

Přehled o roztočích (Acar: Acaridida)

Iva Kudlíková & Jan Hubert

Výzkumný ústav rostlinné výroby

Drnovská 507,

Praha 6, 161 06,

kudlikova@vurv.cz

hubert@vurv.cz



Antropogenní roztoči (Od volně žijících k synantropním)



Půdní prostředí



Hnízda
drobných savců



Obydlí
člověka



Hnízda
ptáků



Uniformní potravní zdroje

- mikroskopické houby
- bakterie
- kvasinky
- odumřelé rostlinné tkáně
- odumřelé živočišné tkáně

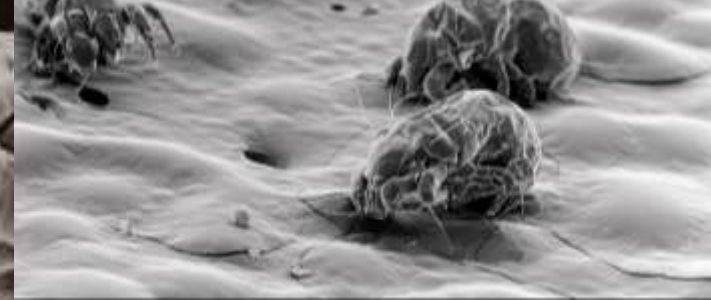


Příznivé abiotické podmínky

- vysoká vlhkost (kolísající)
- vhodná teplota

Antropogenní roztoči produkují alergeny

- Současným trendem je vzrůstající počet alergických onemocnění způsobených alergeny obsaženými v tělech a exkrementech roztočů.
- Alergeny skladištních roztočů ohrožují rizikové pracovní skupiny, tj. pracovníky potravinářského průmyslu (mlynáře, pekaře, pracovníky velkoobjemových obilných skladů), ale mohou být nebezpečné i pro koncové spotřebitele.
- Edston & van-Hage-Hamstem (2003) – Case report – úmrtí farmáře 47 let, senzitivního na roztoče pravděpodobně následkem anafylaktického šoku. (Int J Legal Med. 2003;117(5):299-301)



Skladištní roztoči

Čeleď	Druh
Glycyphagidae	<i>Lepidoglyphus destructor</i> <i>Glycyphagus domesticus</i>
Acaridae	<i>Acarus siro</i> <i>Thyreophagus entomophagus</i> <i>Tyrophagus putrescentiae</i> <i>Aleuroglyphus ovatus</i>
Chortoglyphidae	<i>Chortoglyphus arcuatus</i>



Prachoví roztoči

Čeled'

Echimyopodidae

Druh

Blomia tropicalis

Blomia tjobodas

Pyroglyphidae

Dermatophagoides farinae

Dermatophagoides pteronyssinus

Dermatophagoides siboney

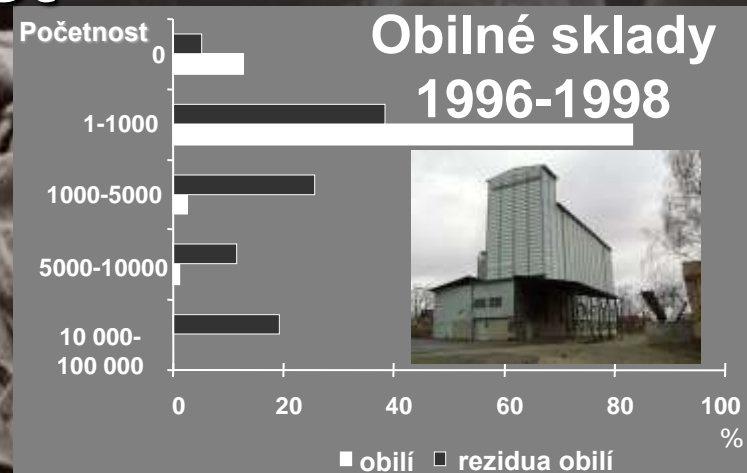
Dermatophagoides microceras

Euroglyphus maynei



Infestace potravin roztoči snižuje jejich bezpečnost

V příznivých podmínkách (teplota – 25oC, vlhkost 85%) se mohou roztoči velmi rychle namnožit z desítek na tisíce jedinců. Takto velké populace silně kontaminují skladované potraviny alergeny, které mohou vyvolat u vnímavých konzumentů anafylaktickou reakci.



Druhy	Počet /g	Potravina	Stát	Reference
<i>D. farinae</i>	??	Beignets	USA	Erben et al. 1993
<i>T. putrescentiae</i>	11,000-14,000	Hot-cake powder	Japonsko	Matsumoto et al. 1996
<i>D. farinae</i>	5,000-50,000	mouka	Španělsko	Blanco et al. 1997
<i>T. entomophagus</i>				
<i>D. farinae</i>	5,000	mouka	Venezuela	Sanchez-Borges et al. 1997
<i>D. pteronyssinus</i>				
<i>Suidasia spp.</i>				
<i>A. ovatus</i>				
<i>T. putrescentiae</i>		kukuřičná mouka	Brazílie	Guerra-Bernd et al. 2001
<i>D. pteronyssinus</i>				
<i>D. farinae</i>				
<i>D. farinae</i>	5,000	mouka		Castillio et al. 1995
<i>D. farinae</i>	7,115	Beignets	USA	Spiegel et al. 1995

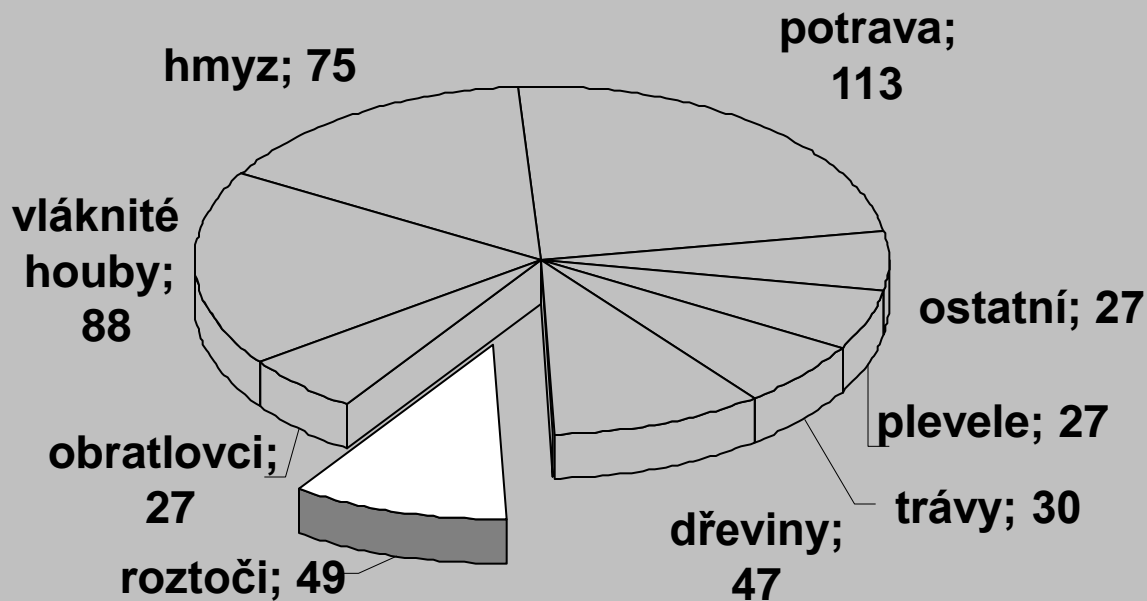
Klasifikace alergenů

Alergeny, které mají stejné biochemické vlastnosti, stejnou biologickou funkci a více než **67%** shodných aminokyselin, jsou zařazeny do stejné třídy.

