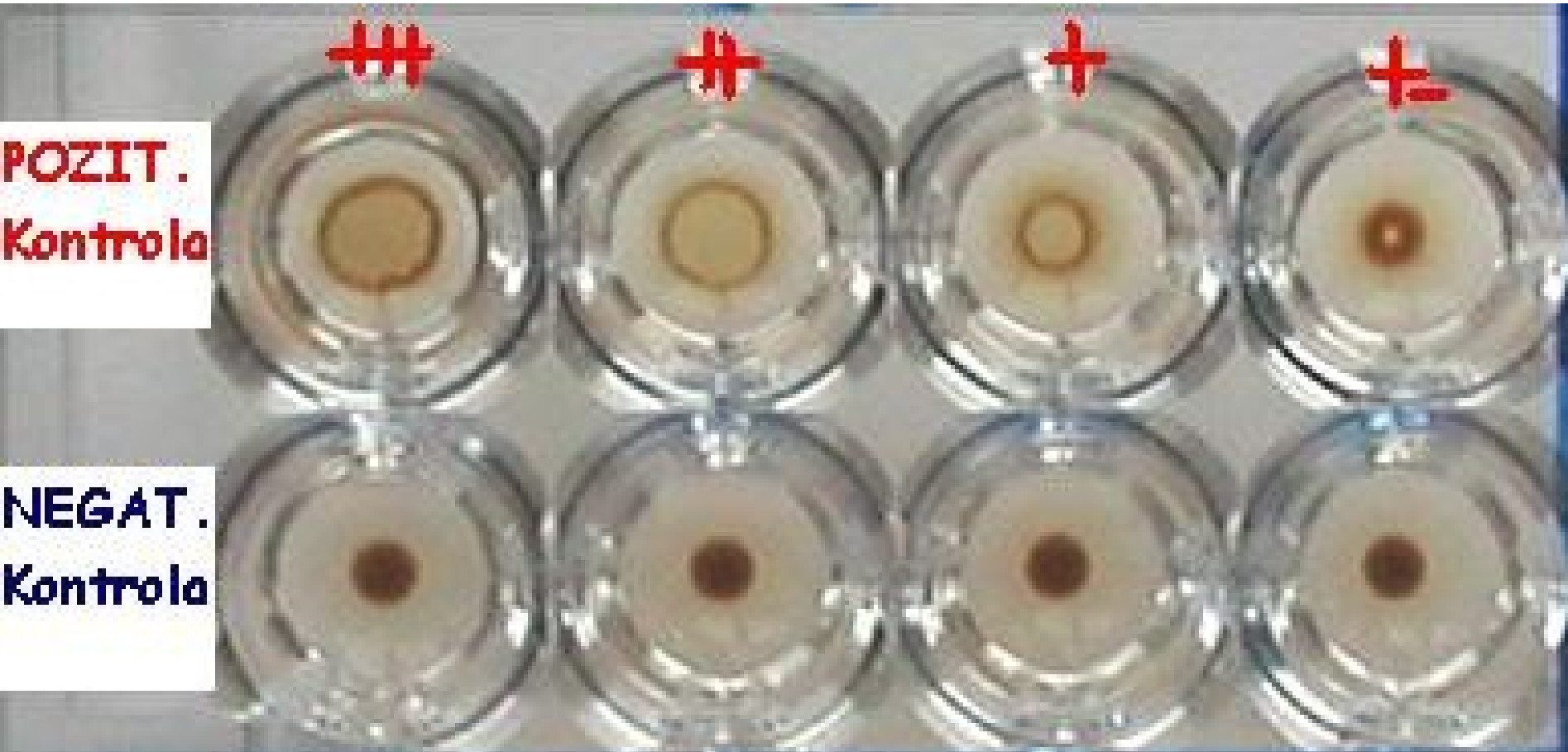


Všimněte si, že máme 1) pozitivní kontroly, 2) negativní kontroly 3) negativní kontroly k jednotlivým důlkům

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

TPHA – hodnocení:

Mikrobiologický ústav





# Indikace ke confirmaci

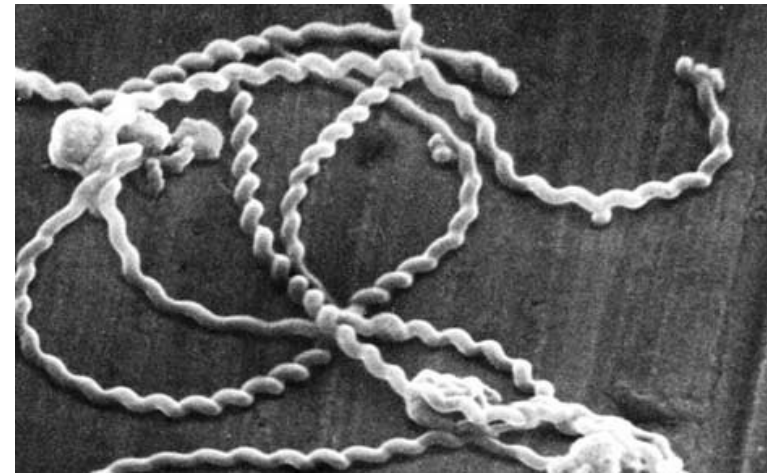
- Screeningové reakce se dělají při každém testování na syfilis (včetně např. těhotných, u kterých vůbec nikdo nepředpokládá, že by měly být pozitivní). Screeningové reakce se zpravidla provádějí jen **kvalitativně či semikvantitativně** (i když kvantitativní provedení by nebyl problém)
- Indikací ke confirmaci je:
  - **jakýkoli pozitivní či alespoň hraniční výsledek** reakce RRR a/nebo TPHA, NEBO
  - přítomnost **suspektních lézí na těle**, nebo **anamnéza** rizikového sexuálního styku – zde i v případě negativity obou reakcí

# ELISA, Western blot a PCR v diagnostice spirochet

- Jak ELISA, tak i Western blotting a PCR jsou u spirochet používány podobně jako u jiných mikrobů – viz témata J08 a J09 v jarním semestru.
- Pozitivní jsou **pacienti s hodnotami absorbance vyššími než daná hodnota (CAL – kalibrační důlek, cut off a podobně)**
- **Průkaz IgG a IgM je zásadní, pouhá pozitivita IgG znamená jen důkaz prodělané infekce.**
- **PCR se používá v diagnostice syfilis i Lymeské nemoci.** Obvykle je pozitivní dříve, než průkazy protilátek

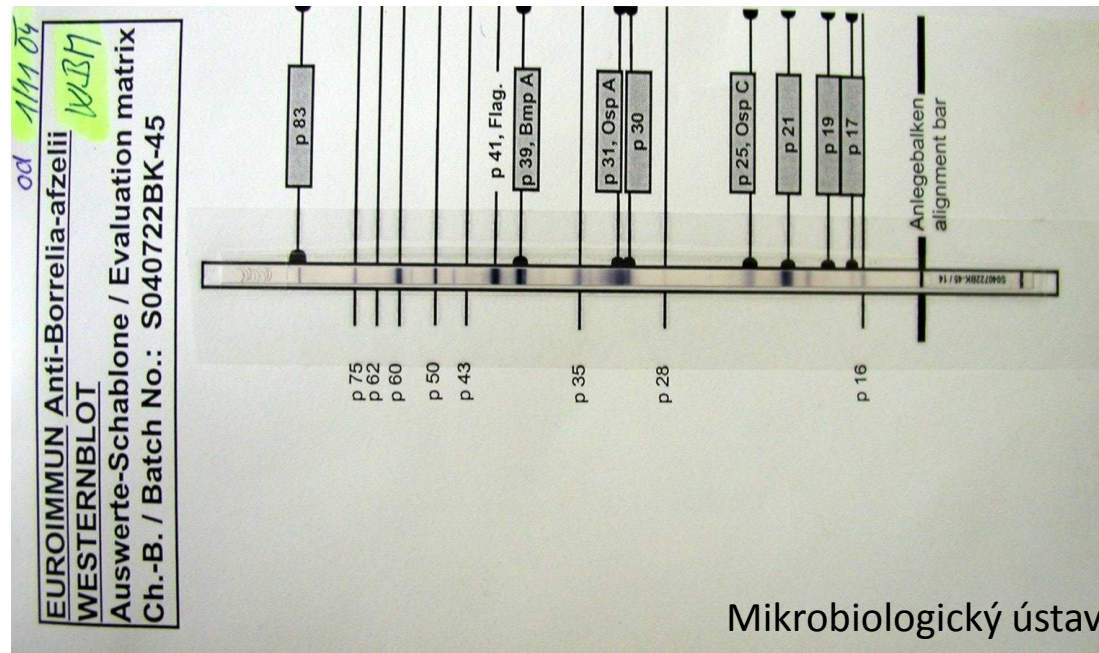
# Borrelie – průběh pátrání

- Především sérologie, popř. PCR.
- Sérologií se stanovují IgM (svědčí pro časnou infekci) a IgG protilátky metodou ELISA, pozitivní nález se ověřuje Western blotem.
- Western blot je specifitější metodou.
- Při podezření na neuroborreliózu stanovujeme syntézu intrathekálních protilátek
- Přímý průkaz - PCR vyšetřovaným materiálem je zejména likvor



# Borrelie – průběh pátrání, Western blot

- V současné době automatizované systémy
  - hodnocení výsledků prostřednictvím skeneru a vhodného softwaru

