

Sérologie lymeské borreliózy a humánní granuloctární ehrlichiozy v letech 2005–2010

Balátová P., Kurzová Z., Hulínská D.

Národní referenční laboratoř pro lymeskou borreliózu, Praha

SOUHRN

Předmětem této práce bylo sérologické vyšetření vzorků krve a mozkomíšních moků na přítomnost antiborreliových a ehrlichiových protilátek. Testováno bylo 165 pacientů, u nichž se předpokládalo zvýšené riziko onemocnění lymeskou borreliózou. Jako diagnostické metody byly použity nepřímá imunofluorescence a enzymová imunoanalýza. Ehrlichiové protilátky byly prokázány u 36 vyšetřovaných (21,8 %). U 70 vzorků byly detekovány protilátky antiborreliové, což odpovídá 42,4 %. Narůstající počet nemocí vzniklých v návaznosti na kontakt s klíšťaty zdůrazňuje význam těchto zoonóz.

Klíčová slova: lymeská borrelióza – humánní granuloctární ehrlichioza – *Anaplasma phagocytophilum* – nepřímá imunofluorescence (IFA) – enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA).

SUMMARY

Balátová P., Kurzová Z., Hulínská D.: Serology of Lyme borreliosis and Human Granulocytic Ehrlichiosis in 2005–2010

The subject of this study is serological screening of blood and CSF (cerebrospinal fluid) samples for the presence of borrelial and ehrlichial antibodies. A total of 165 patients suspected to be at risk of Lyme disease were tested. Indirect immunofluorescence and enzyme immunoassay were used as diagnostic methods. Ehrlichial antibodies were detected in 36 (21.8%) patients. Borrelial antibodies were found in 70 samples (42.4%). The widening range of tick-borne diseases brings about the need for more data on these zoonoses.

Keywords: Lyme disease – human granulocytic ehrlichiosis – *Anaplasma phagocytophilum* – indirect immunofluorescence assay – enzyme-linked immunosorbent assay.

Úvod

Humánní granuloctární ehrlichioza (HGA) je horečnaté onemocnění způsobené obligátně intracelulární gramnegativní bakterií. Tato bakterie nejčastěji infikuje granuloctární leukocyty, kde se pak binárně dělí a vytvářejí charakteristické agregáty zvané moruly [3]. Tato agens podobná *Ehrlichia equi* byla v roce 2001 na základě analýzy 16sRNA genu reklasifikována jako *Anaplasma phagocytophilum* a zařazena do řádu *Rickettsiales* [9].

A. phagocytophilum je ve veterinární oblasti známým patogenem již od roku 1932. Případný rezervoár bakteriím mohou poskytnout malí hlodavci, jako jsou křeček příbytkový, veverka šedá nebo čipmank malý žijící na západě USA [4, 6].

Přenašečem HGA je v Evropě klíště *Ixodes ricinus*. Hlavními rezervoárovými zvířaty na evropském kontinentu jsou rejsek obecný, myšice lesní a zejména norník rudý. Toto onemocnění se nevy-

hýbá ani domácím zvířatům, jako jsou kočky, psi, ale i koně, ovce a kozy, a svoji roli mohou hrát i ptáci. Je možné, že HGA je v přírodě udržováno v cyklu klíště-přezývka-vec-hlodavec a člověk je zapojen pouze jako náhodný hostitel [2, 3].

V roce 1996 Huml et al. poprvé popsali výskyt HGA u dvojice psů v ČR a v roce 2004 byla identifikována *A. phagocytophilum* u koní a krav dr. Hulínskou et al. V následujících letech jsou zaznamenány případy Melterem a Spejchalovou. Údaje o nakažených zvířatech mohou poskytnout informace o případné lidské infekci v dané oblasti [10].

V roce 1990 umírá ve Wisconsinu pacient po přisátí klíštěte na závažné horečnaté onemocnění. Sérologické testy na prokázání přítomnosti *Ehrlichia chaffeensis* (původce HME) byly negativní [4]. V roce 1994 je poprvé diagnostikována HGA u pacienta z USA a popsána Bakkenem [1]. Onemocnění se dostává i na evropský kontinent a v roce 1997 je potvrzeno toto onemocnění ve Slovinsku. Od té doby jsou hlášeny případy z Nizo-

zemí, Španělska, Švédska, Norska, Chorvatska, Polska a dalších států [3, 7, 11, 13].

K příznakům HGA patří horečka, únava, nechutenství, letargie a související biochemické a hematologické abnormality, jako jsou anémie nebo trombocytopenie. Klinický průběh nemoci v Evropě je spíše asymptomatický [11] nebo jen s mírnými příznaky. V USA byla hlášena série úmrtí (0–5 %) [3], většinou spjata s oportunní infekcí [8, 14].

