

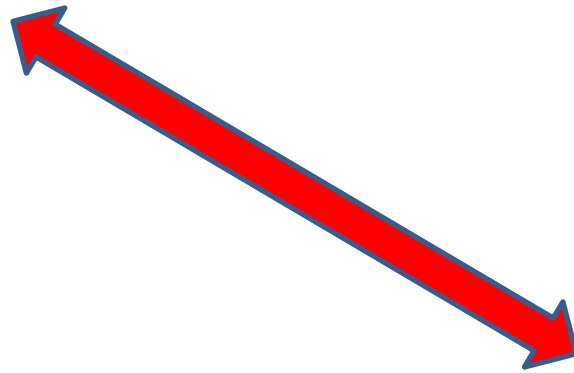
Úloha č. 4

Izolace DNA z klíštěte, detekce
Borrelia burgdorferi sensu lato
pomocí RealTime PCR, nested PCR

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*)



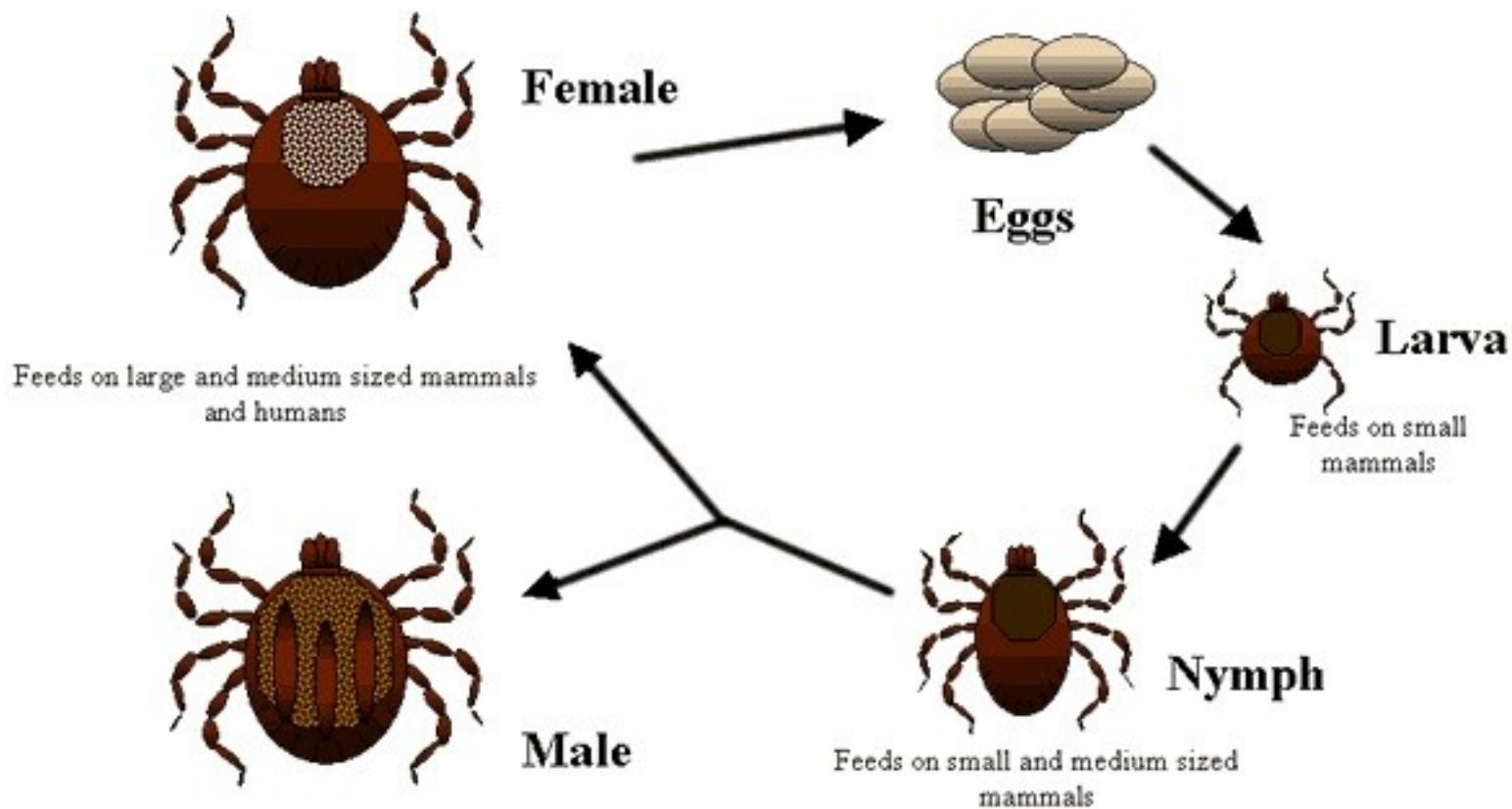
© Stefan Sollfors, www.eurospiders.com



Borrelia burgdorferi



Životní cyklus



LYMESKÁ BORELIÓZA

- V ČR nejčastější onemocnění přenášené klíšťaty.
 - Příznaky
 - Diagnostika
 - Léčba