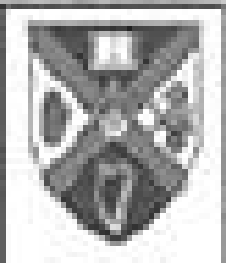
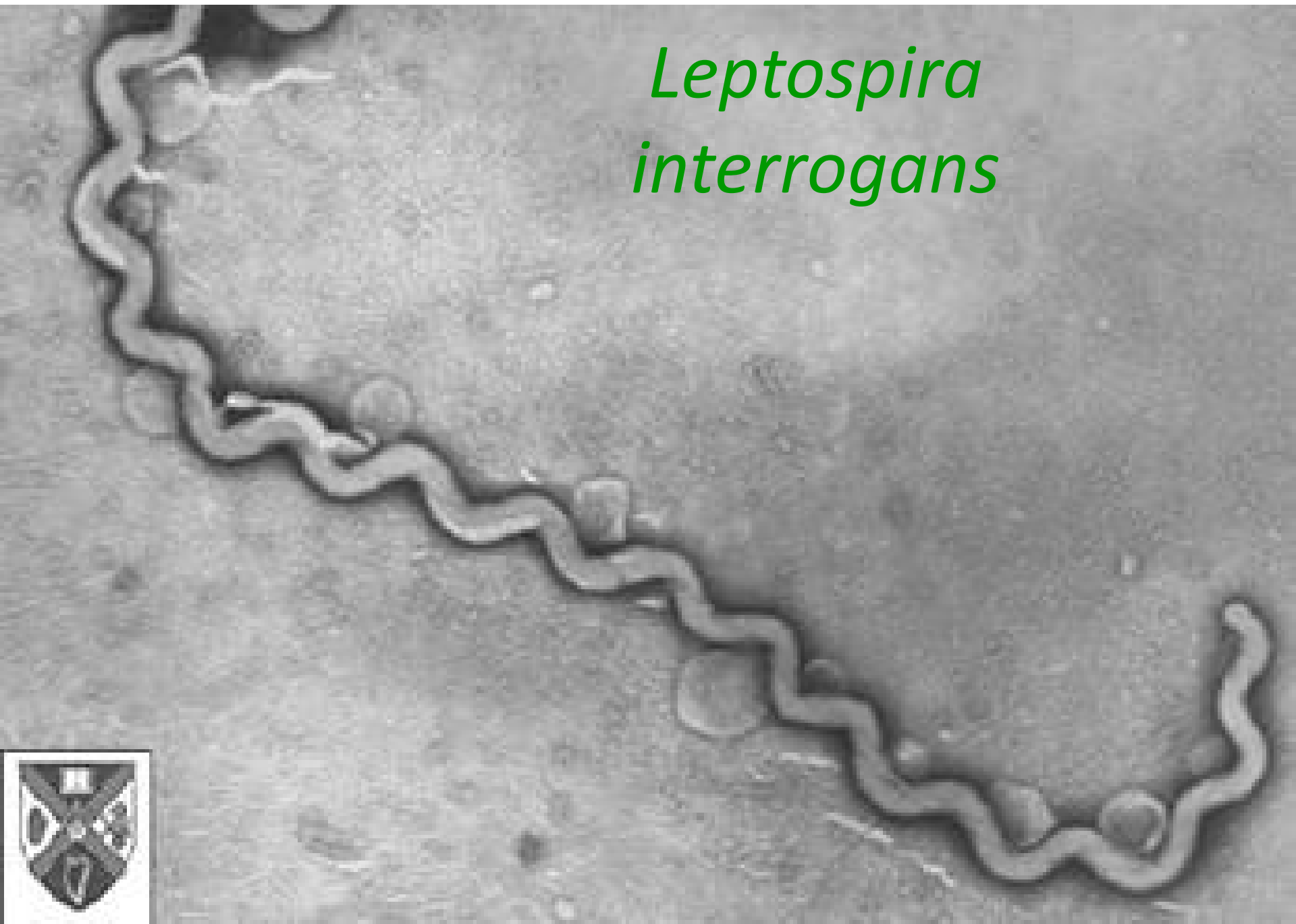


Šablona pro odečítání výsledků Western blotu

# Leptospiry – průběh pátrání

- V prvních 10 dnech infekce je možný přímý průkaz z krve, moči nebo likvoru
- Později už jen z moči (až 3 měsíce)
  - Mikroskopie v zástinu (viz jarní semestr) málo citlivá
- Kultivace ve speciálním médiu (Korthoffovo), výsledek je nejistý
- Průkaz antigenu v moči s použitím monoklonálních protilátek (dot ELISA)
- Metoda PCR průkaz leptospirové DNA v krvi, moči nebo likvoru

*Leptospira  
interrogans*



# Leptospira v elektronovém mikroskopu





# Diagnostika leptospir

- Mikroskopický průkaz leptospir



LEPTOSPIRY

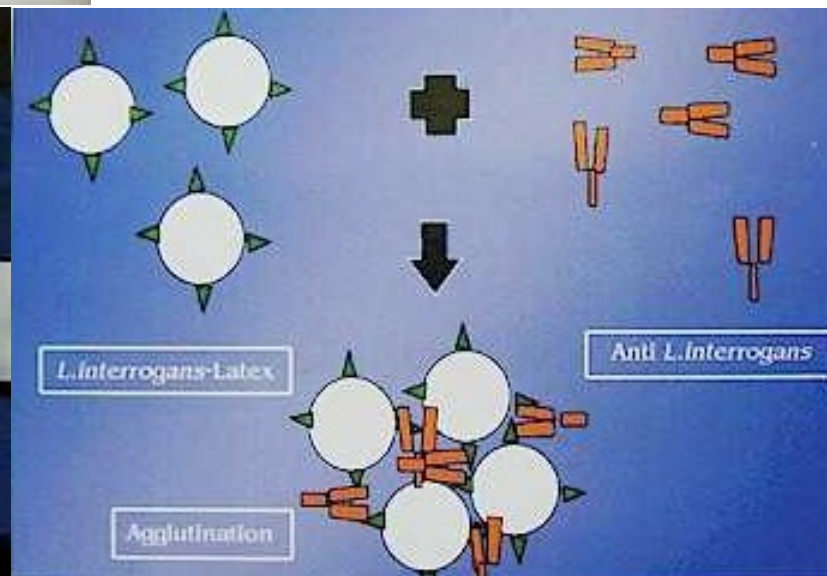
# Leptospiry – průběh pátrání

- Nepřímý průkaz
  - základ laboratorní diagnostiky
  - týden od začátku infekce lze prokázat protilátky
  - mikroskopický aglutinační test (MAT, MAL)
    - antigen živé kmeny nejčastějších sérotypů leptospir
    - výsledek se hodnotí v zástinu
    - protilátky přítomny – shlukování až lýza leptospir
    - cca. po 14 dnech se odebírá druhý vzorek séra
    - signifikantní je čtyřnásobný vzestup titru protilátek
- MAT lze doplnit průkazem IgM ELISou
- Komerčně dostupné jsou i další testy např. aglutinační

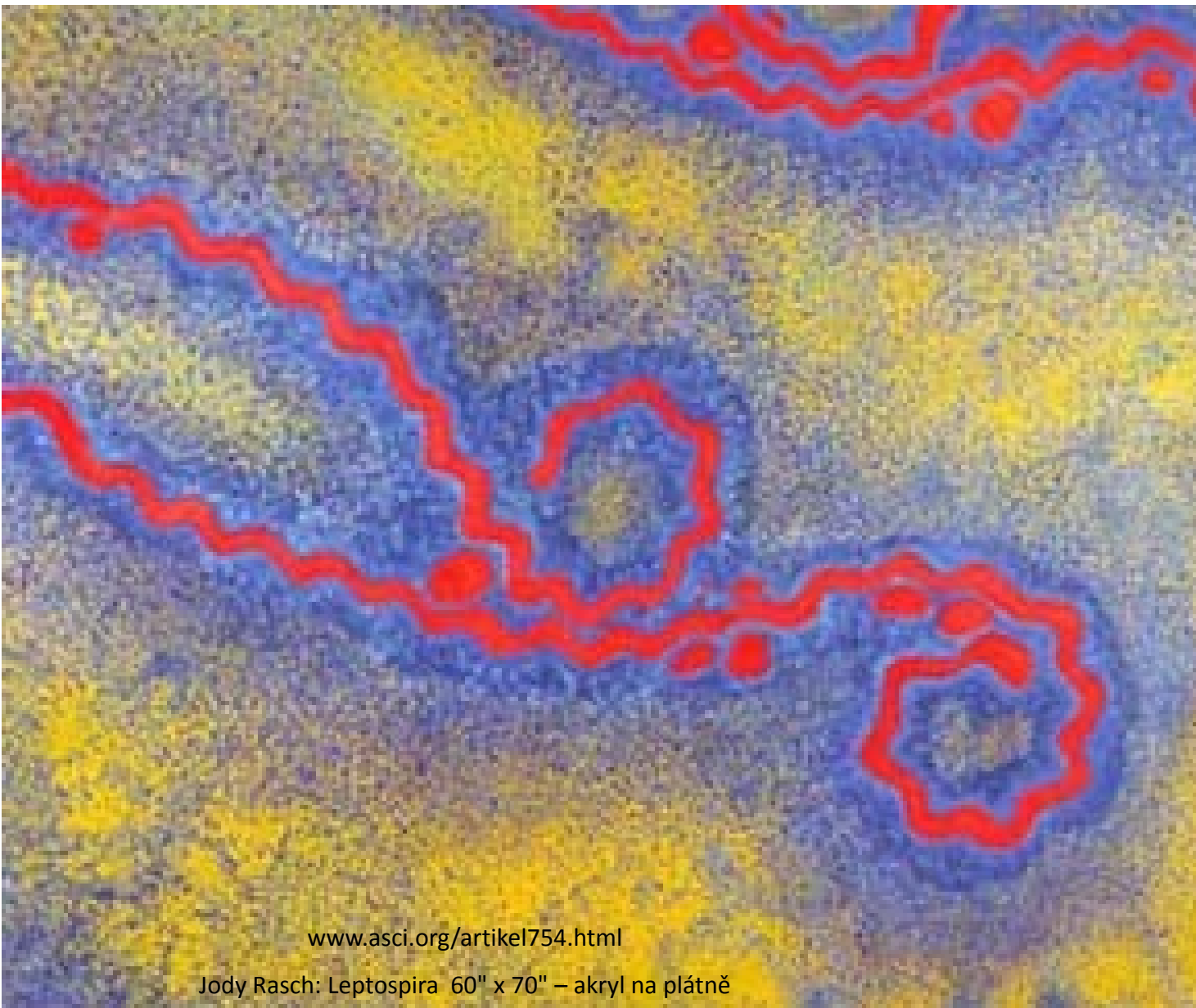
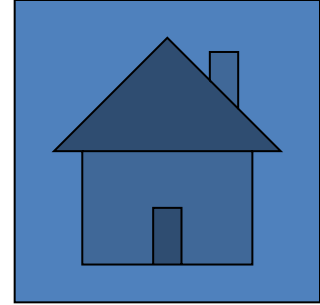
# Další diagnostické možnosti u leptospir

(latexová aglutinace)

4x [www.thailabonline.com](http://www.thailabonline.com)



# Konec



[www.asci.org/artikel754.html](http://www.asci.org/artikel754.html)