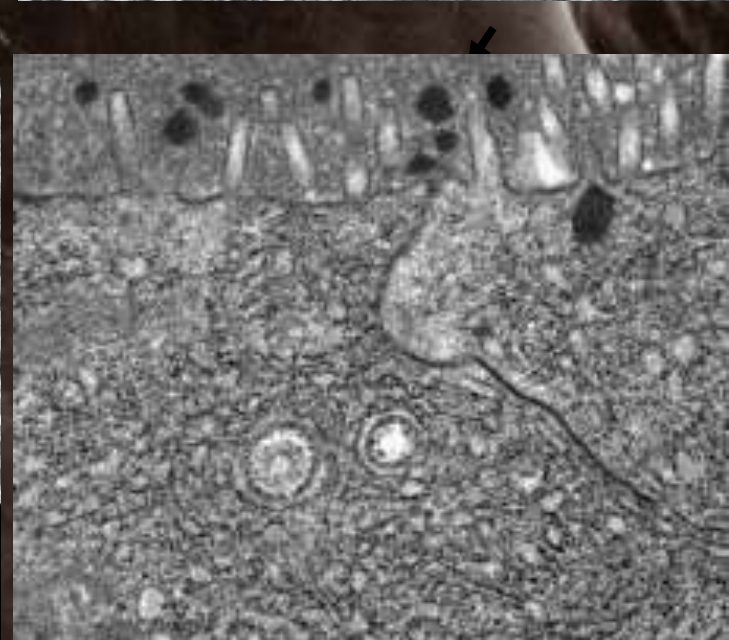
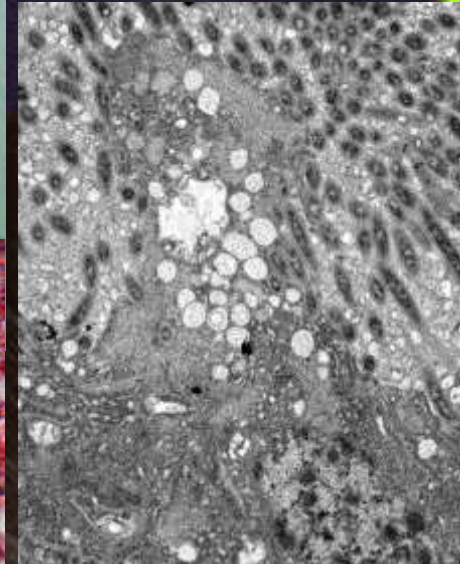
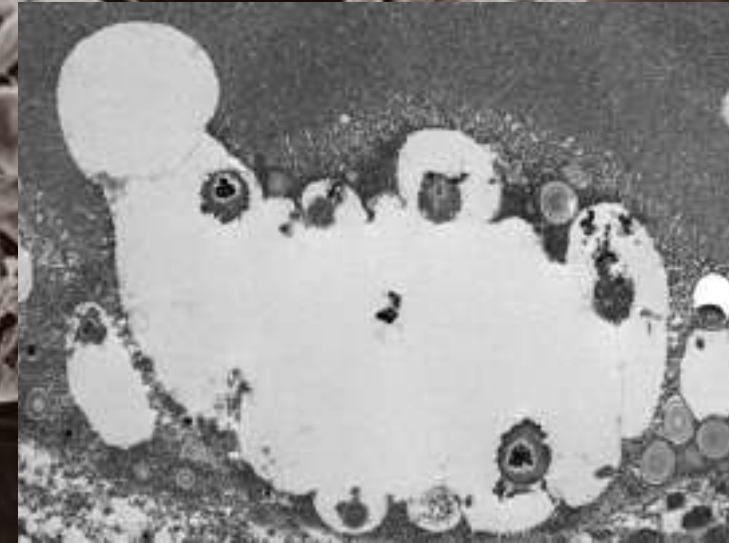
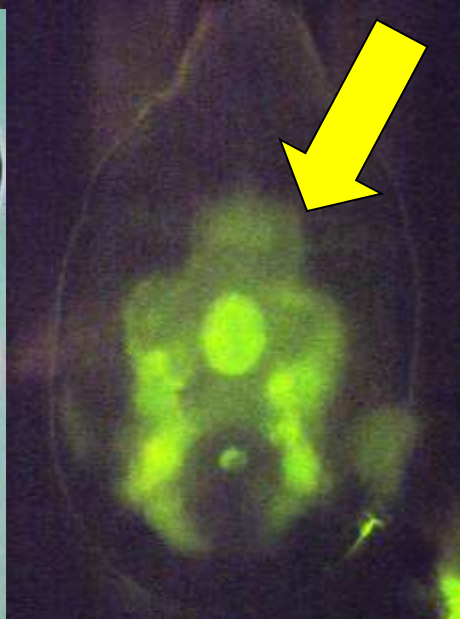
Nyní je na serveru www.allergen.org popsáno 519 lidské Ig-E vázajících látek.



- Z tohoto počtu je produkováno roztoči 49 IgE vázajících látek ve 21 třídách alergenů.



Trávicí takt roztočů: místo produkce některých alergenů



Jaké jsou hlavní alergeny roztočů?

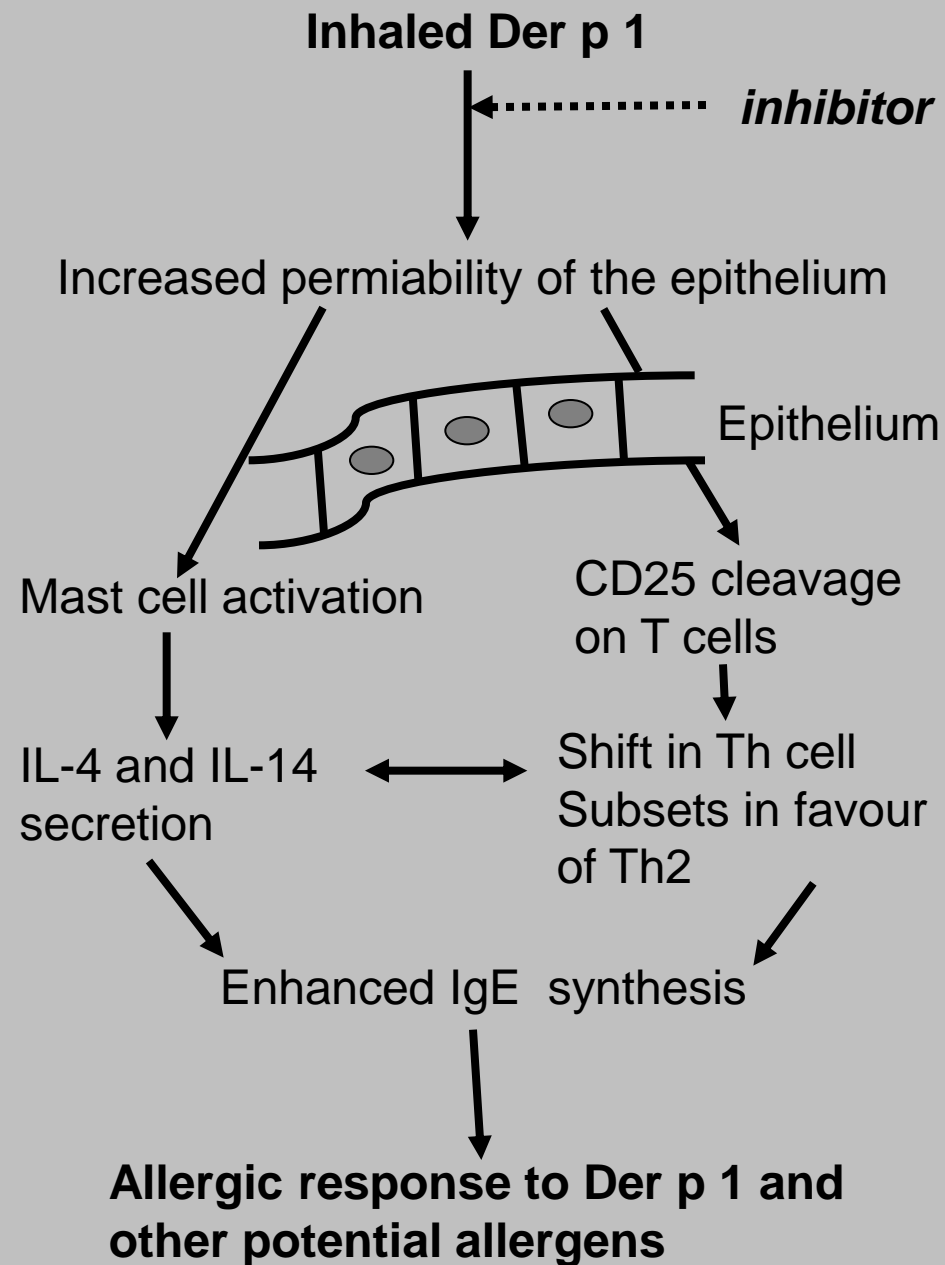


Class	molekulární váha kDa	biochemická funkce	IgE vazba %
1	25	Cystein protease	80-100
2	14-18	???	80-100
3	30	Trypsin	16-100
4	60	Amylase	40-46
5	14	???	50-70
6	25	Chymotrypsin	40
7	22-28	???	50
8	26	Glutathionate-S-transferase	40
9	24	Collagenolytic serine protease	90
10	36	Tropomyosin	50-95
11	98	Paramyosin	80
12	14	???	50
13	15	Fatty acid binding pro.	10-23
14	177(variable)	Vitellogenin/Apolipophorin	90
15	98	Chitinase	70
16	53	Gelsolin/villin	35
17	53	Ca binding protein	35
18	60	Chitinase	60
19	7	Anti-microbial peptide	10
20		Arginin kinase	??

