

Detekce spirochet

Rod

1. *Treponema pallidum* – (syfilis)
turbidimetrie, latexová aglutinace,
elektrochemiluminiscence
2. *Leptospira interrogans* sensu lato –
(leptospiróza) MAT
3. *Borrelia burgdorferi* sensu lato –
(borelióza) ELISA, WB

Detekce treponemové infekce

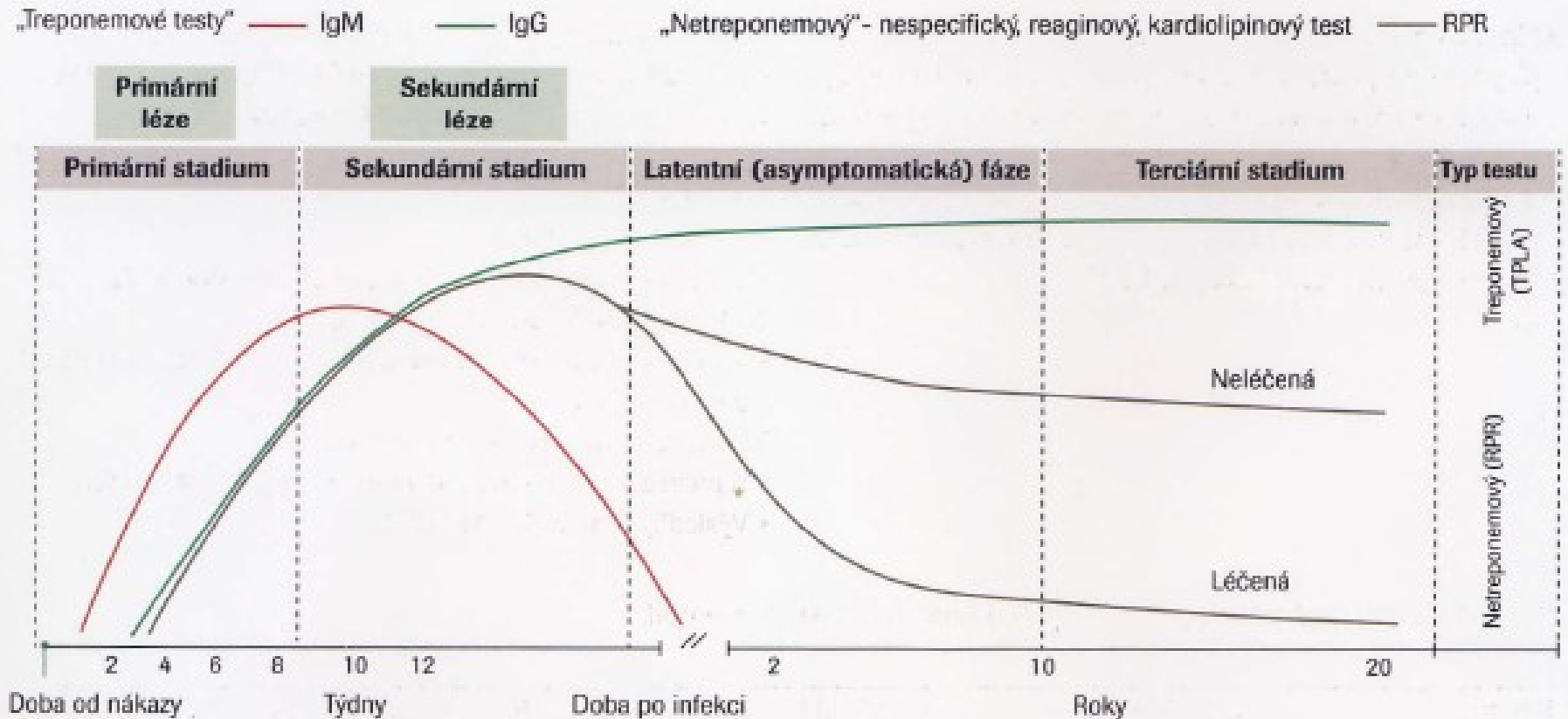
- *Treponema pallidum*-původce **syfilis**
- Např. V r. 2012 hlášeno dalších **12 milionů** nemocných (WHO), rozvojové země
- **Přenos:** pohlavní styk
- Z matky na plod
- Krevní transfuze
- Transplantace
- Tvorba Ab: 2 týdny trvá vytvoření **IgM**, 2 – 3 týdny **IgG**
- Ab zaměřené proti fosfolipidovým Ag na povrchu *T. Pallidum*, reakce Ab zkříženě reaguje s kardiolipinem, který se uvolňuje, když treponema poškodí hostitelské buňky