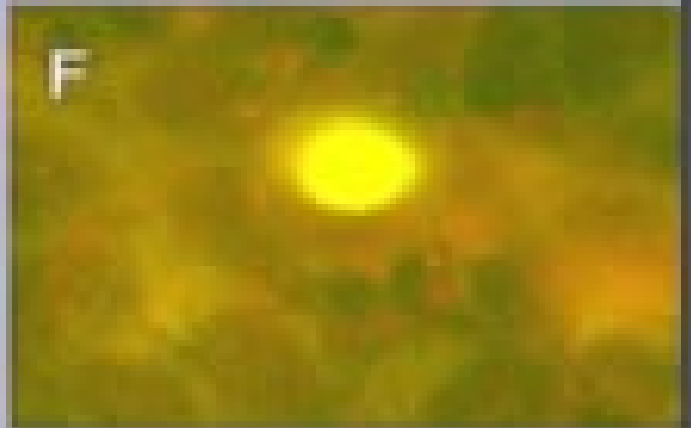
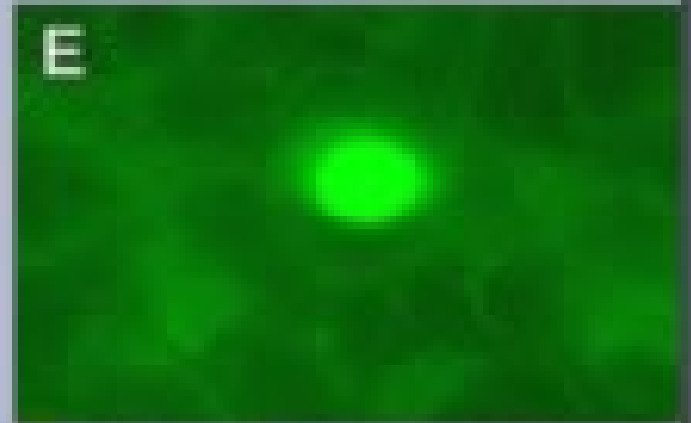
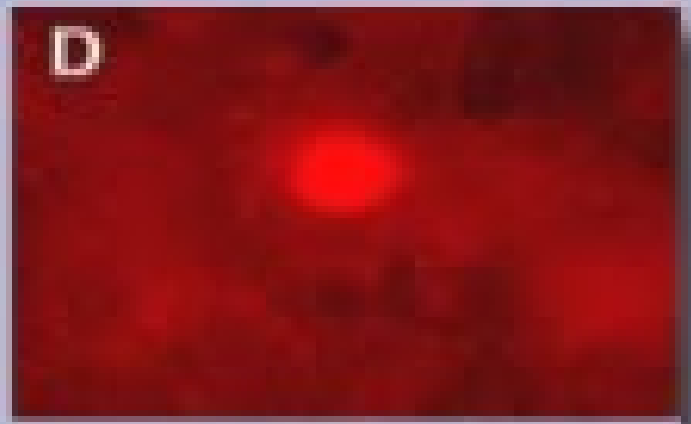
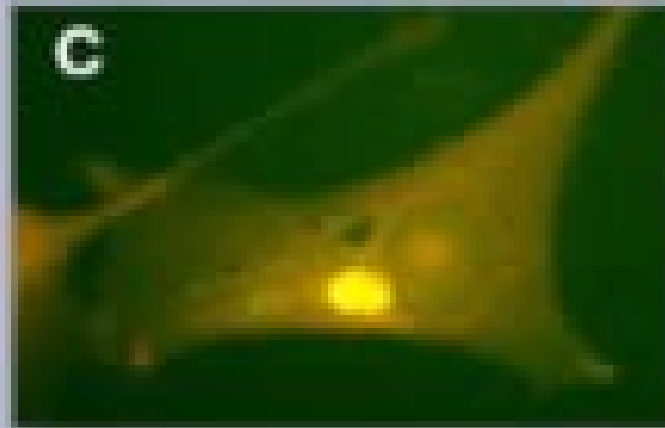
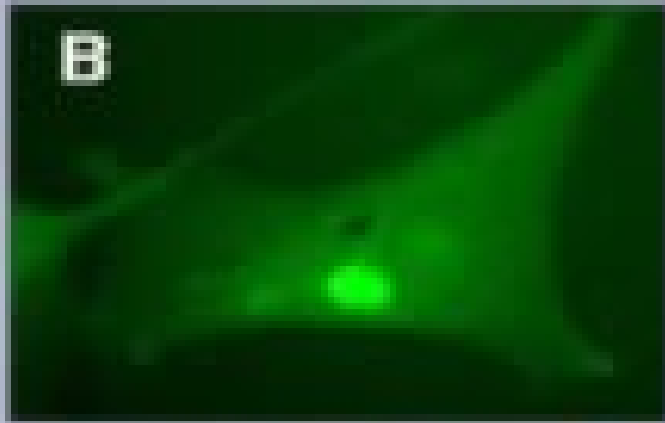
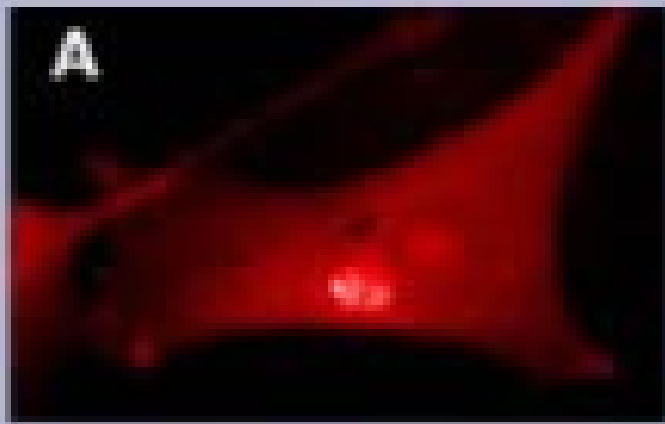
Jody Rasch: Leptospira 60" x 70" – akryl na plátně

# Rickettsie a chlamydie

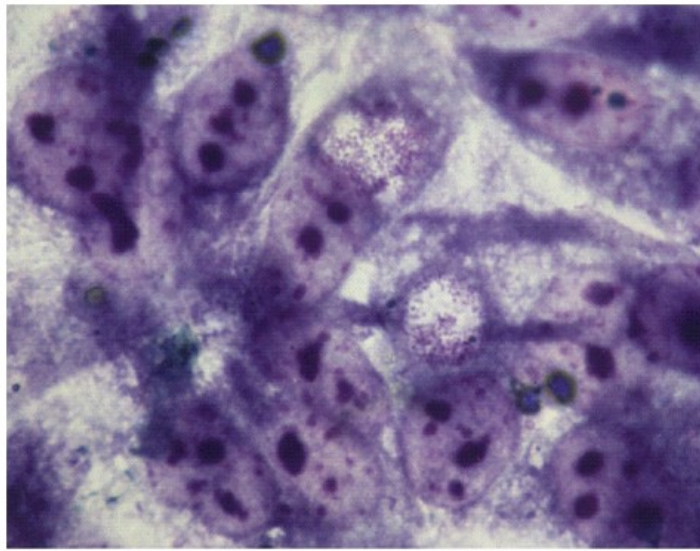
## Bonusový materiál

Rickettsie a chlamydie *nejsou* acidorezistentní bakterie, s mykobakteriemi mají společnou jen intracelularitu. Třeba vám však tento bonusový materiál poslouží u zkoušky...