Podle
Thomas et
al. 2002

Enzymové alergený

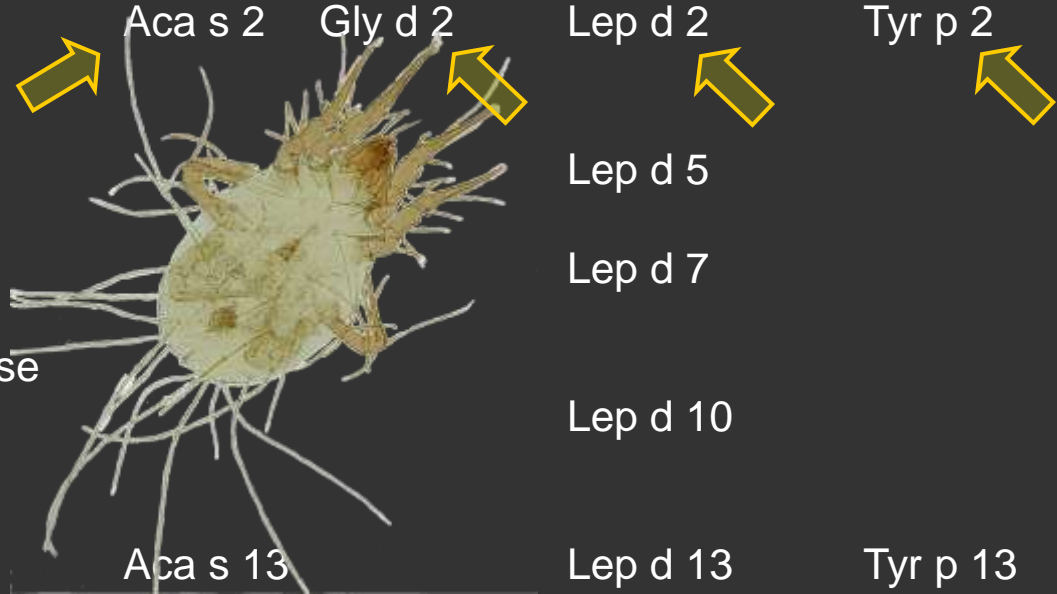
- Některé proteázy vyvolávají alergickou reakci svou enzymovou aktivitou.
- V případě proteáz roztočů jsou to proteázy cysteinové (Der p 1, Blo t 1, Der f 1) a serinové (Blo t 3, Der p 3, Der f 3, Blo t 6, Der p 6, Der p 9).
- Např. “Der p 1“ zvyšuje propustnost plicního epitelu, hydrolyzuje proteinové receptory na T lymfocytech a tím polarizuje imunitní odpověď. Tyto aktivity je možné zablokovat použitím inhibitoru (E64) (Stewart & Robinson 2003).



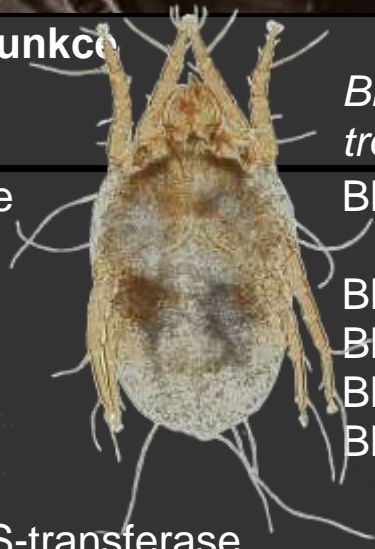
after Shakib and Gough 2000

Skladištní roztoči: alergeny

Class	Biochemická funkce	druhy			
		<i>Acarus siro</i>	<i>Glycyhagus domesticus</i>	<i>Lepidoglyphus destructor</i>	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>
1	Cystein protease	Aca s 2	Gly d 2	Lep d 2	Tyr p 2
2	???				
3	Trypsin				
4	Amylase				
5	???			Lep d 5	
6	Chymotrypsin				
7	???			Lep d 7	
8	Glutathionate-S-transferase				
9	Collagenolytic serine protease				
10	Tropomyosin			Lep d 10	
11	Paramyosin				
12	???				
13	Fatty acid binding pro.	Aca s 13		Lep d 13	Tyr p 13
14	Vitellogenin/Apolipoporphin				
15	Chitinase				
16	Gelsolin/villin				
17	Ca binding protein				
18	Chitinase				
19	Anti-microbial peptide				
20	Arginin kinase				
Celkem		2	1	5	2



Prachoví roztoči: alergeny



Class	Biochemická funkce	<i>Blomia tropicalis</i>	<i>Dermatophagoides farinae</i>	<i>Dermatophagoides siboney</i>	<i>Eroglyphus pteronyssinus</i>	<i>Eroglyphus maynei</i>	
1	Cystein protease	Blo t 1	Der f 1		Der p 1		
2	???		Der f 2		Der p 2	Eur m 2	
3	Trypsin	Blo t 3	Der f 3	Der s 3	Der p 3	Eur m 3	
4	Amylase	Blo t 4			Der p 4	Eur m 4	
5	???	Blo t 5			Der p 5		
6	Chymotrypsin	Blo t 6			Der p 6		
7	???		Der f 7		Der p 7		
8	Glutathionate-S-transferase				Der p 8		
9	Collagenolytic serine protease				Der p 9		
10	Tropomyosin	Blo t 10	Der f 10		Der p 10		
11	Paramyosin	Blo t 11	Der f 11		Der p 11		
12	???	Blo t 12					
13	Fatty acid binding pro.	Blo t 13					
14	Vitellogenin/Apolipoporphin		Der f 14		Der p 14	Eur m 14	
15	Chitinase		Der f 15				
16	Gelsolin/villin		Der f 16				
17	Ca binding protein		Der f 17				
18	Chitinase		Der f 18				
19	Anti-microbial peptide	Blo t 19					
20	Arginin kinase				Der p 20		
	Celkem		10	11	1	12	4

Různá spektra hlavních alergenů roztočů přítomných v jejich tělech a exkrementech