Materiál a metody

V letech 2005–2007 byl sledován soubor 150 pacientů. Vzorky byly vyšetřovány v rámci studie zaměřené na pacienty podezřelé z nákazy lymeskou borreliózou (LB). U poloviny z nich došlo k vytvoření erythema migrans. Vzorky z let 2008 a 2010 pocházejí od dobrovolných dárců, z tohoto důvodu je objem dat omezený na 15 vzorků. V tomto souboru 165 pacientů se vyskytovalo 105 žen (64 %) a 60 mužů (36 %), nejstaršímu bylo 88 let a nejmladšímu 1 měsíc. Průměrný věk pacienta byl 45 let, vzorky byly odebírány z různých oblastí ČR v různých obdobích roku. Vyšetřovaný materiál se skládal ze 151 krevních sér a 14 mozkomíšních moků.

Všechna séra byla vyšetřena na přítomnost antiborreliových protilátek metodou ELISA a nepřímou imunofluorescenční metodou pro průkaz IgM a IgG protilátek proti HGA agens.

• ELISA

Pro detekci antiborreliových protilátek byl použit sonifikovaný celobuněčný antigen kmene *Borrelia afzelii* KC90 nebo kmene *Borrelia garinii* M310. Jako značená protilátka pak králičí imunoglobulinová frakce proti IgM nebo prasečí proti IgG konjugovaná křenovou peroxidázou (TEST-LINE Clinical Diagnostics, Brno, ČR).

• IFA

K průkazu specifických ehrlichiových protilátek byla použita komerční souprava firmy FOCUS Diagnostics (Kalifornie, USA). Tento test používá infikované buňky HL-60, HGE-1 řetězce. Séra byla naředěna podle pokynů výrobce u protilátek IgM 1 : 20 a IgG 1 : 64.

Výsledky

Specifické ehrlichiové protilátky byly testovány u 165 vzorků. Z tohoto počtu byly HGA protilátky prokázány u 36 vyšetřených, což odpovídá 21,8 %. Ve 24 případech byly prokázány protilátky třídy IgM, 13krát protilátky třídy IgG, u jednoho pacienta byly detekovány protilátky obou tříd. Antiborreliové protilátky byly stanoveny obdobně u stejné skupiny pacientů. U 14 z nich byly prokázány protilátky třídy IgM, 65krát protilátky třídy IgG a u 9 vzorků byla stanovena přítomnost obou těchto tříd. Celkem tak bylo pozitivních 70 vzorků (42,4 %). Pro přehlednost jsou tyto údaje uspořádány do tabulky 1.

Tabulka 1. Výsledky vyšetření specifických ehrlichiových a antiborreliových protilátek

Table 1. Ehrlichial and borrelial antibody screening results

n=165	HGA protilátky		LB protilátky	
	počet	%	počet	%
IgM pozitivní	24	14,5	14	8,4
IgG pozitivní	13	7,8	65	39,4
Celkem pozitivní pacienti	36	21,8	70	42,4

Nejvyšší procento antiborreliových protilátek jsme zaznamenali v roce 2005, kdy 63 % vyšetřených vzorků bylo pozitivních (tab. 2). V témže roce bylo detegováno i nejvyšší procento antiehrlichiových protilátek, a to 33 %. Rok 2010 v tomto případě neuvádíme kvůli statisticky nevýznamnému počtu vzorků. Trend antiehrlichiových protilátek vykazuje mírné kolísání v prezentovaných letech.

Tabulka 2. Pozitivita sérologicky vyšetřovaných vzorků

Table 2. Seropositivity for human granulocytic ehrlichiosis (HGE) and lyme borreliosis (LB)

Rok	Počet vzorků	HGA protilátky		LB protilátky	
		počet	%	počet	%
2005	27	9	33	17	63
2006	66	8	12	32	48
2007	57	16	28	17	30
2008	10	1	10	2	20
2010	5	2	40	2	40
Celkem	165	36	21,8	70	42,4

Při porovnávání přítomnosti protilátek proti *A. phagocytophilum* v závislosti na pohlaví jsme došli ke zjištění, že ženy onemocní touto chorobou častěji než muži (tab. 3). Toto zjištění podporuje již publikovaná data Lásikovou et al. [11]. Porovnáním výskytu HGA protilátek v závislosti na věku jsme nedošli k žádným statisticky významným závěrům.