# Chlamydie



# Chlamydie



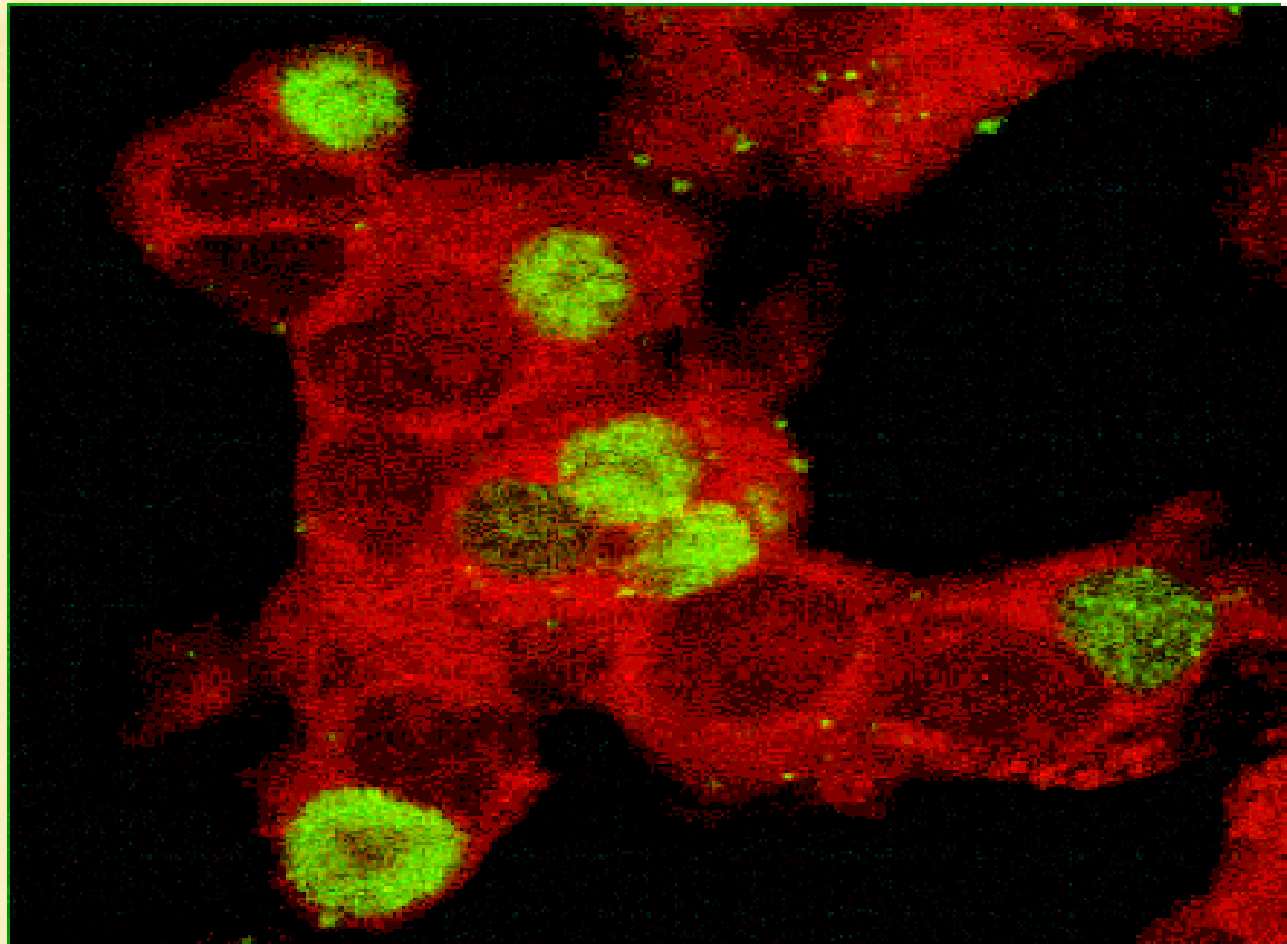
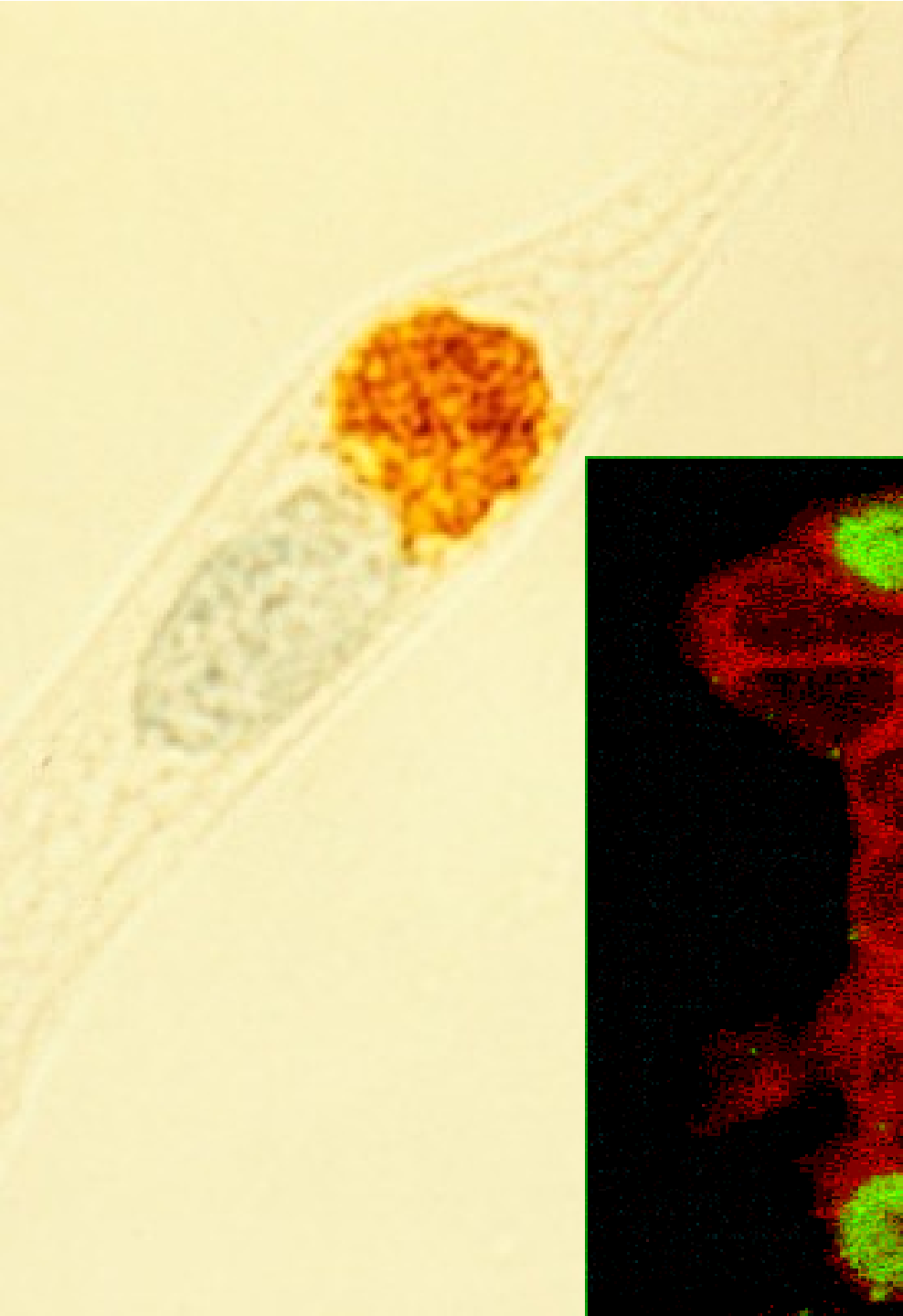
To be seen each cell are two inclusions with elementary bodies. (Giemsa stain)

[www.roche.com](http://www.roche.com)

(Foto: Prof. Eiko Petersen, Universität Freiburg/Brsg.)

- Povinně **nitrobuněční parazité**.
- Jsou to přesto bakterie, v **mnohém blízké gramnegativním**.
- Od plnohodnotné bakterie se liší především **neschopností vyrobit ATP**, mají ale **buněčnou stěnu**.
- Rod *Chlamydia* poměrně nedávno rozdělen na rody *Chlamydia* a *Chlamydophila*.





# *Chlamydia trachomatis*



- onemocnění závisí na serotypu:
- Serotypy **L1, L2, La2 a L3**
  - vyvolávají tropickou pohlavní nemoc - **lymphogranuloma venereum**.
- Serotypy **D až K**
  - způsobují **pohlavně přenosná onemocnění ve vyspělých zemích**
  - často bez příznaků
  - možné záněty různých částí pohlavního ústrojí
  - možná neplodnost
  - mohou též způsobit záněty spojivky – paratrachom

# *Chlamydia trachomatis*

- Serotypy **A, B, Ba a C**
  - způsobují **trachom** – nejčastější příčinu slepoty v rozvojových zemích
  - postižen téměř každý desátý obyvatel zeměkoule (tj. asi půl miliardy lidí!)
  - začíná jako zánět spojivek
  - slepota přichází během 25–30 let
  - přenos dotykem a nespecifickými přenašeči (mouchy)



# Trachom



<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Image:Trachoma.jpg>

# *Chlamydophila pneumoniae*

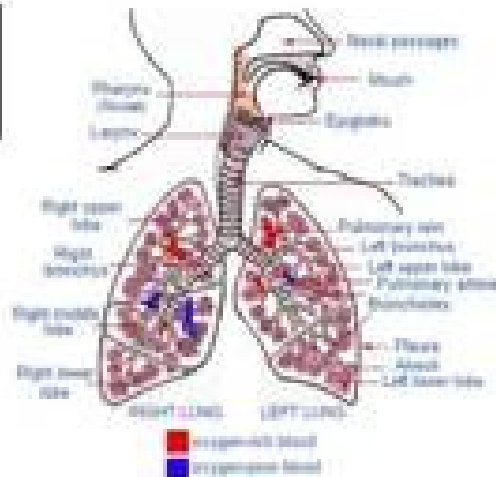
- především onemocnění dýchacích cest
- od rým a zánětů dutin až po záněty plic

# *Chlamydophila psittaci*

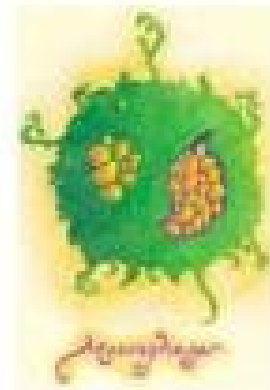
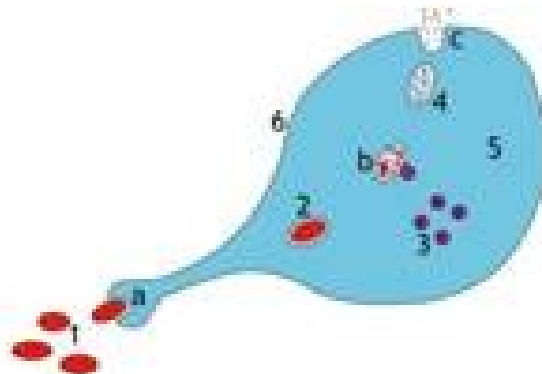
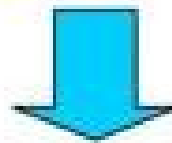
- ptačí nemoc – **ornitóza**
- závažnější papouščí nemoc – **psitakóza**
- důležité je postižení dýchacích cest i jiných orgánů, např. jater
- na chlamydie poměrně odolné, možný přenos i trusem ptáků

# Schematic of Dr. Stratton's Theorized Course of Chlamydia pneumoniae Infection and Spread to Multiple Organ Systems

**I. Respiratory system:**  
Initial source of Cpn

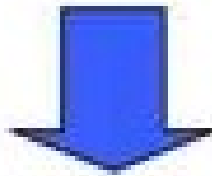


Bronchitis  
Pneumonia  
Sinusitis  
Laryngitis



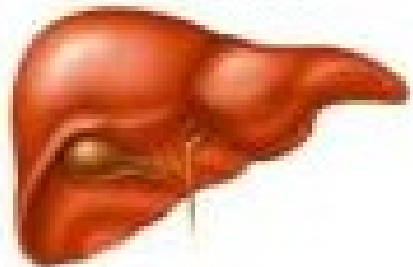
**II. Infected macrophages and neutrophils carry Cpn from lungs into the blood stream:**



