

Western Blot protilátek IgG a IgA *Chlamydia trachomatis* a *Chlamydia pneumoniae*

M.Švajdová, J.Raszka, J.Januška, H.Zelená

Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě
Centrum mikrobiologie, parazitologie a imunologie
Virologické oddělení

ÚVOD

Chlamydie jsou malé intracelulární bakterie. Jako lidské patogeny se uplatňují zejména tři druhy chlamydií: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* a *Chlamydia pneumoniae*.

Infekce zapříčiněné *C. trachomatis* primárně postihují epitel urogenitálního traktu a patří k nejčastějším sexuálně přenosným nákazám. *C. pneumoniae* primárně postihuje epitel respiračního traktu, v monocitech se pak agens dostává také do endotelu krevních cév, do synovií nebo do centrálního nervového systému. Po převážně asymptomaticky nebo slabě symptomaticky probíhajících primoinfekcích a reinfekcích chlamydiemi se manifestují, teprve po letech, těžké následné poruchy. Laboratorní diagnostika chlamydiových nákaz je založena na přímém průkazu chlamydií, resp. chlamydiového genomu v biologickém materiálu a nepřímém průkazu infekce – detekci specifických protilátek v séru. Jedním ze způsobů rozlišení chlamydiových druhově specifických protilátek je technika Western Blotu nebo imunoblotu. Technika průkazu protilátek metodou Western Blot vhodně doplňuje sérologická vyšetření ELISA testy. Předností metody je determinace jednotlivých antigenů, proti kterým jsou naměřeny pacientovy protilátky, což umožňuje přesnější interpretaci sérologického výsledku. Zásadní význam pro diagnostiku chronických onemocnění má detekce protilátek proti „heat shock“ proteinům (HSP). Anti-chlamydiové HSP-60 protilátky se jeví jako citlivý ukazatel přetrvávající infekce, nejen v gynekologii, porodnictví a reprodukční medicíně, ale i u autoimunních onemocnění, jako je reaktivní artritida a infekce sdružené s astmatem, stejně jako u nemoci oběhové soustavy. Protilátky proti antigenu 57 kD *C. trachomatis* souvisí s reaktivní artritidou. Přítomnost protilátek proti některým antigenům *C. pneumoniae* (54 kD, 35 kD a HSP-60) ukazuje na zvýšené nebezpečí aterosklerózy.

METODIKA

Western Blot protilátek IgG a IgA *Chlamydia trachomatis* a *Chlamydia pneumoniae* byl proveden pomocí setu fy AID (Německo) dle návodu výrobce. Metoda je založena na detekci protilátek třídy IgG a IgA proti jednotlivým elektroforeticky rozděleným chlamydiovým antigenům. Antigeny jsou rozděleny dle molekulové hmotnosti a umístěny v prouzcích na nitrocelulóзовých střípech. Jsou-li ve vzorku přítomny protilátky, reagují s antigenem. V dalším kroku se naváží protilátky proti lidským IgG nebo IgA značené alkalickou fosfatázou. Navázaný enzym pak reaguje se substrátem za vzniku modře zbarveného produktu. Reakce se projeví na střípu ve formě barevného proučku. K objektivnímu vyhodnocení se používá scanner, který vyhodnotí zbarvení jednotlivých proučků a porovná intenzitu zbarvení s dodanou kontrolou. Umístění a označení jednotlivých antigenických proučků na střípech s negativním a pozitivním nálezem ukazuje obr. 1 a 2. Příklady vyhodnocení a zápisu odečtu Western Blotu pomocí scanneru ilustruje obr. 3.

Pro stanovení protilátek v ELISA byly použity sady fy MEDAC pro průkaz druhově specifických protilátek - *C. pneumoniae* IgG, IgA a *C. trachomatis* IgG, IgA. Vyšetřovaná séra: Metodou Western Blot a ELISA bylo vyšetřeno v rámci rutinní laboratorní diagnostiky 58 vzorků sér pacientů, zejména s onemocněním pohybového aparátu (16), dále onemocnění urogenitálního (10) a respiračního traktu (9).

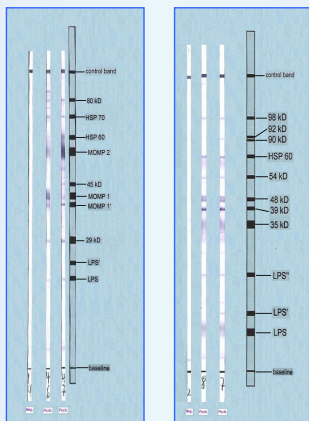
VÝSLEDKY

Jedním z cílů práce bylo srovnat dvě techniky průkazu specifických protilátek proti chlamydiím – ELISA a Western Blot, z hlediska citlivosti. Srovnání výsledků průkazu protilátek ELISA technikou a Western Blotem je uvedeno v tabulkách č.1-4. Četnost průkazu protilátek proti jednotlivým antigenům *C. trachomatis* a *C. pneumoniae* v imunoglobulinových třídách IgG a IgA znázorňují grafy č. 1 a 2.

Ve sledovaném souboru sér pacientů byly prokázány protilátky proti HSP-60 *C. trachomatis* u osmi osob, u tří osob byly stanoveny protilátky proti HSP-70. V devíti případech byly zjištěny protilátky proti antigenu 57 kD *C. trachomatis*, související s reaktivní artritidou. Přítomnost protilátek proti některým antigenům *C. pneumoniae* (54 kD, 35 kD, HSP-60), ukazující na zvýšené nebezpečí aterosklerózy, byla zjištěna u osmi osob. U patnácti pacientů byly prokázány protilátky proti HSP-60 *C. pneumoniae*.