Prachoví roztoči

skupina 1
cysteinové proteázy

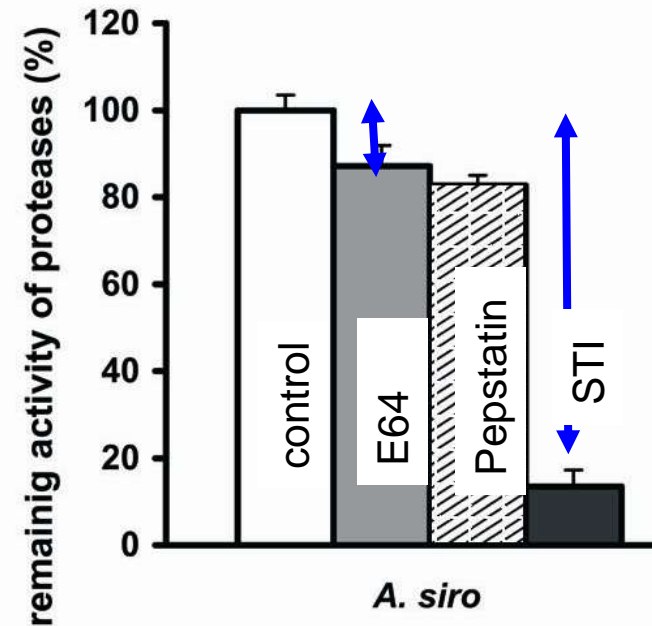
skupiny 3, 6 a 9
serinové proteázy

skupina 2
"lysozyme" like proteiny

Skladištní roztoči

cysteinové proteázy
přítomny v malé koncentraci

serinové proteázy (cf. 3 a 6)
hlavní trávicí proteázy

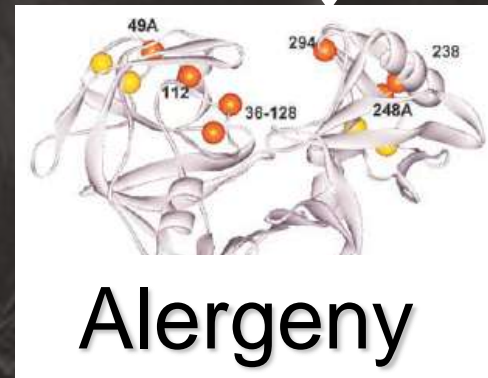
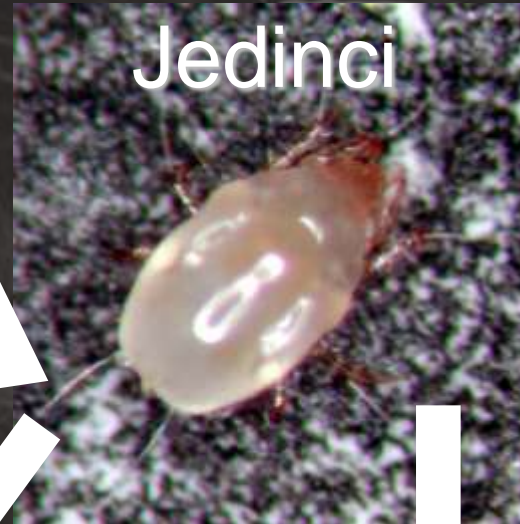
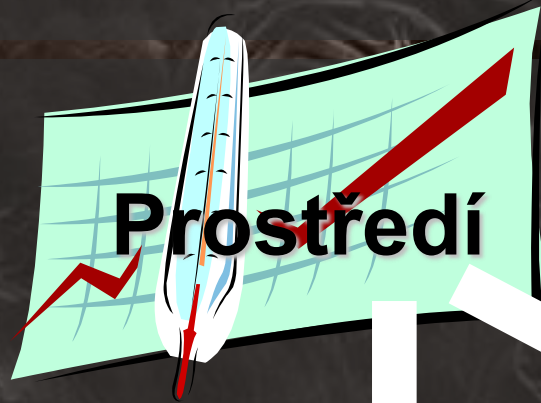


Roztoči – alergenů

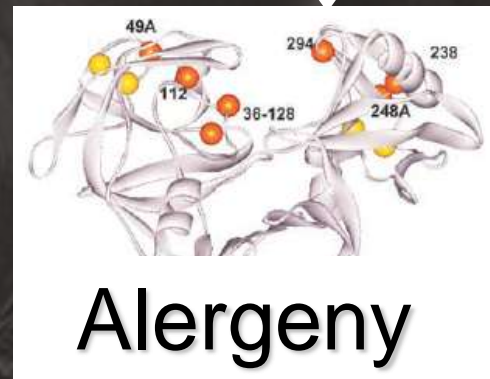
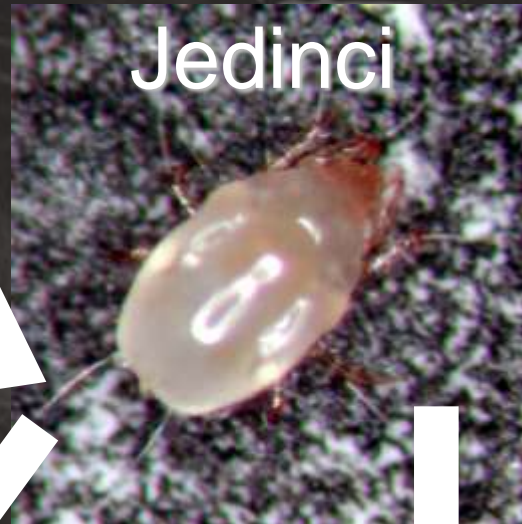
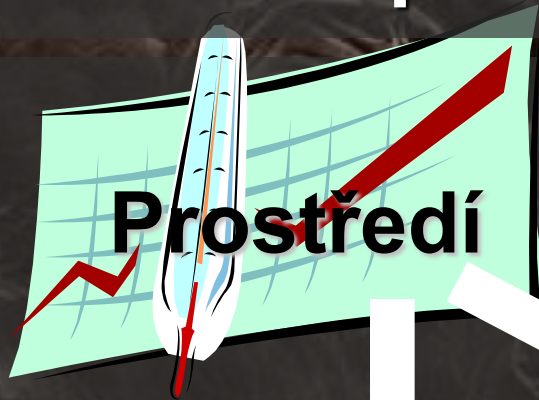
- Křížové reakce mezi skupinami roztočů: původci alergií nemusejí být vždy jen prachoví roztoči
- Různé spektrum alergenů u různých skupin roztočů
- Lze očekávat identifikaci nových alergenů u skladištních roztočů
- Různá stabilita alergenů
- Nutnost analyzovat více druhů roztočů jako potenciálních producentů alergenů
- Nutnost vytvoření detekčních metod pro identifikaci:
 - (a) senzitivity pacientů - IgE reaktivita
 - (b) alergenů v prostředí
 - (c) roztočů v prostředí člověka



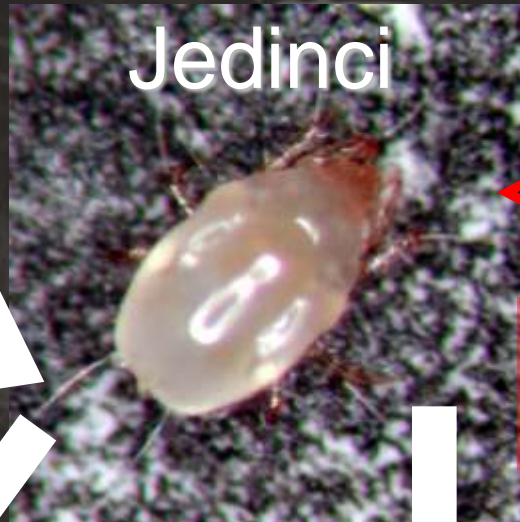
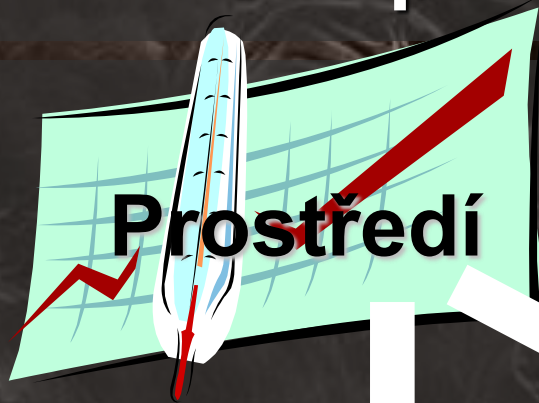
Riziko roztočů v prostředí – úrovně detekce



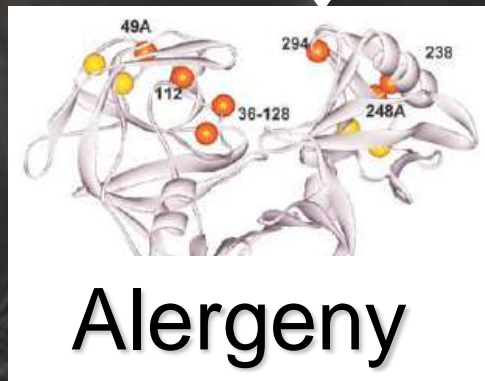
Cíle pro imunochemickou detekci



Cíle pro imunochemickou detekci



anti-rod, druh
(LepDes, AcaSir)