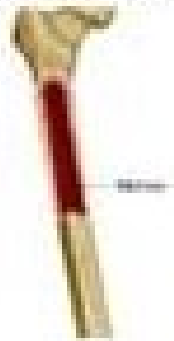


**III. Circulating infected immune cells infect filter organs become EB factories:**

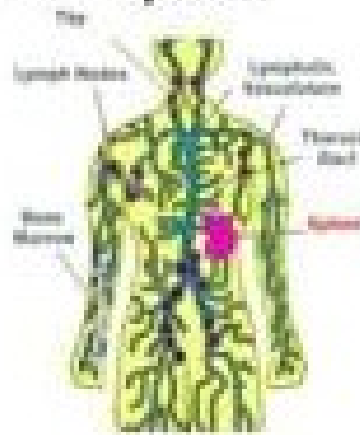
**Liver**



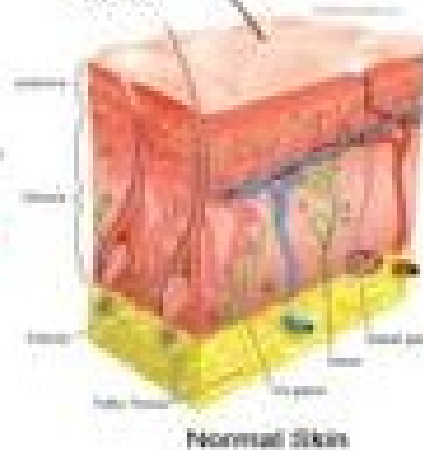
**Bone Marrow**



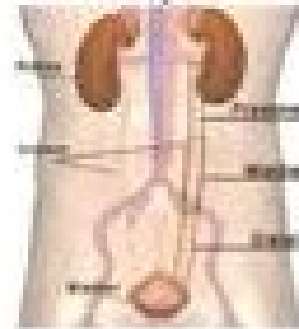
**Spleen**



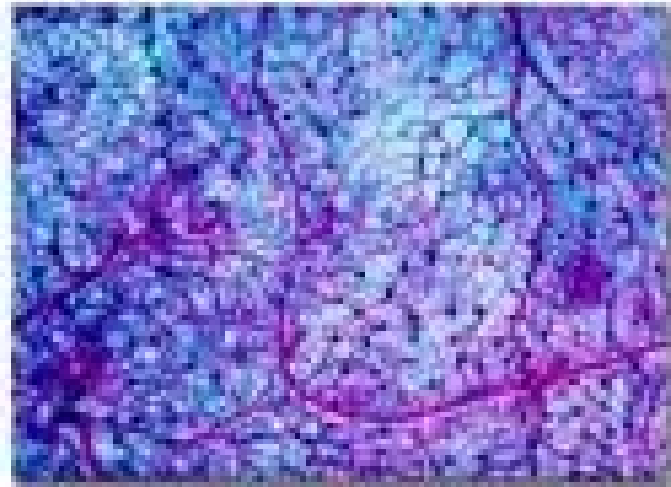
**Skin**



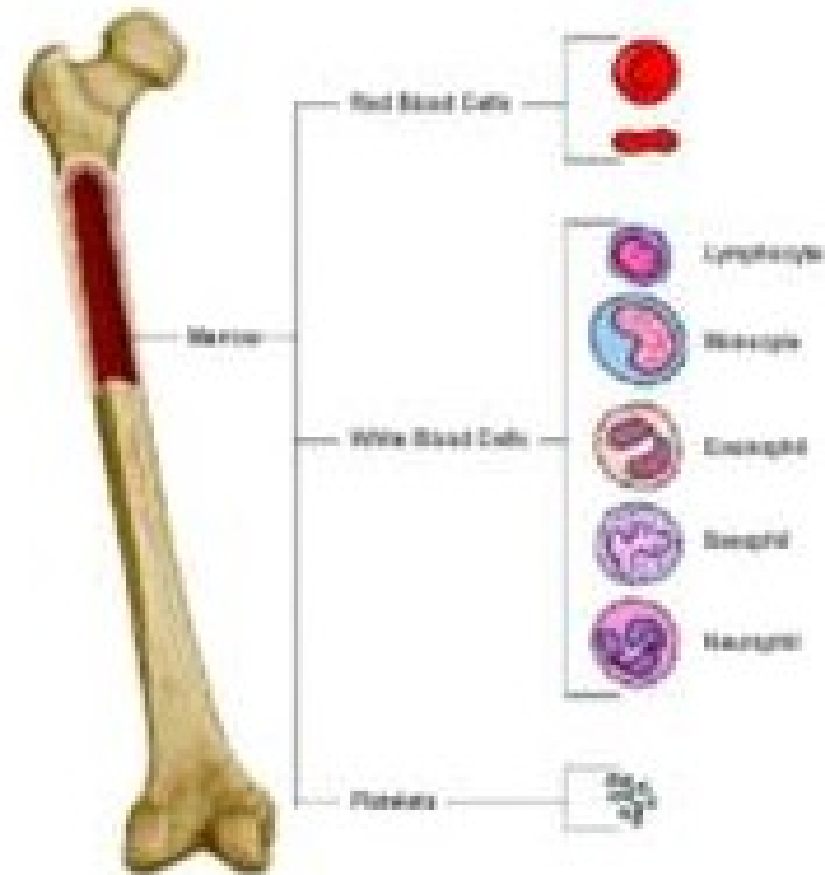
**Kidneys**



**IV.** EB's also set up shop in small blood vessels (get stuck in capillary beds) and are carried by red blood cells into other tissues.



**V.** Vascular infection then further infects bone marrow cells, which now produce infected and dysfunctional immune cells (white cells, macrophages, etc.), and other organs:

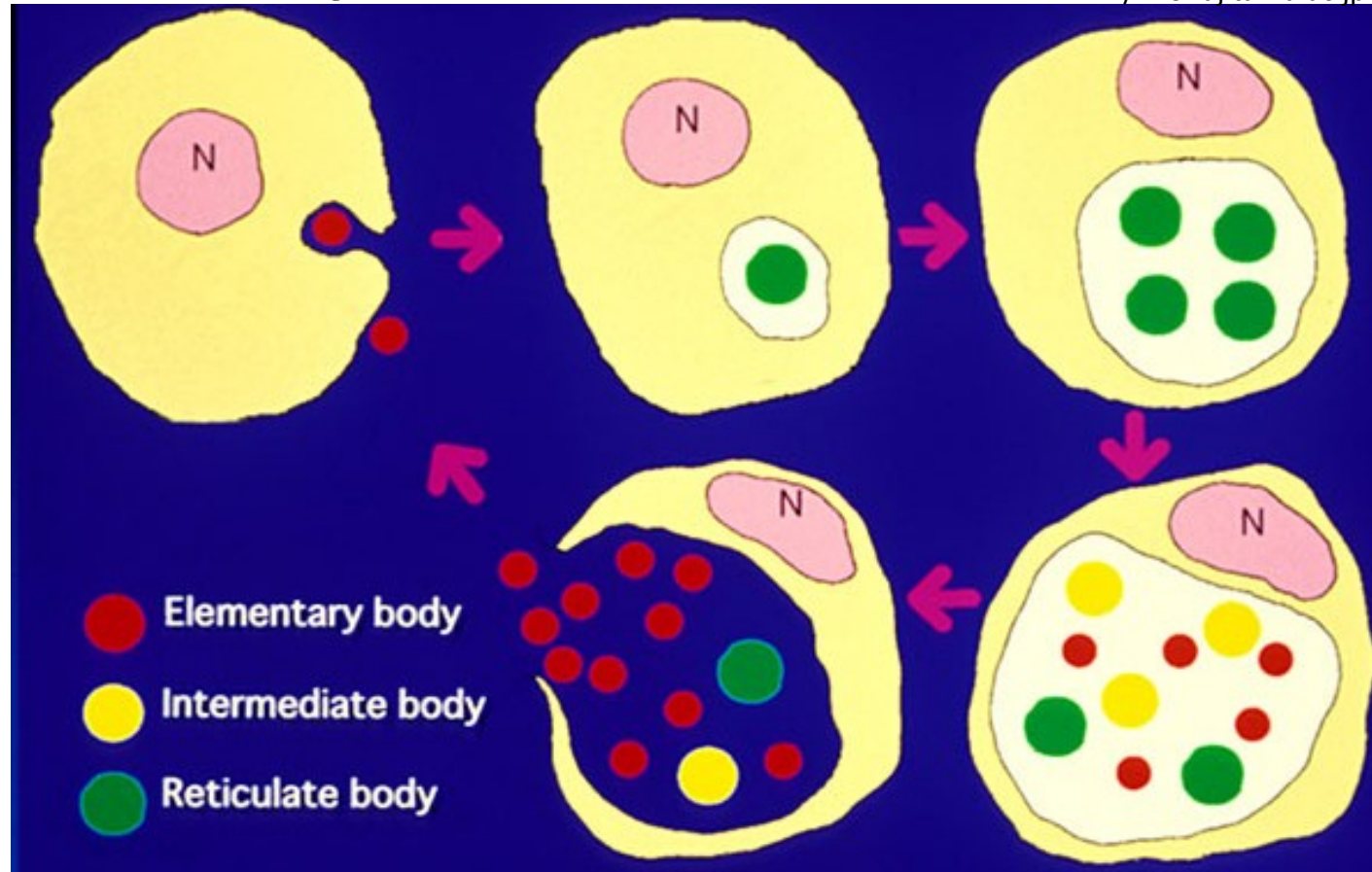


**Result:**

Neutropenia, low NK cells, infected macrophages, dysfunctional immune cells; lowered immune function; lowered organ functions, etc

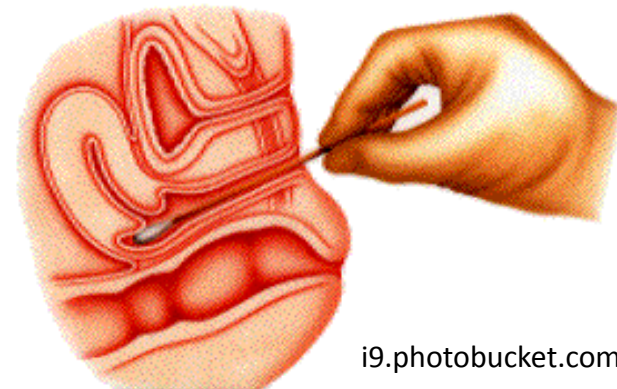
# Chování chlamydií

/info.fujita-hu.ac.jp



- nechají se pohltit hostitelskou buňkou
- v ní se namnoží
- pak jsou z buňky vypuzeny nebo ji rozloží

# Odebírané vzorky u chlamydií



- U nepřímého průkazu samozřejmě sérum
- U přímého průkazu plicních chlamydióz **sputum, případně jiný vhodný materiál** (např. bronchoalveolární laváž)
- U urogenitálních chlamydióz např. **výtěr z cervixu na suchém tamponu** (protože se zpravidla používá průkaz antigenu nebo PCR, ne kultivace)

