

NEPŘÍMÁ DIAGNOSTIKA LYMESKÉ BORRELIÓZY A INFEKCE VIREM EPSTEINA-BARROVÉ

MUDr. Petr Hejnar

Ústav mikrobiologie, LF UP, Olomouc

Virus Epstein a Barrové (EBV) je kosmopolitně rozšířen. Infekce EBV vede k celoživotnímu nosičství (latentní infekci). Primární infekce je u části infikovaných spojena s rozvojem lymfoproliferativního onemocnění – infekční mononukleózy (IM). U disponovaných pacientů může dojít k přechodu primoinfekce do chronicity, případně k reaktivaci onemocnění. Aktivní EB-viróza je dávana do souvislosti s některými zhoubnými nádory. Rutinní diagnostika jednotlivých fází infekce EBV je založena na průkazu protilátek proti jednotlivým virovým antigenům (nejčastěji pomocí ELISA metody). U pacientů starších 5 let lze ke stanovení IM použít detekci virově nespecifických heterofilních protilátek (Paulova-Bunnellova reakce).

Lymeská borrelióza (LB) je především klíšťaty přenášené zánětlivé onemocnění. V ČR se jako etiologická agens uplatňují převážně druhy *Borrelia afzelii* a *B. garinii*. Základním prostředkem diagnostiky LB jsou nepřímé metody (ELISA a Western blot) prokazující borreliové protilátky v séru, mozkomíšním moku a synoviální tekutině. Humorální reakce na borreliovou infekci je individuálně značně variabilní. Detekuje se přítomnost IgG a IgM protilátek. Výsledky sérologických testů nelze hodnotit izolovaně. Stanovení diagnózy musí vycházet především z posouzení pacientovy anamnézy a klinického nálezu, v indikovaných případech je vhodné použít přímých metod průkazu původce.

Klíčová slova: Lymeská borrelióza, infekce virem Epstein-Barrové, nepřímá diagnostika.

INDIRECT DIAGNOSIS OF LYME DISEASE AND EPSTEIN BARR VIRUS INFECTIONS

Epstein-Barr virus can be found worldwide. EBV infections result in lifelong carrier state (latent infection). Manifestation of primary infection in some infected persons is characterized by development of lymphoproliferative disease - infectious mononucleosis (IM). In susceptible patients primary infection can shift towards chronic stage, or reactivation of disease. Active EBV infection is associated with some malignant tumors. Common diagnosis of particular stages following EBV exposure is based upon an identification of antibodies against particular viral antigens (the most often by ELISA method). The detection of viral nonspecific heterophile antibodies could be used in case of patient older than 5 years (Paul-Bunnell reaction).

Lyme borreliosis (LB) is a tick-borne infectious disease. In Czech Republic *Borrelia afzelii* and *B. garinii* are the main etiologic culprits of disease. The crucial diagnostic means of LB are indirect methods (ELISA and Western blot) with ability to prove specific antibodies in serum, cerebrospinal liquor and synovial fluid. Reaction to the infection by *Borrelia* can vary individually. Presence of IgG and IgM antibodies can be detected. Results of serologic tests can not be evaluated solitarily. Diagnosis must be determined by assessment of patient history and clinical findings, in some cases the direct methods for proving an agent are appropriate to use.

Key words: Lyme borreliosis, Epstein-Barr infection, indirect diagnosis.

Virus Epstein a Barrové (EBV) patří do čeledi Herpesviridae mezi tzv. gama-herpesviry. Jeho jediným přirozeným hostitelem je člověk, rozšíření je kosmopolitní. Podobně jako u jiných herpesvirů vede infekce EBV k celoživotnímu nosičství (latentní infekci organismu). Asi 90 % světové populace se s EBV setká v prvních 5 letech života, přičemž většinou se akvizice agens nijak klinicky neprojeví. Místem vstupu do organismu jsou epiteliální buňky horních cest dýchacích, kde se virus replikuje a infikuje cirkulující B lymfocyty. Latentní infekce vede k dlouhodobé perzistenci virového genomu v infikované buňce. Lytická neboli aktivní infekce (primární infekce, chronická EB-viróza, reaktivovaná EB-viróza) je charakterizována tvorbou infekčních virionů spojenou se zánikem hostitelské buňky. Tento typ infekce probíhá v diferencovaných epiteliálních buňkách slinných žláz, epitelu nasofaryngu, bronchů a cervixu. U části infikovaných se po prvním kontaktu s EBV rozvine lymfoproliferativní onemocnění – infekční mononukleóza (IM), která bývá doprovázena různě intenzivními klinickými symptomy. IM může být i non-EBV původu, za přibližně 20 % případů jsou zodpovědné jiné herpesviry. U nemocných s poruchami imunitního systému může mít primární infekce EBV fulminantní průběh, při-