Příklady použití Abs pro detekci jedinců

ELISA detection of mite allergens

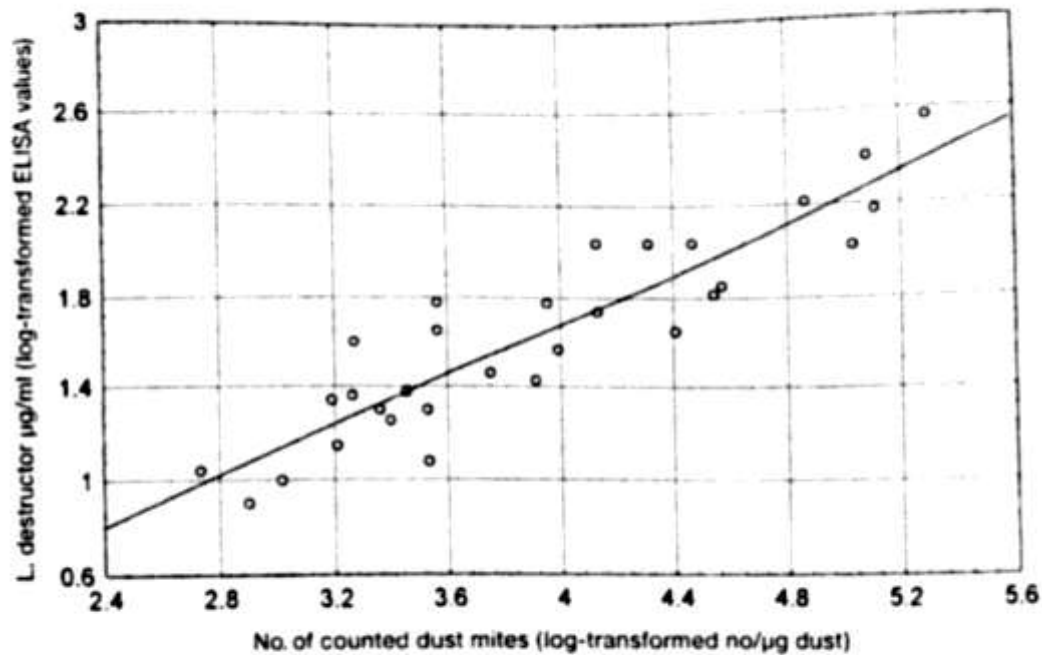


Fig. 1. Pair-wise comparison between number of *L. destructor* in each dust sample and ability of sample to inhibit ELISA. Linear regression was performed with log-transformed ELISA values vs. log-transformed number of counted *L. destructor* of each sample: $r^2 = 0.83$, $n = 30$.

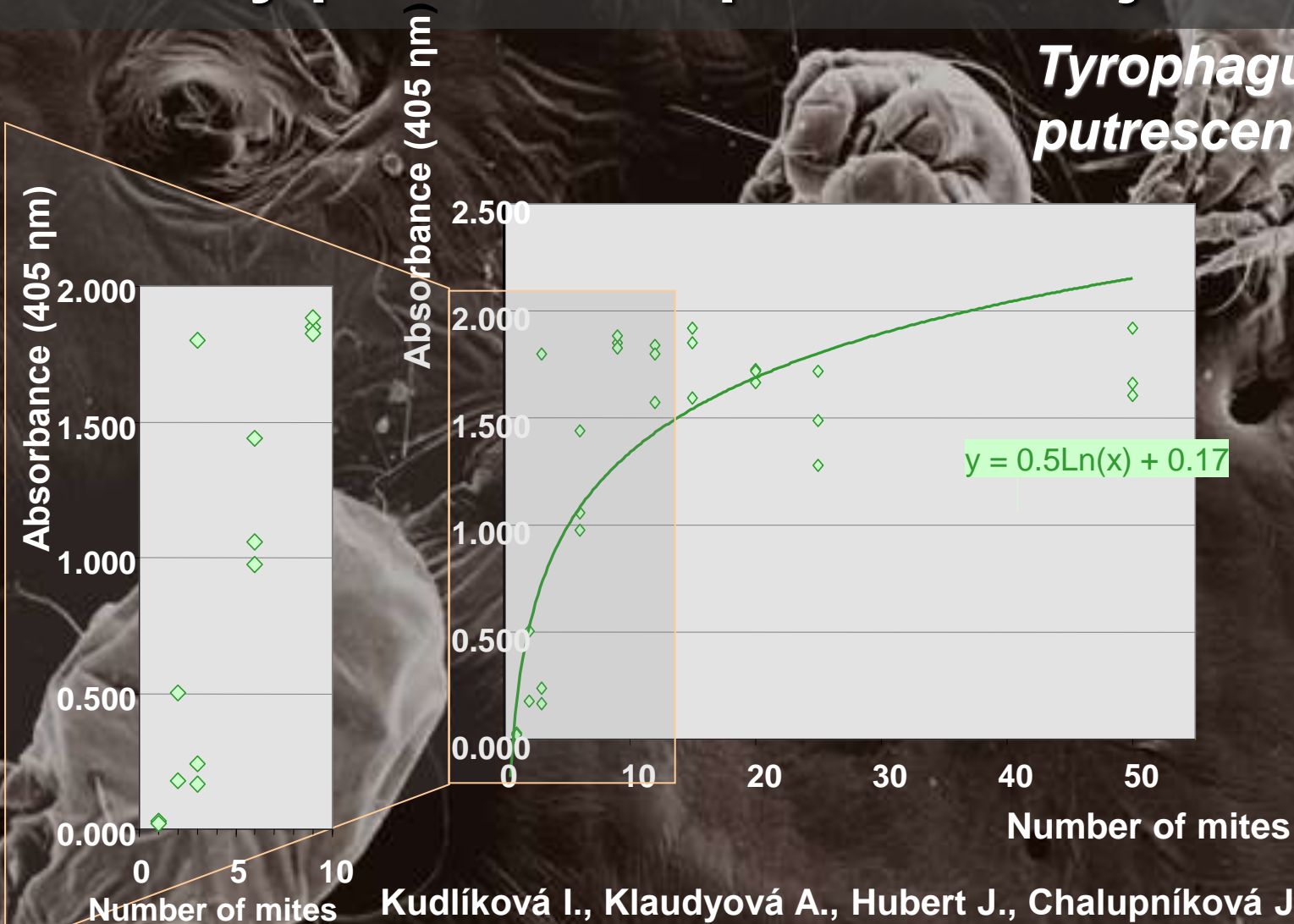
Lepidoglyphus destructor



- Podle B. Harafast, E. Johansson, S. G. O. Johansson, M. van Hage-Hamsten 1996 Allergy 51: 257-261.