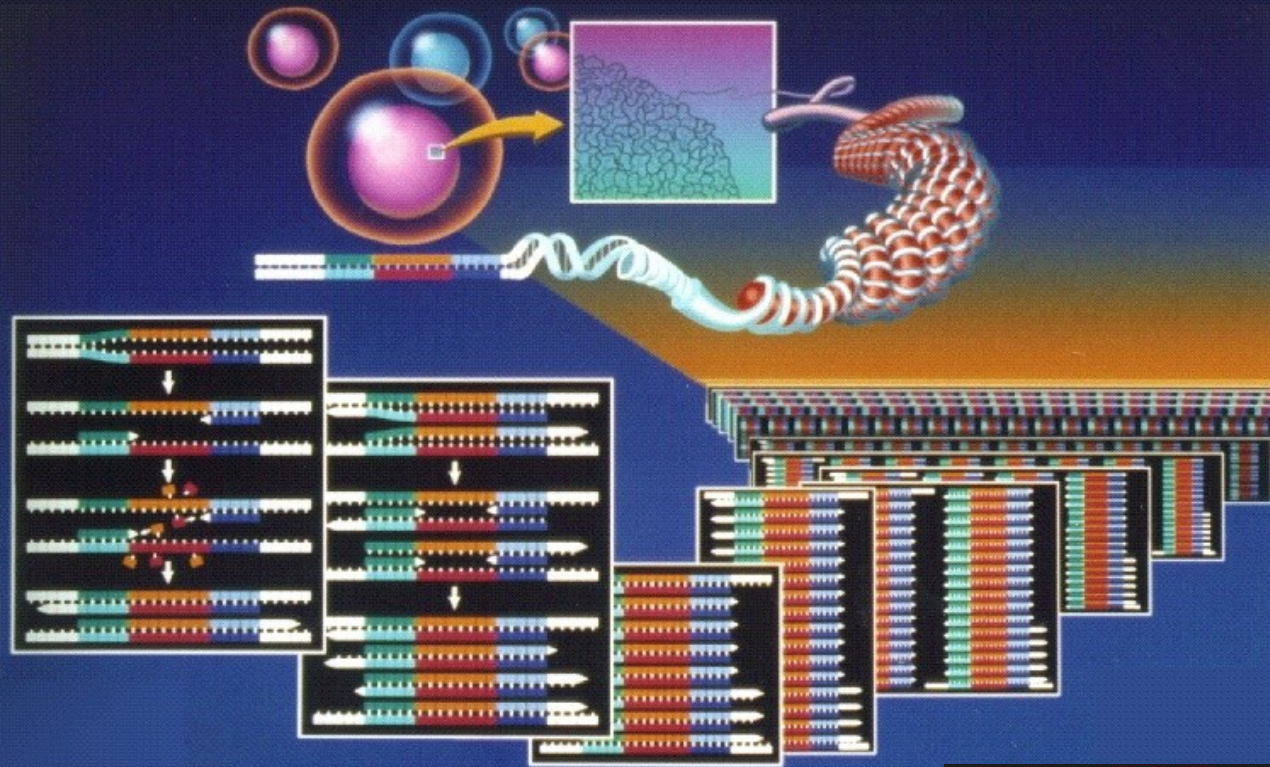
# Diagnostika chlamydií

- Mikroskopie s použitím speciálních barviv je možná, ale běžně se neprovádí
- Gramem se nebarví
- Pro kultivaci nutné speciální odběrové médium
- Kultivace na buněčných kulturách jako u virů. Pozorují se buněčné inkluze
- Významný je **průkaz antigenu**, např. ELISA
- **Nepřímý průkaz: KFR a ELISA**
- **Genetické metody:** genová sonda, PCR, LCR

## Léčba

- Tetracykliny, makrolidy





Z diagnostiky  
chlamydií







# Rickettsie a příbuzné organismy

# Základní charakteristika rickettsií

- Podobně jako chlamydie odebírají z hostitelských buněk ATP a navíc i jiné živiny.
- Jsou rovněž **povinně nitrobuněčnými parazity**
- Při výzkumu rickettsií přispěl badatel **Stanislaus Prowazek z Jindřichova Hradce**.
- **Některé druhy, dříve považované za příbuzné rickettsií, se dnes za příbuzné nepovažují, dokonce nejde o povinně nitrobuněčné parazity. Všechny jsou to ale drobné, obtížně kultivovatelné bakterie.**

# Klinická charakteristika a přenos

- Způsobují různé choroby, často horečnaté (viz dále), často přenášené členovci.

## Léčba

- Používají se zpravidla tetracykliny a jejich deriváty. To platí pro naprostou většinu z nich.
- U *Bartonella bacilliformis* se používá spíše penicilin a streptomycin.

# Jak je to tedy s tou příbuzností (aneb Taxonomie)

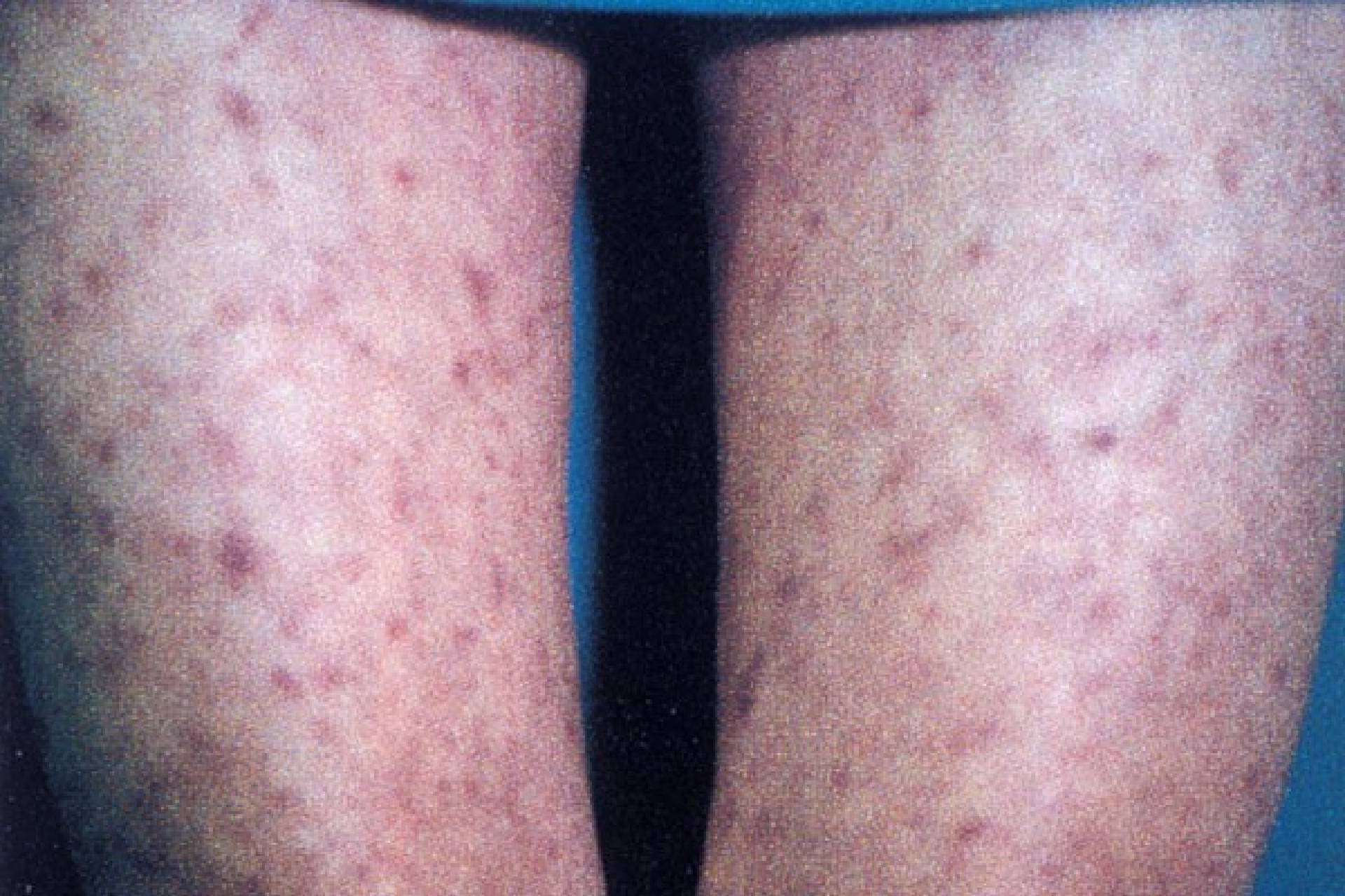
- **Řád Rickettsiales byl rozdělen:**
  - Čeleď *Rickettsiaceae* – rody *Rickettsia* a *Orientia*
  - Čeleď *Anaplasmataceae* – rody *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Wolbachia*
- **Do řádu Rickettsiales dnes již nepatří:**
  - *Coxiella* (samotná čeleď *Coxiellaceae* v řádu Legionellales, tedy k legionelám)
  - *Bartonella* (čeleď *Bartonellaceae* v řádu Rhizobiales). Do rodu *Bartonella* patří i bakterie, dříve řazené do rodu *Rochalimea*

# *Rickettsia*

- Jsou to malé kokobacily velké 0,2 až 0,5  $\mu\text{m}$
- Barví se např. dle Giemsy
- Přenašečem jsou **klíšťata, vši a blechy**
- Onemocnění se vyskytovalo **i u nás, např. za válek**; některé rickettsiózy se i dnes vyskytují v Evropě, většina však spíše v tropech a subtropích, zejména v Africe a Latinské Americe
- Rozlišuje se **skupina skvrnitých horeček** a **skupina skvrnitého tyfu** (tyfových horeček)

# Rickettsie skvrnitých horeček

- Přenos **klíšťaty**
- Česky také „**purpurové horečky**“
- Příkladem je **horečka Skalistých hor** (také Rocky Mountains spotted fever, RMSP; jejím původcem je ***Rickettsia rickettsii***), dále Středozemní, Astracháňská či Africká skvrnitá (různé další druhy rickettsií)
- Existuje i ***Rickettsia slovaca***, která způsobuje onemocnění s horečkou příškvary ve vlasaté části hlavy. Vyskytuje se mj. na Slovensku
- ***Rickettsia akari*** způsobuje tzv. **rickettsiové neštovice**





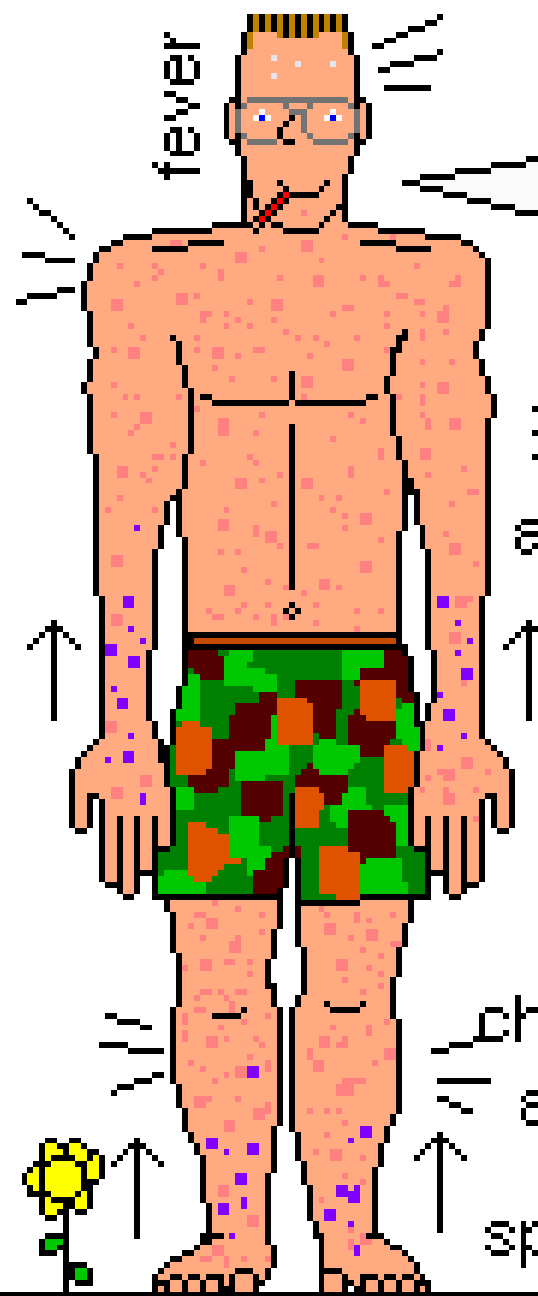
# Rocky Mountain Spotted Fever

Doc -- PLEASE  
don't miss this one!