PŘÍ

1. stádium (lokalizovaná infekce)

- **erythema migrans** – je u 90 % pacientů.
- kožní změny
- chřipkové stavy – horečka
- modročervený uzlík – 1

2. stádium (generalizovaná infekce)

- cca u 15 % nemocných
- bolesti hlavy, ztuhlost šíje, bolest zad, končetin, horečka
- značná únava
- srdeční obtíže



0 %

ů

yka)

PŘÍZNAKY

3. Stádium (chronické infekce – měsíce až roky)

- zánět mozku, míchy, postižení zrakového nervu
- Atrofie kůže
- Postižení kloubů

DIAGNOSTIKA

- Nespecifické příznaky ztěžují diagnostiku
- Laboratorní testy:
 - **ELISA** – detekce sérových protilátek; nepříliš spolehlivé, možnost falešné negativy i pozitivy vzorku.
 - **Western Blot** – detekce specifických protilátek; přesnější a spolehlivější, možnost falešné negativy.
 - **PCR** – detekce DNA borrelií; vysoce citlivá, záleží na fázi onemocnění – lokalizace borrelií.
- **Optimální je kombinace více metod**

LÉČBA

- **Antibiotika** (doxycyklin, amoxicilin, sumamed, erytromycin, ceftriaxon) .
- V časném stádiu je léčba účinná, dá se předejít chronickým potížím a přestupu do vyšších stádií.

Délka léčby antibiotiky:

1. stádium (časná infekce) - délka léčby 14 dnů
2. stádium (akutní zánět pohybového systému) - 21-28 dnů
3. stádium (chronická artritida) - 28 dnů

POSTUP

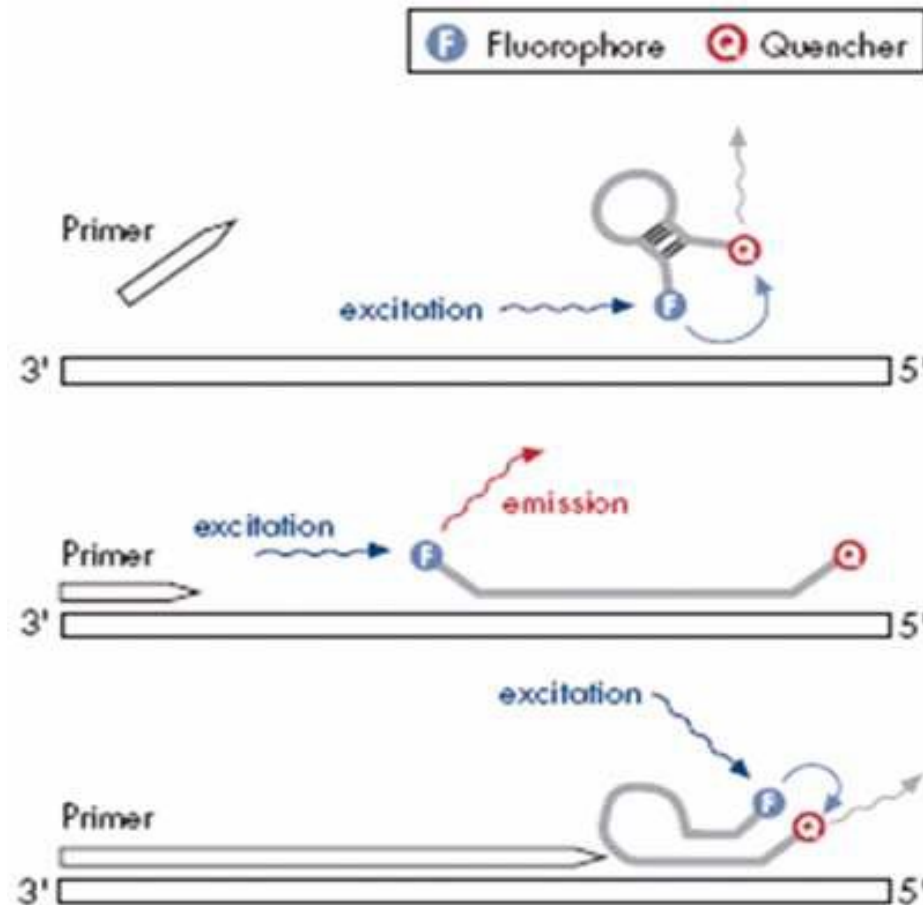
- Izolace DNA z klíštěte
- Detekce borrelií – RealTime PCR
- Příprava na sekvenaci – nested PCR

RealTime PCR

- Detekce PCR produktů v reálném čase na základě fluorescence hybridizačních resp. hydrolyzačních sond.
- Hlavní výhoda oproti klasické PCR je možnost kvantifikace vzorku, vysoká specifita a senzitivita, časová úspora.
- Využití:
 - Výzkum – kvantifikace genové transkripce, detekce organismů, detekce polymorfizmů.
 - Klinická diagnostika – detekce patogenů, genetických abnormalit.

