

Téma P09: Diagnostika spirochetálních infekcí

K nastudování: *Borrelia*, *Leptospira*, *Treponema* (z učebnic, WWW a

Z jarního semestru: Mikroskopie, PCR, průkazy antigenů a protilátek

Lymeská borrelióza

Společná tabulka pro úkoly 1, 2 a 3. Abs. = hodnota absorbance

Písmeno pacienta	Krátký klinický popis (1–3 slova charakterizující situaci)	ELISA (Úkol 1)				W. blotting (U2)		PCR (Ú3) (+/-)	Závěr: konečná interpretace, dopor. případné léčby
		IgM		IgG		IgM (+/-)	IgG (+/-)		
		Abs.	(+/-)	Abs.	(+/-)				
J									
K									
L									
M									
N									

Úkol 1: Průkaz protilátek proti *Borrelia garinii* metodou ELISA

Odečtete podle výkladu vyučujícího výsledek reakce u pacientů s podezřením na lymeskou borreliózu. Určujeme protilátky ve třídě IgG a IgM. V poli A1 (odpovídá důlku A1 v mikrotitrační destičce) naleznete hodnotu CAL (= v postatě cut-off; všechny hodnoty absorbance nad CAL jsou pozitivní, vše pod CAL budiž negativní). V polích B1 a C1 jsou kontroly. Pacienti označení písmeny J až N jsou v barevně označených polích.

Zapište hodnotu CAL, zkontrolujte, jestli negativní a pozitivní kontrola je v pořádku. Pak odečtete a vyhodnoťte výsledky ELISA reakce pro pacienty No. J, K, L, M, N (ty nepište sem, použijte hlavní tabulku nahoře).

Hodnota CAL (důlek A1):		Hodnota absorbance K+ (důlek B1):		<input type="checkbox"/> K+ je OK <input type="checkbox"/> K+ není OK	← zaškrtněte, co platí
IgM		Hodnota absorbance K- (důlek C1):		<input type="checkbox"/> K- je OK <input type="checkbox"/> K- není OK	
Hodnota CAL (důlek A1):		Hodnota absorbance K+ (důlek B1):		<input type="checkbox"/> K+ je OK <input type="checkbox"/> K+ není OK	← zaškrtněte, co platí
IgG		Hodnota absorbance K- (důlek C1):		<input type="checkbox"/> K- je OK <input type="checkbox"/> K- není OK	

Úkol 2: Průkaz protilátek proti *Borrelia garinii* pomocí Western blotu

U pacientů řešených v úkolu č. 1 se vzorky séra či likvoru testovaly také Western blotem. Odečtete výsledky dle instrukcí. Pro odečtení reakce použijte kontrolní proužek. Diagnostické schéma je vždy stejné: ELISA je použita ke screeningu, Western blot ke konfirmaci jejich výsledků. Odečtete Western blot u pacientů J až N a zapište výsledky do hlavní tabulky.

Úkol 3: Diagnostika Lymeské borreliózy pomocí PCR

Pomocí dané fotografie PCR produktu na agarózovém gelu zakreslete a zaznamenejte, který z testovaných vzorků je pozitivní. PCR diagnostika se prováděla s ohledem na závažnost anamnézy pouze u dvou z pěti řešených pacientů. Poté proveďte celkové zhodnocení všech tří úkolů a zapište závěr.

Syfilis

Úkol 4: Přímý průkaz syfilis.

Přímý průkaz syfilis je možný pouze v případě zaslání vhodných vzorků do laboratoře. V některých stádiích nemoci však není k mání žádný vhodný vzorek pro tento účel.



a) Rabbit infectivity test – RIT

Zapište název králíka používaného pro tento test.

(Je odvozen z tohoto souostroví: →→→→→→→→→→.)

Exudát z podezřelého vředu je zpravidla vyhodnocován zástinovou mikroskopií a očkován do králíčích varlat.

Testované zvíře začíná trpět orchitidou 10 dní po naočkování. Název králíka:

b) Mikroskopie v zástině

Podívejte se na mikrofotografii treponemat ze zástinové mikroskopie, zakreslete princip zástinové mikroskopie a zaznamenejte výsledek svého pozorování.

c) Přímá imunofluorescence

Podívejte se na mikrofotografii treponemat získanou z fluorescenčního mikroskopu a zaznamenejte výsledek.

4b) princip	4b) výsledek	4c)
-------------	--------------	-----

Původce syfilis, *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, NENÍ kultivovatelný organismus. Diagnostika závisí na stádiu nemoci.

Nepřímý průkaz syfilis

Společná tabulka pro úkoly 5 a 6.

Písmeno pacienta	Krátká klinická charakterizace případu	Úkol 5 screening		Úkol 6 konfirmasi				Závěr: konečná interpretace, doporučení případné léčby	
		RRR	TPHA	ELISA		WB			
				FTA-ABS	IgM	IgG	IgM (+/-)		IgG (+/-)
A									
B									
C									
D									
E									

Úkol 5: Screening syfilis – RRR a TPHA

Těhotné ženy a dárči krve jsou screeningově vyšetřováni rychlou reaginovou reakcí (RRR) a *Treponema pallidum* pasivní hemaglutinací (TPHA). Posuďte výsledky screeningu u předložené skupiny osob a stanovte, u koho je třeba ještě zajistit podrobnější, tzv. konfirmační (potvrzovací) vyšetření. Výsledky запиšte přímo do tabulky.

RRR: pozitivní je vyvločkování. TPHA: pozitivní je tvorba aglutinátu. Více viz praktikum J07.

Úkol 6: Konfirmace syfilis – FTA-ABS, ELISA a Western blotting

Vyhodnoťte výsledky FTA-ABS, ELISA a western blottingu (WB) u pacientů se suspektní syfilis (viz předchozí úkol). Spočítejte cut-off a porovnejte s ním hodnoty pozitivní a negativní kontroly a výsledky pacientů.

V poli/důlku A1 je přítomen blank.

Hodnota cut off (C1 + D1) / 2	Hodnota absorbance K- (pole/důlek B1):	<input type="checkbox"/> K- je OK <input type="checkbox"/> K- není OK	← zaškrtněte, co platí
IgM	Hodnota absorbance K+ (pole/důlek E1):	<input type="checkbox"/> K+ je OK <input type="checkbox"/> K+ není OK	
Hodnota cut off (C1 + D1) / 2	Hodnota absorbance K- (pole/důlek B1):	<input type="checkbox"/> K- je OK <input type="checkbox"/> K- není OK	← zaškrtněte, co platí
IgG	Hodnota absorbance K+ (pole/důlek E1):	<input type="checkbox"/> K+ je OK <input type="checkbox"/> K+ není OK	

Leptospiróza

Úkol 7: Přímý průkaz *Leptospira* sp.

Podle daného obrázku popište a zakreslete morfologii leptospir kultivovaných na tekutém Korthoffově médiu po dva týdny. Pro test byla použita moč pacienta s podezřením na leptospirózu.