The rash is usually  
absent at the onset,  
and may not appear.

"The usual" anti-  
biotics that kill  
most bugs don't  
affect RMSF.

Uh, there weren't  
any ticks on me  
when I got home.



fever

aches

rash moves  
centripetally  
and becomes  
hemorrhagic

check palms  
and soles

spring and summer

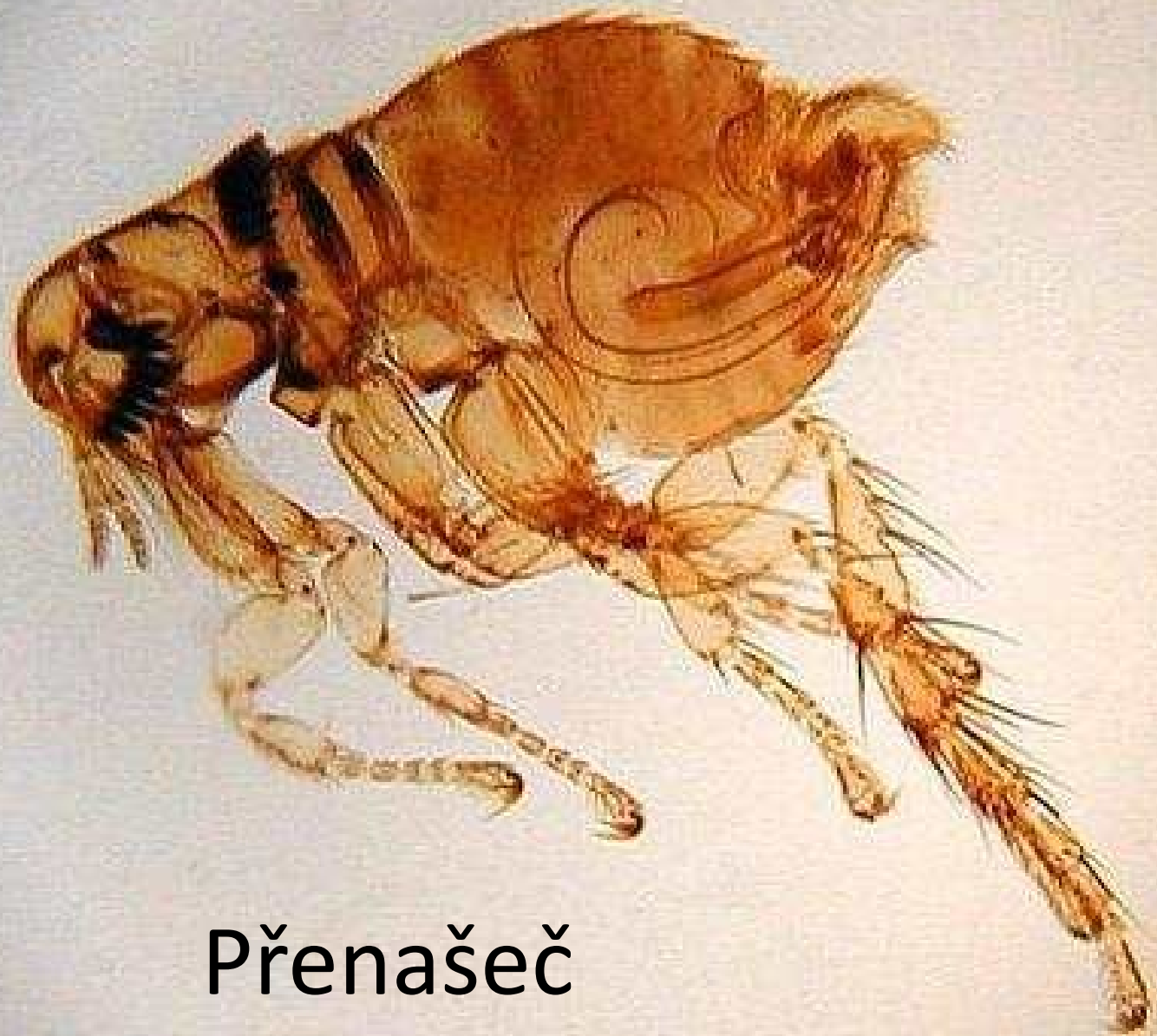
www.pathguy.com

Easy to treat;  
often fatal  
if missed!

# Rickettsie tyfových horeček

- Přenos šatními **vešmi a blechami**
- Projevují se opět **horečkou a vyrážkou**
- Klasický je **skvrnitý tyfus**, způsobený *Rickettsia prowazekii*. Oba badatelé, kteří mu dali jméno, na něj zemřeli
- Po prodělání může mikrob přetrvávat v endoteliálních buňkách a po letech může vzniknout mírnější **Brillova-Zinsserova nemoc**
- Existuje také **endemický tyfus** (též myší tyfus), způsobený *Rickettsia typhi*

Flea 40x



Přenašeč

# *Orientia*

- Jediným druhem je ***Orientia tsutsugamushi*** (dříve *Rickettsia tsutsugamushi*)
- Způsobuje **křovinný tyfus**, nazývaný též japonská říční horečka či horečka cucugamuši (cucuga = onemocnění, muši = roztoč; přenos roztoči)
- Význam onemocnění vzrostl za II. světové války a za války ve Vietnamu
- Vyskytuje se hlavně **ve východní a jihovýchodní Asii**

# Prowazek

[www.quido.cz/osobnosti/images/prowazek.gif](http://www.quido.cz/osobnosti/images/prowazek.gif)



[www.amphilsoc.org](http://www.amphilsoc.org)

# Stanislaus Prowazek (1875–1915)

- "Nikdo nemůže vyjádřit mínění o povaze viru jen na základě experimentů, tak, jak se v nynější době stává se dogmatem."
- Mikrobiolog a zoolog a objevitel původce skvrnitého tyfu **Stanislaus Prowazek** se narodil v Jindřichově Hradci v rodině důstojníka rakouské armády dne 12. listopadu 1875. Studoval na přírodovědecké fakultě v Praze a ve Vídni. Jeho doktorská práce zaujala Paula Ehrlicha (pozdějšího držitele Nobelovy ceny). A tak se Prowazek stal jeho asistentem. Postupně se stává nadějí německé medicínské parazitologie. Prowazek se stává vedoucím protozoologické laboratoře Institutu pro tropické choroby v Hamburgu. Další osudy této erudované osobnosti jsou spojeny se skvrnitým tyfem, typickou válečnou chorobou. Za tou se Prowazek v roce 1913 vypravuje do Srbska. Prowazek v chotěbuzském zajateckém lágru studoval nad mikroskopem tyfový materiál nemocných zajatců. Toto studium se mu stalo osudným. Podobně jako Ricketts i on se nakazil skvrnitým tyfem a dne 17. února 1915 zemřel.
- 99 [www.quido.cz/osobnosti/images/prowazek.gif](http://www.quido.cz/osobnosti/images/prowazek.gif)

# *Anaplasma phagocytophilum*

- Často je z praktických důvodů původce řazen mezi ehrlichie. Vyskytuje se v Evropě i USA.
- Způsobuje nemoc zvanou **HGE (human granulocytar ehrlichiosis)**.
- Příznaky jsou **horečka, bolesti hlavy a svalů**.
- Onemocnění přenášejí klíšťata, někdy se hovoří o **klíšťové ehrlichioze**, po borelióze a klíšťové encefalitidě je to třetí nejvýznamnější klíšťové onemocnění u nás.



# Ehrlichie (ostatní)

- *Ehrlichia chafeensis* se vyskytuje převážně v USA. Způsobuje nemoc zvanou **HME** (human monocytar ehrlichiosis); nevolnost, horečka, bolest hlavy a další.
- *Ehrlichia ewingii* se také vyskytuje v USA. způsobuje tzv. **Ewingovu ehrlichiózu** (bolest hlavy, horečka, hlavně oslabení pacienti).
- Příbuzná *Neorickettsia sennetsu* se vyskytuje ve východní Asii a způsobuje horečku sennetsu. Na rozdíl od ostatních ji nepřenášejí klíšťata, člověk se nakazí pozřením syrových ryb (japonské suši).

# *Coxiella burnetii*

- Je to drobná G- tyčinka ( $1 \times 0,3 \mu\text{m}$ ), ale barví se spíše dle Giemsy či Gimenéze.
- Způsobuje takzvanou **Q-horečku**, poprvé popsanou 1937 v Austrálii.
- Jde o **akutní horečnaté onemocnění** s atypickou pneumonií nebo chronickou infekci s endokarditidou. Může postihnout i játra či mozkové blány.
- Vyskytuje se **ve všech světadílech**. Zdrojem jsou hlodavci, přenašečem klíšťata.

# *Bartonella*

- Jsou to **G- tyčinky**, barví se však lépe Giemsou. Jsou jen fakultativně intracelulární.
- Jsou dokonce schopny růst na krevním nebo čokoládovém agaru, musí ale mít 10 % CO<sub>2</sub> a **vyrostou až za 5 až 42 dní**. Proto je i u nich podobná diagnostika jako u ostatních.
- Mohou **přežívat v erythrocytech**, což je chrání před imunitní odpovědí i antibiotiky.

# Jednotlivé druhy 1

- ***Bartonella quintana*** (dříve *Rochalimea*) je původcem volyňské či zákopové horečky, známé z I. světové války. Dnes může být problémem u bezdomovců, narkomanů či alkoholiků. Jde o horečku s bolestmi.
- ***Bartonella hensellae*** způsobuje tzv. bacilární angiomatózu (porušení kůže a vnitřních orgánů) a některé případy nemoci z kočičího škrábnutí (další má na svědomí *Afipia felis*).

