# Téma P09: Diagnostika spirochetálních infekcí

**K nastudování:** *Borrelia, Leptospira, Treponema* (z učebnic, WWW atd.)

**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) | | | | Blot (Úkol 2) | | 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

Odečtěte 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 odečtěte 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): |  | ❒ K+ je OK  ❒ K+ není OK | 🡨  zaškrtněte, co platí |
| **IgM** | | Hodnota absorbance K– (důlek C1): |  | ❒ K– je OK  ❒ K– není OK |
|  | | | | | |
| Hodnota CAL  (důlek A1): |  | Hodnota absorbance K+ (důlek B1): |  | ❒ K+ je OK  ❒ K+ není OK | 🡨  zaškrtněte, co platí |
| **IgG** | | Hodnota absorbance K– (důlek C1): |  | ❒ K– je OK  ❒ K– není OK |

## Úkol 2: Průkaz protilátek proti *Borrelia garinii* pomocí imunoblotu

U pacientů řešených v úkolu č. 1 se vzorky séra či likvoru testovaly také imunoblotem. Odečtěte výsledky dle instrukcí. Pro odečtení reakce použijte kontrolní proužek. Diagnostické schéma je vždy stejné: ELISA je použita ke screeningu, Western blot ke konfirmaci jejích výsledků. Odečtěte imunoblot 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 králičích varlat. Testované zvíře začíná trpět orchitidou 10 dní po naočkování. Název králíka:

## b) Mikroskopie v zástinu

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**  **konfirmace** | | | | | | | Závěr:  konečná interpretace, doporučení případné léčby |
| RRR | TPHA | FTA-ABS | ELISA | | | | Blot | |
| IgM | | IgG | | IgM (+/–) | IgG (+/–) |
| Absor- bance | (+/–) | Absor- bance | (+/–) |
| A |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| B |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| C |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| D |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| E |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

## Úkol 5: Screening syfilis – RRR a TPHA

Těhotné ženy a dárci 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 zapište přímo do tabulky.

RRR: pozitivní je vyvločkování. TPHA: pozitivní je tvorba aglutinátu. Více viz praktikum J08.

## Úkol 6: Konfirmace syfilis – FTA-ABS, ELISA a imunoblotting

Vyhodnoťte výsledky FTA-ABS, ELISA a imunoblottingu (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): |  | ❒ K– je OK  ❒ K– není OK | 🡨  zaškrtněte, co platí |
| **IgM** | | Hodnota absorbance K+ (pole/důlek E1): |  | ❒ K+ je OK  ❒ K+ není OK |
| Hodnota cut off (C1 + D1) / 2 |  | Hodnota absorbance K– (pole/důlek B1): |  | ❒ K– je OK  ❒ K– není OK | 🡨  zaškrtněte, co platí |
| **IgG** | | Hodnota absorbance K+ (pole/důlek E1): |  | ❒ K+ je OK  ❒ 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.