Metody detekce treponemové infekce

- 1. Netreponemový test **RPR**- nespecifický rychlý reaginový test z plazmy- detekce vzniklých IK zákalovou reakcí, tj. turbidimetrií
- 2. Treponemový test **TPLA**-*T.pallidum* latexová aglutinace, latex +Ag – komplex vychytává Ab pacienta
- EIA metoda, FIA metoda
- **Nově** – přímá reakce: Ag navázaný na pevný nosič a označený biotinem (konjugát)– vychytává Ab – 1. inkubace, vznik IK- magnetická fáze +luminol - 2. inkubace a detekce **elektrochemiluminiscencí**

Dynamika tvorby Ab

Sérokonverze při infekci *T. pallidum*

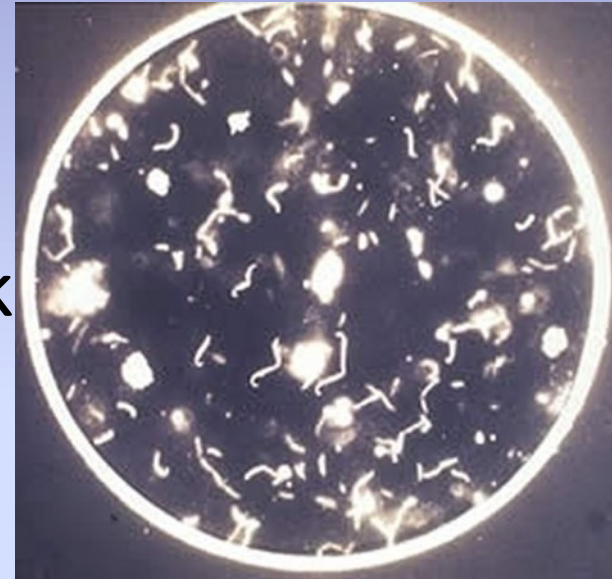


Upravený graf ze studie Peeling et al. (2004).⁸

RPR - rychlý reaginový test; TPLA - *T. pallidum* latexová aglutinace.

MAT

- Mikroskopický aglutinační test – specifické Ab (IgM i IgG) proti konkrétnímu sérovaru L.i.s.l.
- Kultivace sérovarů
- Ag + vzorek ředěného séra, otisk srdce na filtr. papíru atd.
- Mikroskopie v zástinu
- Ředěný pozitivní vzorek- aglutinace více než 50% leptospir



Borrelia burgdorferi s.l.

- Laboratorní detekci lze provádět pomocí metod přímých (A), kdy detekujeme bakterie nebo jejich nukleové kyseliny a nepřímých (B), založených na imunitních mechanismech

