

Téma P09: Diagnostika spirochetálních infekcíK 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.

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 (hraniční hodnotu; 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. Poté proveďte celkové zhodnocení všech tří úkolů a zapište závěr.

Syfilis

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

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 souostrovní: →→→→→→→→→→.)

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 zástínu

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)
-------------	--------------	-----

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	ELISA		WB		
				FTA-ABS	IgM Absorbance (+/-)	IgG Absorbance (+/-)	IgM (+/-)	
A								
B								
C								
D								
E								

Úkol 5: Screening syfilis – RRR a TPHA

Těhotné ženy a dárce 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 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.

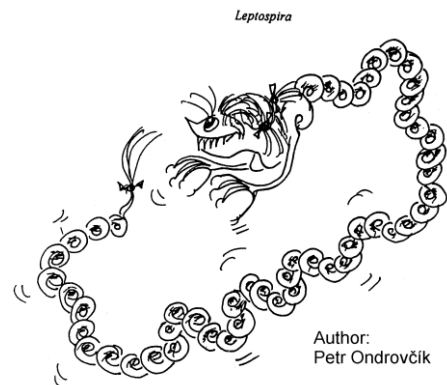
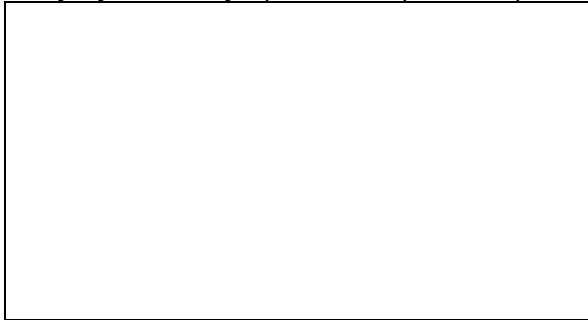
V poli/důlku A1 je přítomen blank.

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.



Kontrolní otázky:

1. Jaké je základní omezení diagnostiky spirochétových infekcí ve srovnání s běžnými bakteriálními infekcemi?
2. Pacientovi bylo odstraněno klišťe přísáté asi 2 dny v popliteální jamce, lékař navrhl zároveň odebrat krev „na borrelii“. Co tímto označením míní a jaký nález lze v této souvislosti očekávat?
3. Proč je materiál, v němž byly metodou ELISA prokázány protilátky proti některé z borrelií, vyšetřen ještě western blotem?
4. Jaké vzorky připadají v úvahu pro přímý průkaz syfilis?
5. Má smysl testovat metodou PCR materiál od pacienta, který je séronegativní (nemá protilátky proti borreliím)?
6. Stanovuje se citlivost na antibiotika u původců spirochétových infekcí?
7. U těhotné ženy byla zjištěna pozitivita RRR, jaká bude interpretace tohoto nálezu, případně další postup?
8. Je nutné při opakovaných kontrolách syfilitiků stanovovat protilátky vždy všemi sérologickými testy?
9. Která reakce nejlépe slouží k posouzení aktivity syfilis?