ZÁVĚR

Srovnání technik průkazu antichlamydiových protilátek metodou ELISA a Western Blot ukázalo dobrou shodu z hlediska senzitivity, a to přesto, že kritéria hodnocení výsledků těchto metod jsou značně rozdílná – kupř. v testu Western Blot *C. pneumoniae* kritériem pozitivit protilátek třídy IgG je průkaz protilátek proti nejméně třem specifickým antigenům. Determinace jednotlivých antigenů pomocí Western Blotu umožňuje zpřesnění laboratorní diagnostiky chlamydiových onemocnění. Celkově lze konstatovat, že využití techniky Western Blot představuje významný přínos pro diagnostiku onemocnění způsobených chlamydiemi, zejména z hlediska rozpoznání chronických stavů - onemocnění pohybového aparátu, oběhové soustavy, urogenitálního a respiračního traktu.



Obr. 1: *C. trachomatis*, příklad negativního a pozitivního výsledku

Obr. 2: *C. pneumoniae*, příklad negativního a pozitivního výsledku

Tab. 1: Srovnání metod ELISA a WB *C. trachomatis* IgG

WB POZITIVNÍ	1	3
WB NEGATIVNÍ	29	6
n = 39	ELISA NEGATIVNÍ	ELISA POZITIVNÍ

Tab. 1: Srovnání metod ELISA a WB *C. trachomatis* IgA

WB POZITIVNÍ	6	4
WB NEGATIVNÍ	28	1
n = 39	ELISA NEGATIVNÍ	ELISA POZITIVNÍ

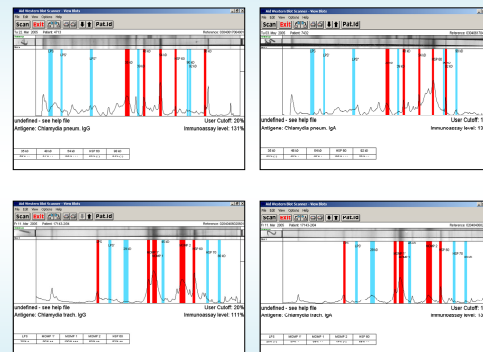
Tab. 1: Srovnání metod ELISA a WB *C. pneumoniae* IgG

WB POZITIVNÍ	2	36
WB NEGATIVNÍ	6	14
n = 58	ELISA NEGATIVNÍ	ELISA POZITIVNÍ

Tab. 1: Srovnání metod ELISA a WB *C. pneumoniae* IgA

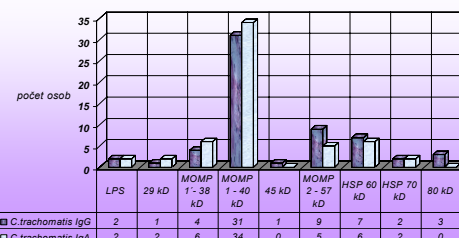
WB POZITIVNÍ	3	33
WB NEGATIVNÍ	17	5
n = 58	ELISA NEGATIVNÍ	ELISA POZITIVNÍ

Příklady vyhodnocení a zápisu odečtu Western Blotu pomocí scanneru

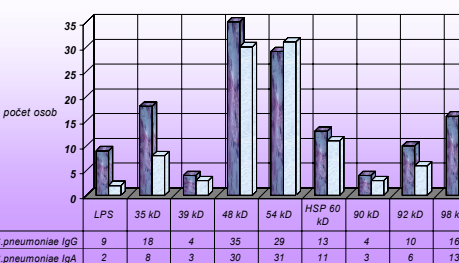


Obr. 3

Graf č. 2: Četnost průkazu protilátek proti jednotlivým antigenům *C. trachomatis* ve sledovaném souboru pacientů (n=39)



Graf č. 2: Četnost průkazu protilátek proti jednotlivým antigenům *C. pneumoniae* ve sledovaném souboru pacientů (n=58)



LITERATURA

- Bas S., Vischer T.L. (2000): Chlamydial serology: comparative diagnostic evaluation of immunoblotting and immunoassays using different recombinant proteins as antigens. Proceedings 4th Meeting of the European Society for Chlamydia Research, Helsinki, 78.
- Hejnar P., Koukalová D. (2002): Serodiagnostics of chlamydial infections – Significance of positivity in IgA and/or IgM antibody classes only. Biomed. papers 146(2), 33–35.
- Kuněš P., Krejček J. (2001): Ateroskleróza, imunitní odpověď a protein tepelného šoku HSP65/60. Cor Vasa 43(4):205–212.
- Medková Z., Toršová V. (2001): *Mycoplasma pneumoniae* a *Chlamydia pneumoniae*: původci respiračních infekcí a jejich vztah k některým chronickým onemocněním. Interní medicína pro praxi 2001/1 str. 13.
- Medková Z., Zeman K., Pospíšil L., Andeja J., Štroblová H. (2003): Antichlamydiové protilátky u osob s akutním infarktem myokardu, nestabilní anginou pectoris a kontrolní bez rizikových znaků aterosclerózy. Sborník přednášek - abstrakta Mezinárodní konference Chlamydiové infekce, Brno 13. – 15.11.2003.