Příklady použití Abs pro detekci jedinců

Tyrophagus putrescentiae

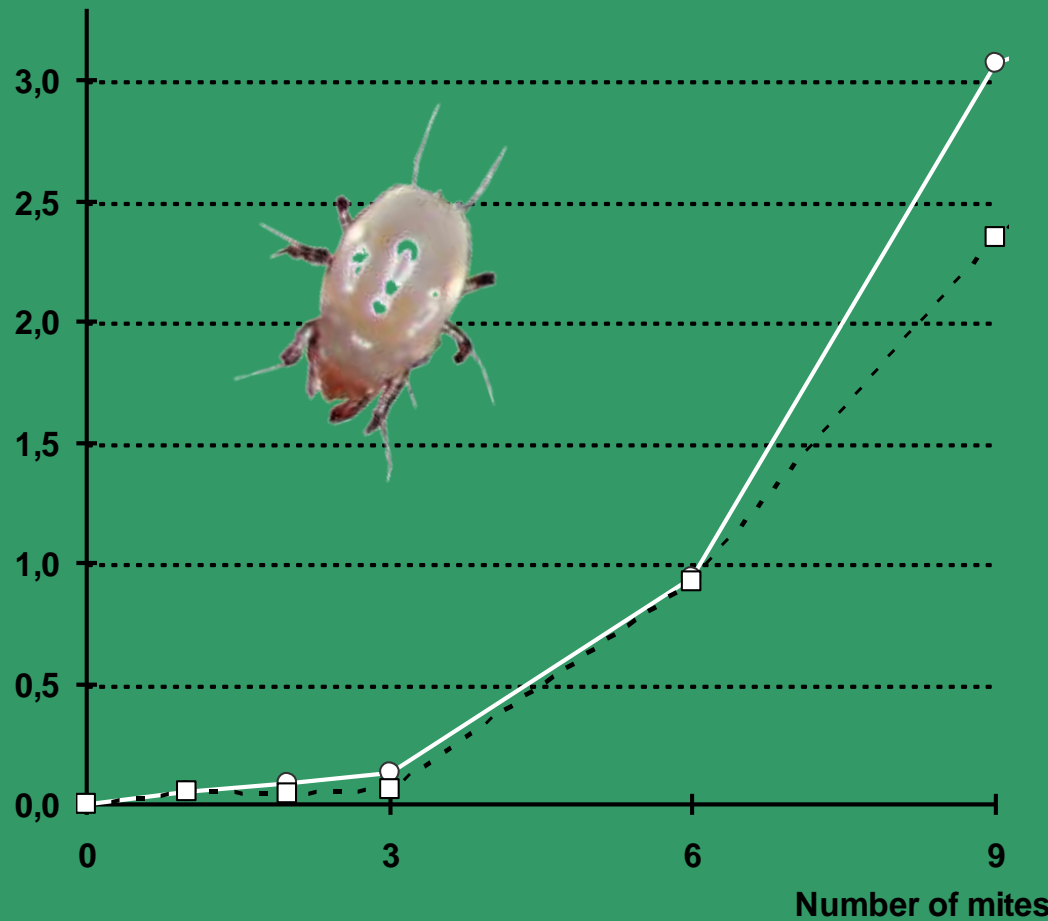


Kudlíková I., Klaudyová A., Hubert J., Chalupníková J., 2005, Characterization of polyclonal antibodies against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: acaridae), In: *Book of Abstracts of the "8th Central European Workshop on Soil Zoology"*, April 20-22, 2005, České Budějovice, Czech Republic, p. 42.

Příklady použití Abs pro detekci jedinců

Acarus siro

Absorbance (405 nm)

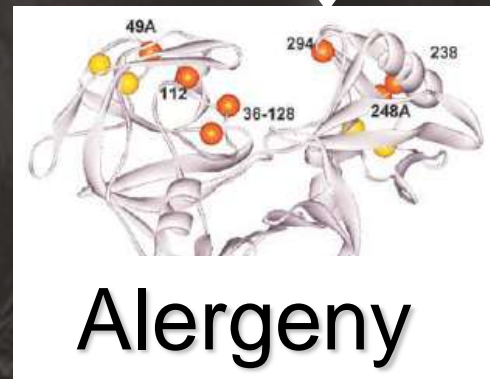
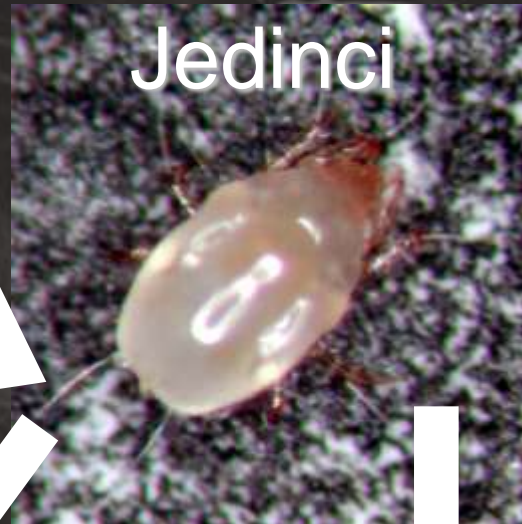
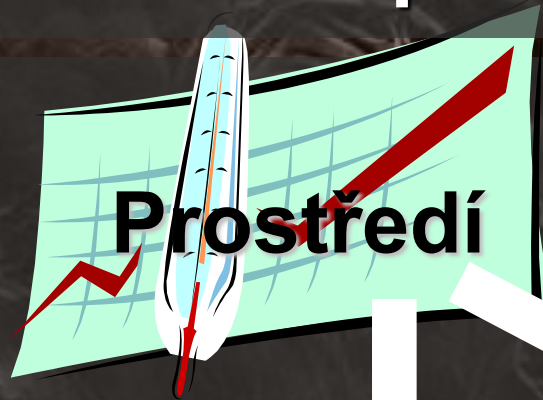


anti-A.siroK53

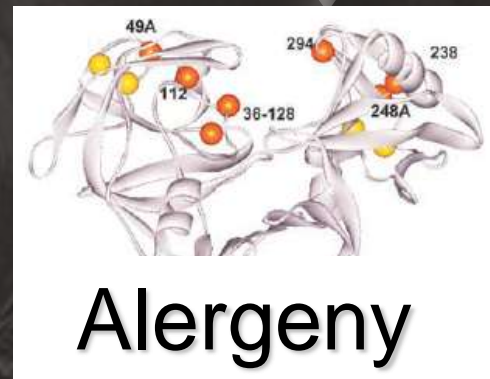
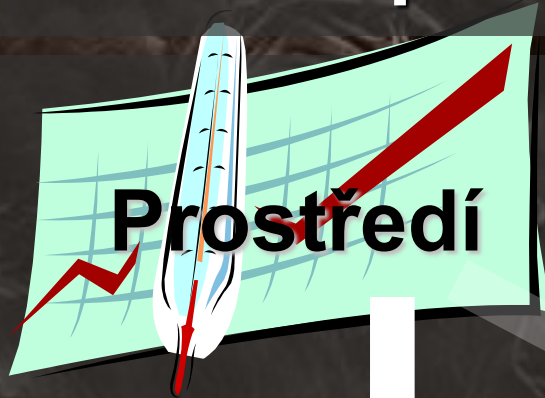
anti-A.siroK54

Kudlíková I., Stejskal V.,
Hýblová J., Chalupníková J.,
Hubert J., 2004, Polyclonal
antibodies for detection of
flour mite *Acarus siro*
(Acari: Acaridida),
Phytophaga 14: 711-720

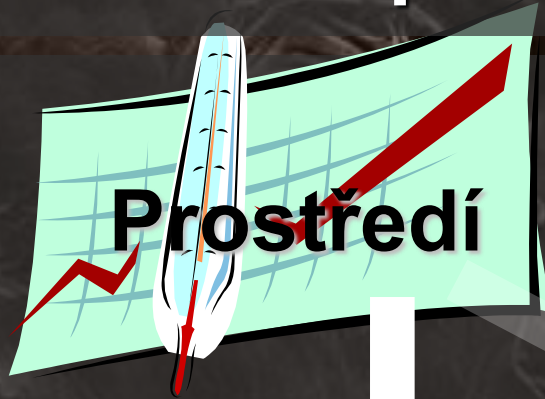
Cíle pro imunochemickou detekci



Cíle pro imunochemickou detekci



Cíle pro imunochemickou detekci



anti-markery (amyláza,
proteiny)



anti-alergeny
(Der p1, Tyr p2)

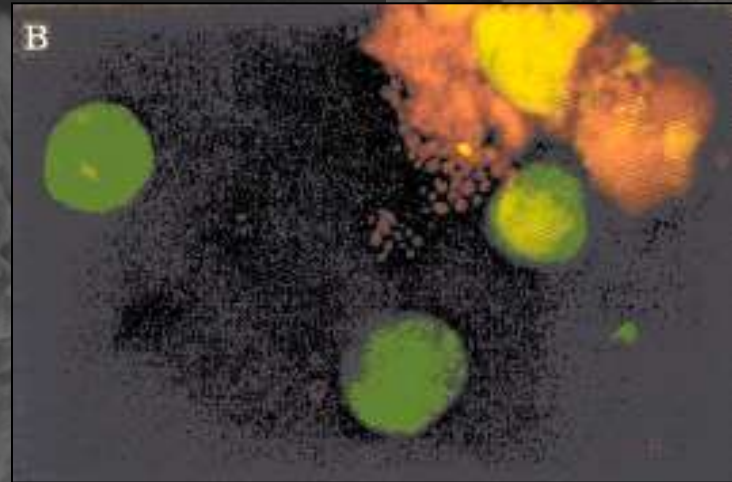
Alergeny

Výskyt alergenů v exkrementech

- **Skupina 1** - cysteinová peptidáza (Blo t 1, Der f 1, Der m 1, Der p 1)



- **Skupina 2** – lysozym-like proteiny (Der f 2, Der p 2, Eur m 2, Gly d 2, Lep d 2, Tyr p 2)