A) Přímé

- Kultivace, PCR, DFM, elektronová mikroskopie
- Vzorok: krev, míšní mok, moč

B) Nepřímé

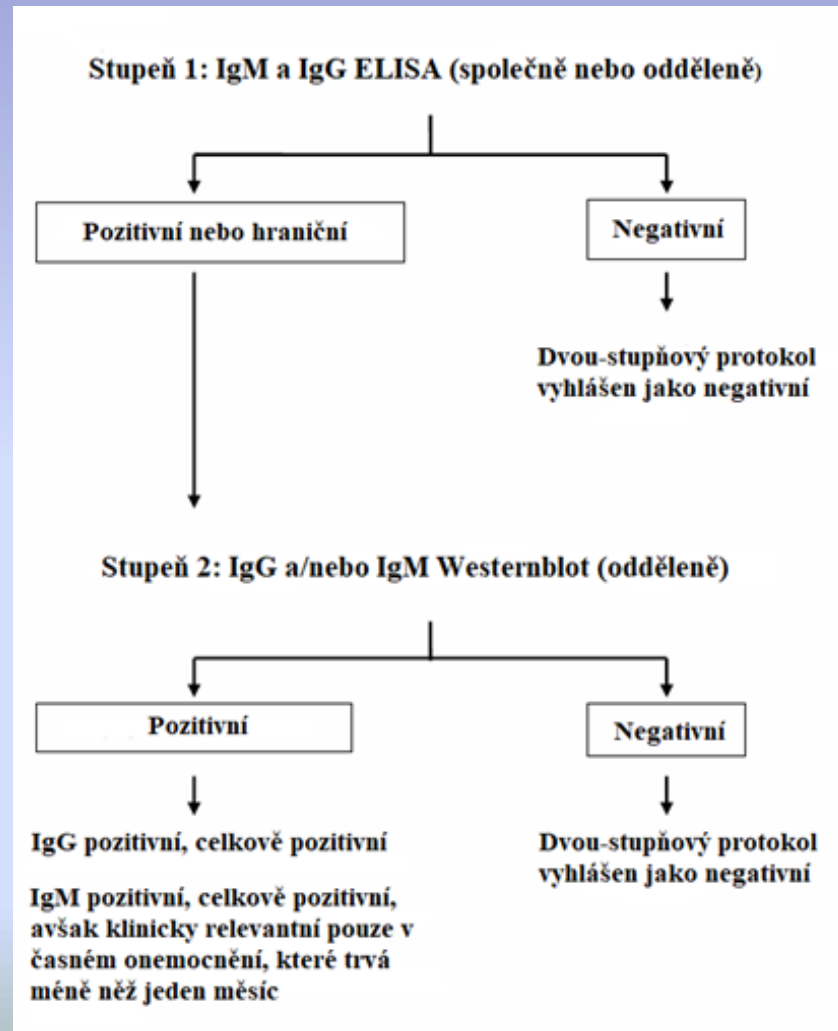
Pomocí nepřímého průkazu se snažíme prokázat infekční agens dle stop, které toto agens zanechalo v organismu. Nejčastěji dochází k nálezů protilátek, vzácněji k průkazu specifické buněčné imunity