Tabulka 3. Porovnání infekčnosti u HGA a LB podle pohlaví

Table 3. Infectivity of human granulocytic ehrlichiosis (HGE) and lyme borreliosis (LB) by sex

Muži/ ženy	Počet	HGA protilátky		LB protilátky	
		počet	%	počet	%
Muži	60	7	12	24	40
Ženy	105	29	28	46	44
Celkem	165	36	21,8	70	42,4

Diskuse

Velký význam této zoonózy, zvláště v posledních letech, zdůrazňuje narůstající počet onemocnění ve světě, a to hlavně v Severní Americe [3, 4]. V naší studii jsme zaznamenali poměrně vysoké procento vzorků pozitivních na HGA protilátky (21,8 %). Tento výsledek je však srovnatelný s výsledky zjištěnými v ostatních evropských státech u rizikových skupin, jako jsou např. nemocní s LB, klíšťovou encefalitidou nebo lesní dělníci. V Německu byly provedeny dvě studie na rizikových skupinách obyvatel. V první byla zjištěna sérologická pozitivita na HGA protilátky u 11,4 % vyšetřených pacientů s LB. Ve druhém případě šlo o lesní dělníky a zde bylo pozitivních až 14 % testovaných 9. Obdobná studie proběhla i ve Švýcarsku s podobnými výsledky. U nemocných s LB bylo pozitivních 12,7 % vyšetřených a až 19,5 % pozitivních pacientů s klíšťovou encefalitidou 12.

V České republice byla provedena v roce 2000 studie na stejné rizikové skupině pacientů. Lásiková et al. prokázali přítomnost specifických HGA protilátek u 19,5 % vyšetřených [11]. V naší studii bylo vyšetřeno 165 pacientů, z nichž 42,4 % bylo pozitivních na antiborreliové protilátky. Tato skupina pozitivních pacientů na LB vykazovala 18,5% pozitivitu na ehrlichiové protilátky.

Závěr

Nemoci způsobené klíšťaty představují vzrůstající problém pro veřejné zdraví. Kromě lymeské borreliózy a klíšťové meningoencefalitidy by i humánní granulocytární ehrlichioza měla mít své významné místo v diagnostice nemocí vzniklých v návaznosti na kontakt s klíštětem.

Literatura

1. Bakken, J. S., Dumler, S. J., Chen, S. M., Eckman, M. R. et al. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States: a new species emerging? *JAMA*, 1994, 272, p. 212–218.
2. Bezděková, B., Jahl, P., Zeman, P. Equinní granulocytární ehrlichioza – málo známé onemocnění s rostoucím významem. *Veterinářství*, 2006, 56, p. 166–169.
3. Blanco, J. R., Oteo, J. A. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2002, 8, p. 763–772.
4. Dumler, J. S., Choi, K. S., Garcia-Garcia, J. C., Barat, N. S., Scorpio, D. G. et al. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg. Infect. Dis.*, 2005, 11, 12, p. 1828–1834.
5. Fingerle, V., Goodman, J. L., Johnson, R. C., Kurti, T. J. et al. Human granulocytic ehrlichiosis in Southern Germany: increased seroprevalence in high-risk groups. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, 35, 12, p. 3244–3247.
6. Foley, J. E., Nieto, N. C., Adjemian, J., Dabritz, H., Brown, R. N. *Anaplasma phagocytophilum* infection in small mammal hosts of Ixodes ticks, Western United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 2008, 14, 7, p. 1147–1150.
7. Fuente, J., Torina, A., Naranjo, V., Caracappa, S. et al. Infection with *Anaplasma phagocytophilum* in a seronegative patient in Sicily. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 2005, 4, 15, p. 1186–1189.
8. Knížek, P., Koblíha, J., Sedláček, F. Humánní granulocytární ehrlichioza v pardubickém regionu – kazuistika. *Voj. zdrav. Listy*, 2010, 1, p. 28–30.
9. Krbková, L., Štroblová, H. Lidská granulocytární ehrlichioza – současné diagnostické možnosti a klinická kritéria. *Klin. Mikrobiol. Inf. Lék.*, 2003, 9, 5, p. 307–310.
10. Kybicová, K., Schánilec, P., Hulínská, D., Uherková, L., Kurzová, Z. et al. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in dogs in the Czech Republic. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 2009, 9, 6, p. 655–661.
11. Lásiková, Š., Pícha, D., Moravcová, L. Sérové HGE (human granulocytic ehrlichiosis) protilátky u pacientů s lymeskou boreliózou v České republice. *Klin. Mikrobiol. Inf. Lék.*, 2000, 6, 4, p. 112–115.
12. Pusterla, N., Weber, R., Wolfensberger, C., Schär, G. et al. Serological evidence of human granulocytic ehrlichiosis in Switzerland. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1998, 17, p. 207–209.
13. Wormser, G. P., Horowitz, H. W., Dumler, J. S., Schwartz, I., Aguero-Rosenfeld, M. False-positive Lyme disease serology in human granulocytic ehrlichiosis. *Lancet*, 1996, 347, p. 981–982.
14. Wormser, G. P., Horowitz, H. W., Nowakowski, J., McKenna, D., Dumler, J.S et al. Positive Lyme disease serology in patients with clinical and laboratory evidence of human granulocytic ehrlichiosis. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1997, 107, 2, p. 142–147.

Do redakce došlo dne 31. 1. 2011.

Adresa pro korespondenci:

Ing. Pavla Balátová

Národní referenční laboratoř pro lymeskou borreliózu

Státní zdravotní ústav

Šrobárova 48

100 42 Praha 10

e-mail: Balatova.Pavla@szu.cz