# Jednotlivé druhy 2

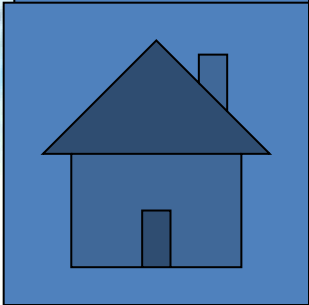
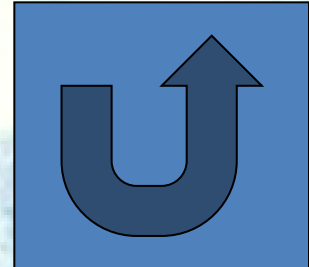
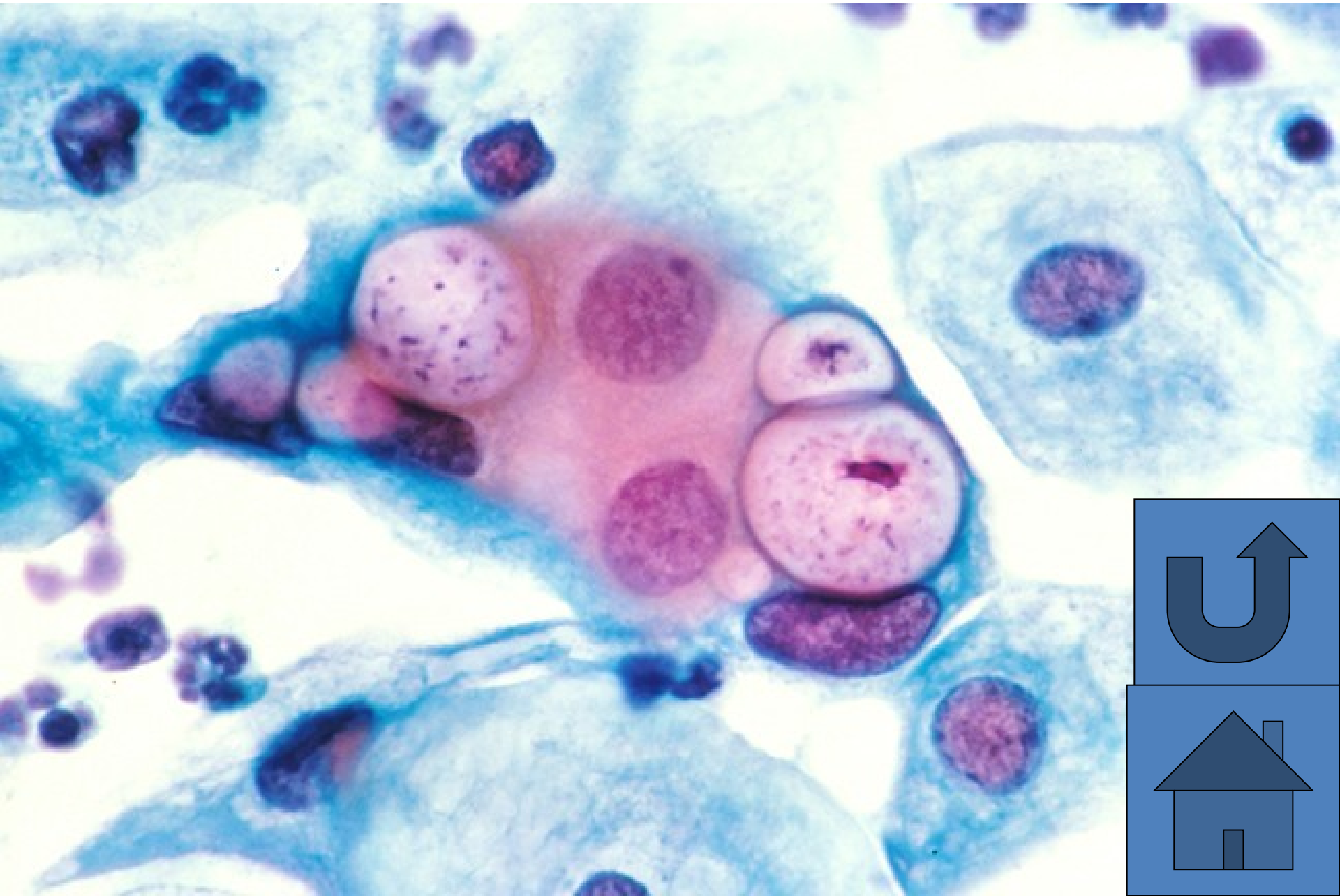
- ***Bartonella bacilliformis*** je původcem **horečky Oroya**. Smrtnost horečky Oroya je až 40 %. Vyskytuje se hlavně v Jižní Americe.
- Při horečce, ale i v případě, kdy horečka není přítomna, je také možný výskyt tzv. **peruánských bradavic** (*verruca peruviana*).
- Jeden peruánský student medicíny chtěl dokázat, že peruánské bradavice způsobuje mikrob. Naočkoval se materiálem z bradavice a zemřel na horečku Oroya. Ta se po něm jmenuje také **Carrionova choroba**.

# Diagnostika rickettsií a dalších druhů

- se provádí **jen ve vyčleněných laboratořích** za zvlášť přísných bezpečnostních opatření
- Mikroskopie se zpravidla neprovádí
- **Kultivace na žlutkovém vaku nebo buněčných kulturách**
- **Antigenní analýza imunofluorescencí**
- **PCR**
- **Nepřímý průkaz** KFR, aglutinací a imunofluorescencí
- U některých rickettsií funguje zkřížená aglutinace – protilátky reagují s O antigeny některých nepohyblivých kmenů Protea (tzv. Weil-Felixova reakce)

# Konec bonusového materiálu

emma-jane4.tripod.com





# BONUS: Rozšířené povídání o mikroskopii bakterií

- Bakterie jsou **dobře viditelné v elektronovém mikroskopu**, v praxi se nevyužívá
- **V optickém mikroskopu jsou viditelné mizerně**. Lépe je vidíme, pokud se pohybují
- Nemůžeme však spoléhat na pohyblivost bakterií. Zviditelníme je proto jinak: **fixujeme je a obarvíme některou z barvicích metod**
- **Světlolomné bakterie**, zejména spirochety, s výhodou pozorujeme pomocí **zástinové mikroskopie**

# Příprava preparátu

- Pro zdárné mikroskopování je nutno připravit **kvalitní preparát**.
- Preparát je nutno připravit tak, aby byly bakterie i ostatní objekty **dobře viditelné**. Nátěr nesmí být příliš řídký, příliš hustý, při fixaci se nesmí spálit (ale ani nedostatečně fixovat) aj. U **nativního preparátu** včetně zástinové mikroskopie je třeba zachovat mikroorganismy **životaschopné**.
- Špatně připravený nátěr obsahuje různé artefakty (krystaly barviva, nečistoty...) – ty se mohou vyskytnout ovšem i v nátěru připraveném správně

# Části mikroskopu – dopadající světlo

- **Světlo** prochází ze zdroje světla přes kolektor a kondenzor. Kvalitu a množství paprsků ovlivňuje
  - intenzita napětí zdroje světla
  - irisová clona kolektoru (v dolní části mikroskopu)
  - nastavení výšky kondenzoru
  - nastavení clony kondenzoru (apertura)
- **Výška kondenzoru** se obvykle nastaví při zaclonění. V jednom okamžiku okraj clony přestane být modrý a začne být červený – to je ten správný moment. Pak se clona zase rozevře.
- Je také třeba dbát na správné **centrování obrazu**. Při centrování se používají dva drobné šroubky, které jsou z boku na kondenzoru ve vzájemném úhlu  $90^\circ$

# Kondenzor u normální a zástinové mikroskopie

- U **normálního mikroskopu** je cílem kondenzoru pouze soustředit paprsky tak, aby ideálním způsobem a v ideálním množství dopadaly na preparát
- U **zástinové mikroskopie** je kondenzor uzpůsoben speciálně tak, aby **paprsky dopadaly zešikma**. Paprsky, které by byly rovnoběžné s optickou osou, jsou přitom **zastíněny clonou**.

# Zvětšovací optika

- V mikrobiologii používáme zpravidla binokulární mikroskop s vyjímatelnými **okuláry** zvětšujícími 10×
- **Objektivy** se používají 4×, 10×, 20×, 40×, 60× a imerzní objektiv zvětšující 100×. „Imerzní“ znamená, že mezi preparát a objektiv se kápne imerzní olej, jehož index lomu je bližší indexu lomu skla, než v případě vzduchu
- Každý objektiv je u novějších mikroskopů opatřen nejen číslem zvětšení, ale také číslem, které informuje, na jakou hodnotu má být při jeho použití upravena **clona kondenzoru**

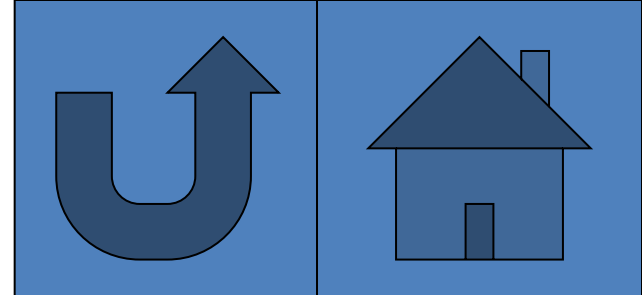
# Zaostřování a vlastní mikroskopie

- Aniž bychom se dívali do okuláru, **přiblížíme** makrošroubem preparát k objektivu na co nejtěsnější vzdálenost
- Nyní, již pod kontrolou zraku preparát **opatrně oddalujeme**, nejdříve makrošroubem, pak i mikrošroubem, až se dostaneme na příslušnou hladinu ostrosti
- V některých případech (hlavně u nativních preparátů) není jedna hladina ostrosti, ale je nutno stále **přeostřovat** na „dno“ a „hladinu“ prostoru vyplněného tekutinou. To je obtížnější, než mikroskopovat jednu rovinu (u fixovaných a barvených preparátů)

# Speciální mikroskopické techniky

- **Mikroskopie v zástinu** – používá se u světlolomných objektů (např. spirochet). Na objekt dopadají paprsky zešikma a do oka dopadnou POUZE ty, které se na něm zlomí
  - Anglicky se jí říká „darkfield microscopy“ – mikroskopie v temném poli. Pozadí je tmavé, bakterie světlá
- **Mikroskopie ve fázovém kontrastu** využívá fázový posun paprsku
- **Fluorescenční mikroskopie** jako taková by se neměla zaměřovat s imunofluorescencí (u klasické fluorescenční mikroskopie nejde vůbec o reakci antigenu s protilátkou)

# Čištění mikroskopu



- Po každém použití imerzního oleje je nutno očistit **objektiv gázou s alkoholéterem** (méně vhodný, leč použitelný, je benzín)
- Občas je nutno očistit **i neimerzní objektivy**, zejména pokud jsou potřísněny např. olejem
- Při potřísnění je také nutno otřít **mikroskopický stolek**, zde stačí čtvereček buničité vaty s benzínem. Nečistota často ulpívá pod zařízením pro uchycení sklíčka, proto je někdy nutno tuto část odmontovat a vyčistit.