Sérologické reakce průkaz Ag nebo Ab

- Nejčastější ELISA (méně FIA)
- Western blot

Schéma dvou-stupňového testování lymeské borreliózy

IgM, IgG, IgA

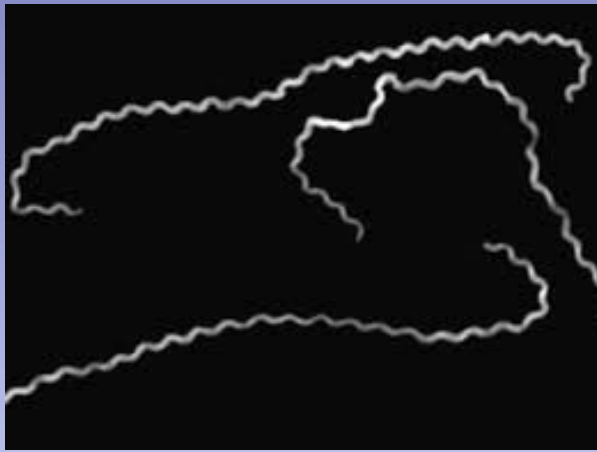


Upraveno dle Johnson, 2011

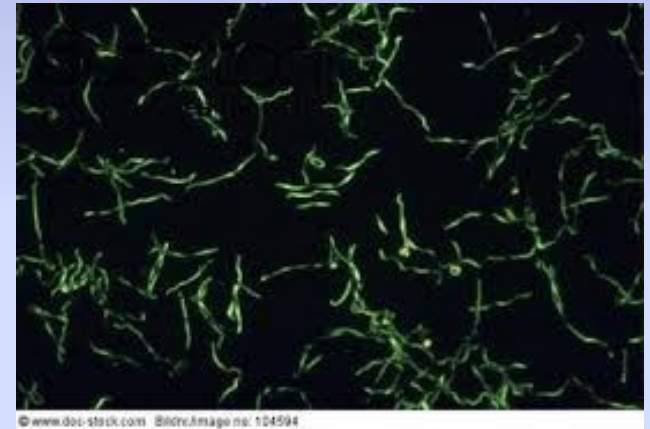
Antigeny využívané v diagnostice

- Znalost antigenního povrchu je důležitá z hlediska diagnostiky. Testy využívají nativních celobuněčné extrakty, rekombinantní antigeny nebo syntetické peptidy. Rekombinantní antigeny jsou v testech obsaženy samostatně nebo v kombinaci. Příprava rekombinantních proteinů se skládá z izolace genu kódující daný protein, jeho exprese ve vektoru a z následné purifikace (Cook & Puri, 2016; Běláková et al., 2005).
- Patří mezi ně především imunodominantní protein flagelin (41 kDa), protein flagelárního pláště FlaA (37 kDa), proteiny BBK32, P39, P35 a vnější povrchové proteiny OspA, OspB, OspC, OspE, OspF, VlsE a DbpA. Používají se jak v testech ELISA i Western blot. Z počátku infekce je velice významným antigenem protein OspC (21-25 kDa), kódovaný plazmidem.
- Protein OspC je exprimován během sání klíštěte. OspC protein je heterogenní a byly nalezeny rozdíly v aminokyselinovém složení u různých kmenů Bbsl (Theisen et al., 1993; Jauris & Heipike et al., 1993).

- Rozdíly byly také nalezeny mezi jednotlivými sérotypy *B. garinii*. V rámci Bbs1 bylo identifikováno 69 OspC skupin (Lagal et al., 2003). Bylo prokázáno, že protein **OspC** je významným faktorem virulence jak z hlediska infekivity tak invazivity (Seinost et al., 1999). Ukázalo se, že protein OspC lépe reaguje se séry pacientů s časnou LB. **VlsE** protein je se svou senzitivitou srovnatelný s OspC v časně fázi, nicméně má výbornou senzitivitu u pacientů s pozdními projevy, zejména s neuroboreliózou. DbpA protein z různých druhů Bbs1 detekuje převážně IgG protilátky. Rekombinantní **BK32** se užívá k detekci protilátek v kterémkoliv stadiu LB. Protein P66 (66-kDa) je významnou součástí IgG WB (Augero-Rosenfield et al., 2005).
- Peptidy užívané v testech obsahují vybrané imunoreaktivní epitopy imunodominantních antigenů. Tyto peptidy jsou vysoce konzervativní, proto jsou méně křížově reaktivní než celé antigeny. Takovými jsou peptid C10 a C6 (IR6). Peptid C10, jež obsahuje konzervativní C terminální aminokyseliny je odvozen od proteinu OspC. Peptid C10 váže především protilátky IgM. Největší citlivosti se dosahuje v časně fázi. Testy používající peptid C6, který je velice imunogenní, a pochází z konzervativní oblasti VlsE. Testy používající peptid C6 jako antigen, mají dostatečnou citlivost a specifitu ve všech stádiích LB. Testy založené na peptidu C6 by mohly být použity samostatně a nahradit zavedené dvou-stupňové testování. Tyto peptidy jsou vysoce konzervativní, proto jsou méně křížově reaktivní než celé antigeny (Stanek et al., 2011; Augero-Rosenfield et al., 2005; Wormser et al., 2013). V příloze č.1 se nachází tabulka příkladů antigenů od společnosti Euroimmun a TestLine Clinical diagnostics, která patří mezi největší producenty ELISA a WB testů v ČR.



Leptospira interrogans s.l.



Treponema pallidum

<https://www.google.cz/>



Borrelia burgdorferi s.l.

