

# 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

# Detekce treponemové infekce

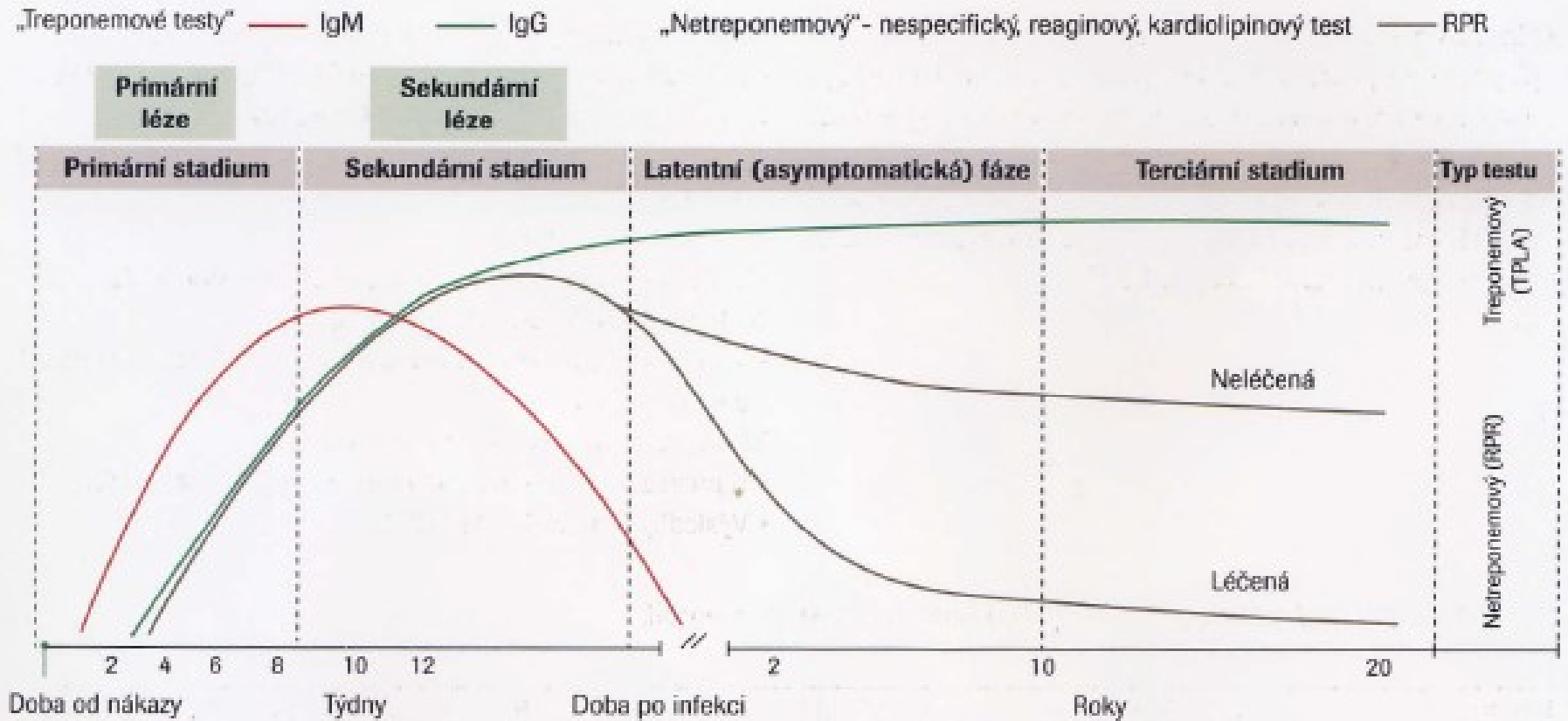
- *Treponema pallidum*-původce **syfilis**
- V r. 2012 hlášeno dalších **12 milionů** nemocných (WHO)
- **Přenos:** pohlavní styk
- Z matky na plod
- Krevní transfuze
- Transplantace
- Tvorba Ab: 2 týdny trvá vytvoření **IgM**, 2 – 3 týdny **IgG**
- Ab zaměřené proti fosfolipidovým Ag na povrchu *T. 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- Ab zkříženě reaguje s kardiolipinem, 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 ELISA v kombinaci s chemiluminiscencí: 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*



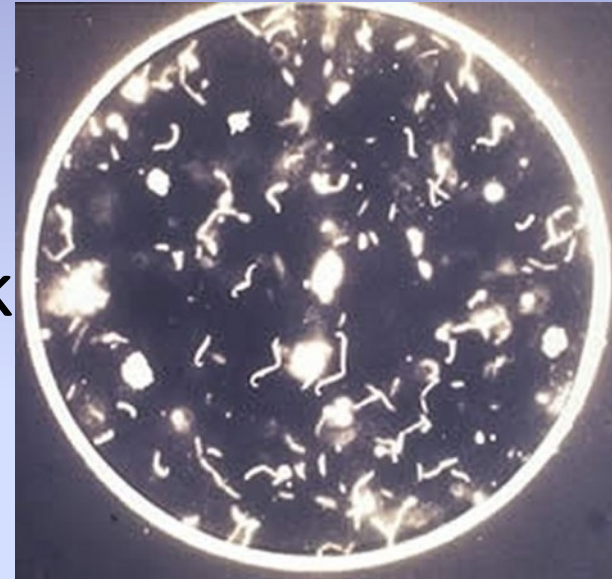
Upravený graf ze studie Peeling et al. (2004).<sup>8</sup>

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

- *Leptospira interrogans* s.l.