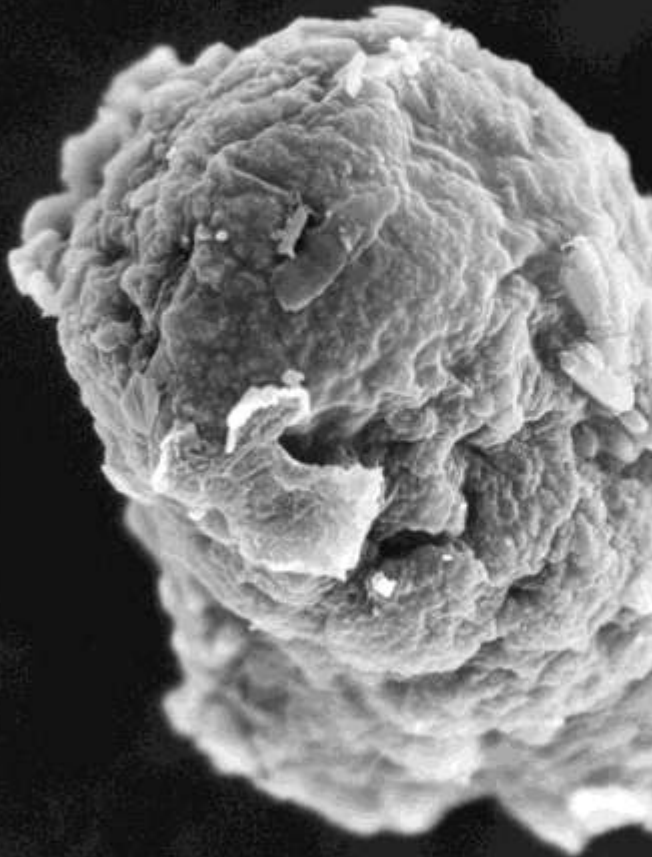


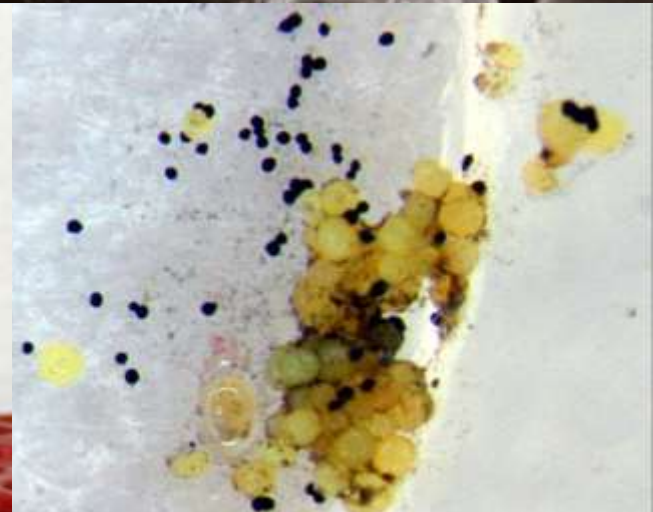
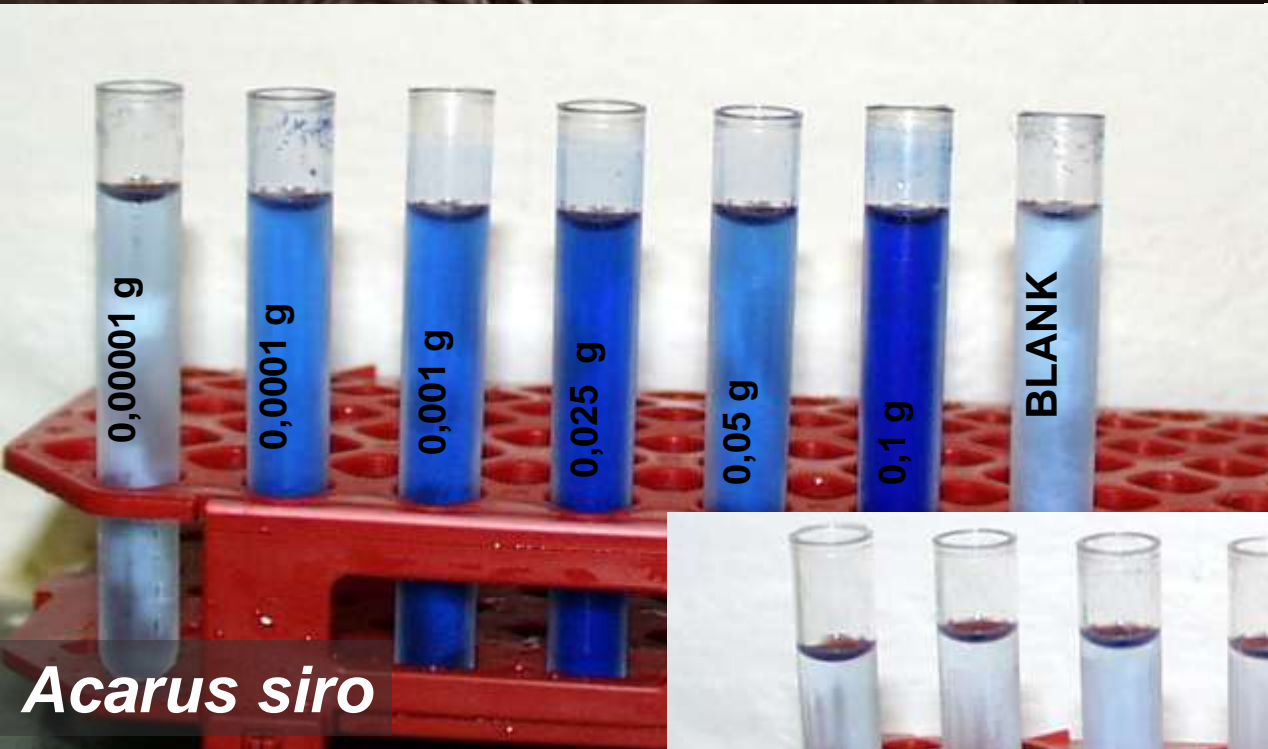
- **Skupina 3 a 6** – serinové peptidázy (trypsiny, chymo-trypsiny) (Blo t 3, Der f 3, Der p 3)

- **Skupina 4** – amylázy (Blo t 5, Der p 4)

Stabilita alergenů v exkrementech

- Der p 1 je vysoce stabilní v exkrementech; v podmínkách domácností – v matracích 10 let, 18 let ve skladech, 1 rok ve skleníku (Sidenius et al. 2002).
- spekulace Lep d 2 – 1-2 týdny?? (Danielsen 2004).
- Nejsou k dispozici údaje o stabilitě serinových proteáz v exkrementech (Thomas et al. 2002).
- Na základě dosud nepublikovaných výsledků je amyláza v exkrementech A. siro stabilní.





Acarus siro

Exkrementy obsahují značné množství amylázy (úbytek aktivity do 10% za 3 měsíce)



Tribolium castaneum

Kumulace exkrementů a množství alergenu v prostředí

Výskyt Der f 1 a Der p 1 v prachu domácností:

- Der f 1 19 - 52 μ g/g (Terra et al.)
 4 - 58 μ g/g (Radon et al.)
- Der p 1 12 - 26 μ g/g (Terra et al.)
 14 - 190 μ g/g (Radon et al.)
- riziko senzitivace > 2 μ g/g (Lau et al. 1989)
 0.4-2 μ g/g (Wahn et al. 1997)



Terra et al. (2004): Mite allergen levels and acarologic analysis in house dust samples in Uberaba, Brazil, J. Invest. Allergol. Clin. Immunol, 14(3):232-237.

Radon et al. (2000): Distribution of dust-mite allergens....Allergy, 55:219-225.

Příklady použití Abs pro detekci alergenů

INDOOR
biotechnologies^{INC}



Monoklonální abs:

Anti-Der f 1, Der p 1

Anti-Der p 1

Anti-Der f 1

Anti-group 2

Anti-Blo t 5

Lep d 2

• Parvaneh et al. (2002): An ELISA for recombinant Lepidoglyphus destructor, Lep d 2. Clin Exp Allergy 32(1):80-86.