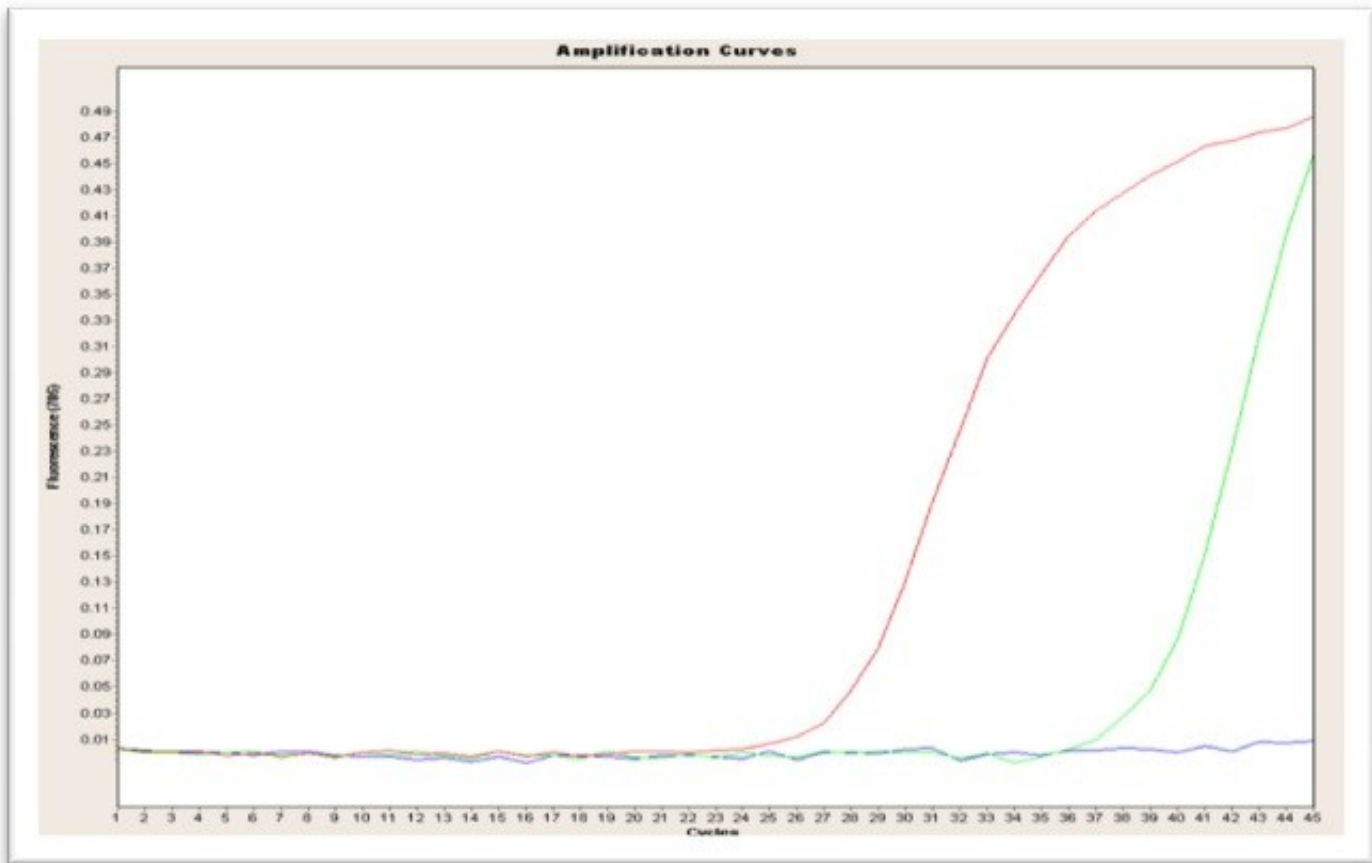
RealTime PCR

- Detekce borrelií – využití molekulárního majáku (molecular beacon)



RealTime PCR

- Vyhodnocení



Nested PCR

- dvoukroková PCR – 2 sady primerů (vnější a vnitřní), vysoce specifická amplifikace.
- využití:
 - kontaminace vzorku – selekce požadovaného úseku DNA
 - **dodatečná amplifikace vzorků s nízkým výtěžkem po 1. PCR**



nutné pro sekvenační reakci