# 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
- 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)

- Kultivace, PCR, DFM
- Vzorok: krev, míšní mok

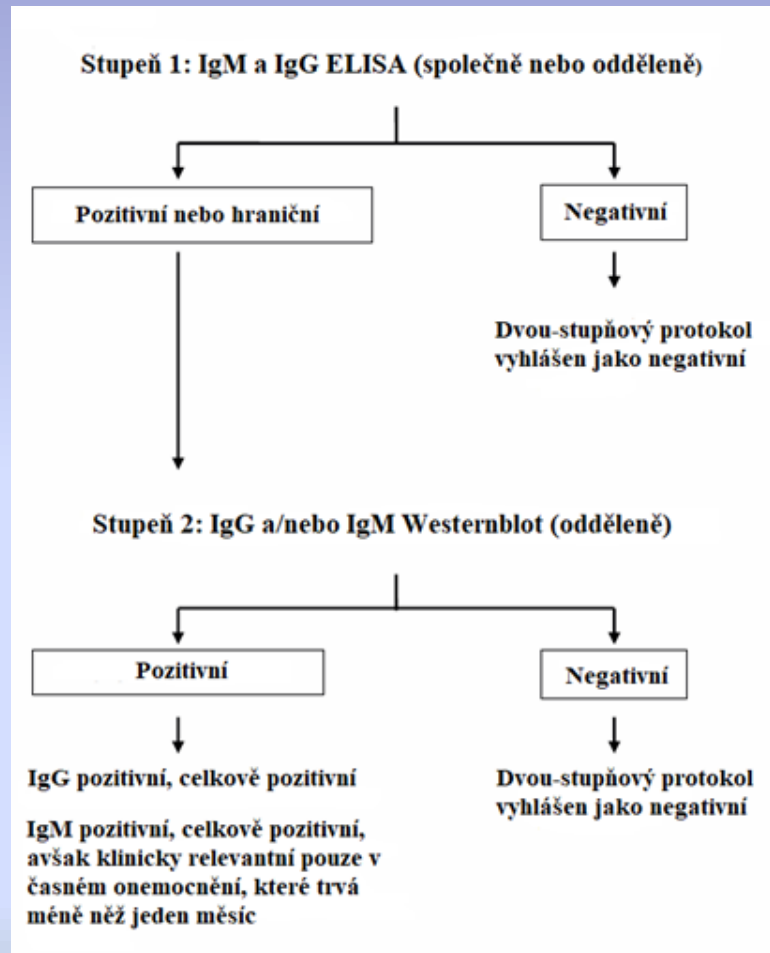
B) Pomocí nepřímého průkazu se snažíme prokázat infekční agens dle stop, které toto agens zanechalo v organismu. Nejčastěji dochází k nálezů protilátek, vzácněji k průkazu specifické buněčné imunity

Sérologické reakce průkaz Ag nebo Ab

- Nejčastější ELISA (méně FIA)
- Western blot

# Schéma dvou-stupňového testování lymeské borreliózy

IgM, IgG, IgA



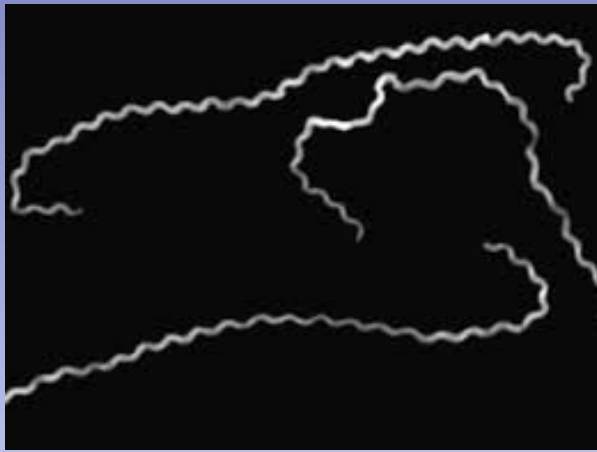
Upraveno dle Johnson, 2011



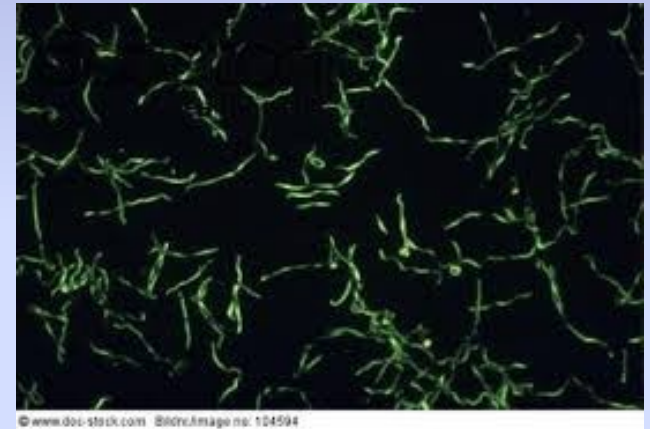
# Antigeny využívané v diagnostice

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 Bbsl 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 Bbsl detekuje převážně **IgG** protilátky. **Rekombinantní BBK32** 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.



*Borrelia burgdorferi* s.l. spirochetes in culture

© www.doc-stock.com | iStock Image no. 104594

*Borrelia burgdorferi* s.l.



*Treponema pallidum*

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