Polyklonální abs:

Anti-Gly d 2

Anti-Lep d 2

Anti-Tyr p 2

Standardy alergenů:

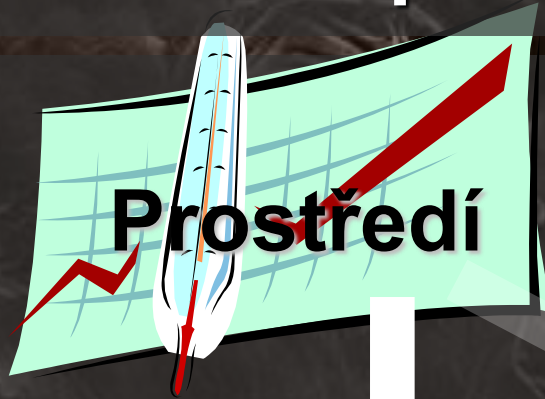
Der f 1

Der p 2

rBlo t 5

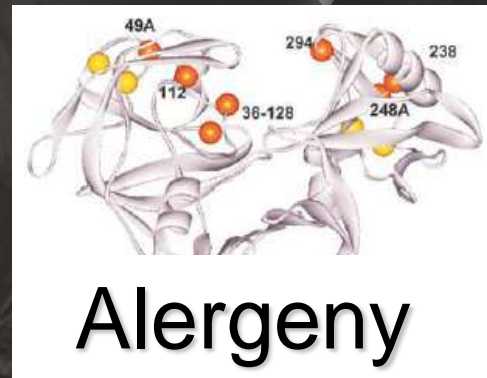
• Härfest et al. (1996): ELISA method for detection of mite allergens in barn dust: comparison with mite counts. Allergy 51:257-261.

Cíle pro imunochemickou detekci

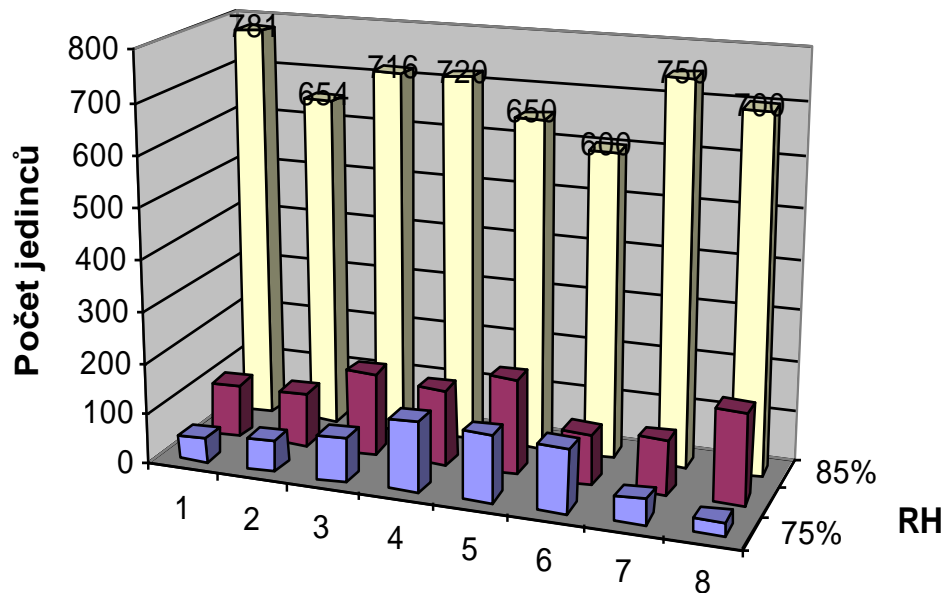


anti-markery (amyláza, proteiny)

A red box containing text indicating that antibodies against markers like amylase and proteins are used for detection.



Kumulace exkrementů a množství alergenu v prostředí



Populační dynamika *Acarus siro* (25°C, počáteční stav 10 jedinců, 21 dnů)

- 24 – 34 roztočů/g obilí

Biomasa 2,5 – 3,4mg

Lepidoglyphus destructor

- 254 roztočů/g obilí (56 dnů! 10% mouky!)

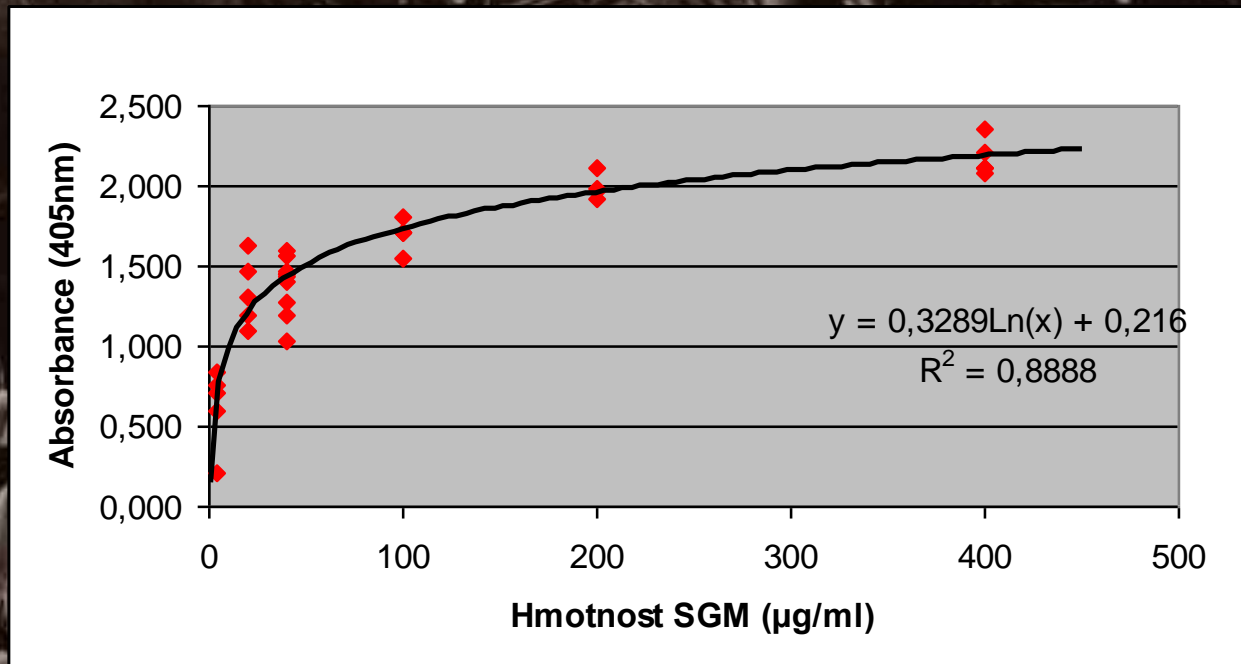
Danielsen et al. (2004): The influence of temperature and relative humidity on the development of *L. destructor* and its production of allergens. *Exp Appl Acarology*, 32:151-170.

Kumulace exkrementů a množství alergenu v prostředí

Acarus siro

Produkce exkrementů: 1/5 – 1x hmotnost roztoče/den

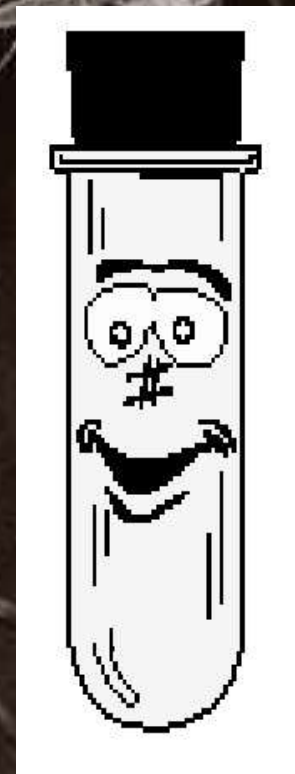
- 1000 roztočů → 600-800 µg exkrementů/den



**Detekční limit
PTA-ELISA
(anti-*A.siro*
exkrementy)
1µg SGM/ml**

Závěr

- Výskyt alergenů v prostředí je dán abundancí roztočů a kumulací jejich exkrementů.
- Alergeny z exkrementů vykazují rozdílnou stabilitu.
- Stanovení kontaminace prostředí – rizika senzitivace – komplexní diagnostika.
- Je nezbytné zaměřit výzkum na „ekologii“ alergenů skladištních roztočů – rozpoznání jejich nebezpečnosti.



Děkujeme za pozornost