padně se rozvine chronická aktivní EB-viróza spojená s trvajícím lymfoproliferací, která může vést až ke vzniku maligních lymfomů. U naprosté většiny pacientů s IM se však postupně aktivují imunitní mechanismy, které nakonec vedou k uvedení infekce do latentní fáze. Při přechodném oslabení imunity může dojít i u zdravých osob k reaktivaci infekce. Ta bývá obvykle asymptomatická a je spojena s dočasným vylučováním viru slinami. Osoby s těžším imuno-deficitem jsou však v tomto případě opět ohroženy rozvojem lymfoproliferativního onemocnění. Kromě maligních lymfomů je aktivní infekce EBV dávana do souvislosti i s jinými zhoubnými nádory – například nasofaryngeálním karcinomem (10–12).

Rutinní diagnostika infekcí EBV je založena na sérologických testech. Již desítky let je známa Paulova-Bunnellova reakce (PBR) prokazující virově nespecifické tzv. heterofilní protilátky (HP), které aglutinují nebo v přítomnosti komplementu lyzují erytrocyty jiných živočišných druhů. HP jsou poměrně spolehlivým znakem IM způsobené EBV (s výjimkou dětí do 5 let). V průběhu prvního týdne onemocnění se objevují u 70 % a do 3 týdnů u 90 % nemocných, ztrácejí se přibližně po měsíci trvání choroby. Jejich přítomnost však není vázána pouze na IM. Objevují se ta-

ké u pacientů s hematologickými malignitami, záněty jater, primární herpetickou tonsilitidou a u nemocných s Kawasakiho syndromem (6, 12, 14).

Virově specifické imunoglobuliny je možno detekovat například metodou nepřímé imunofluorescence (NIF) nebo enzymoimunoanalýzou (ELISA). NIF je stále považována za zlatý standard, ale v rutinní praxi se více užívají ELISA testy, jejichž výhodou je vysoká citlivost, snazší provedení a objektivita při hodnocení. Jako antigenů se používá syntetických peptidů odvozených na základě znalosti genetické mapy EBV. Pro sérodiagnostiku jsou nejdůležitější:

1. antigen virové kapsidy (VCA) – soubor virových strukturálních bílkovin
2. časný antigen (EA) s R a D složkou – komplex virových proteinů
3. nukleární antigen (EBNA) – komplex 6 proteinů (EBNA-1 – EBNA-6). Pro diagnostiku jsou důležité jen první dva.

Proti všem zmíněným antigenům je možno detekovat protilátkovou odpověď ve třídách IgA, IgG, IgE a IgM. Obvykle jsme však limitováni ekonomickými možnostmi a je tedy nutno zvolit optimální sestavu testů. Ta by měla umožnit co nejúplnější diagnostiku EBV infekcí co nejmenším počtem metod. V případě typické IM lze vystačit s průkazem HP. Při podezření na chronickou EB-virózu či reaktivaci infekce se doporučuje stanovovat IgG a IgM protilátky proti VCA zároveň s anti-EA IgG a anti-EBNA-1 IgG. Primární infekce (IM) je charakterizována rychlým nástupem anti-VCA IgM. Vzápětí následují HP, anti-VCA IgG a anti-EA(D) IgG. Podstatné je, že anti-EBNA-1 IgG se začínají objevovat až kolem 90. dne onemocnění (jejich dřívější nástup může signalizovat lehčí průběh IM). Přechod do chronicity je charakterizován vysokými titry anti-VCA IgG, anti-EA IgG a pozitivitou anti-VCA IgM. IgG protilátky proti EBNA-1 se obvykle vytvoří jen v nízkých titrech nebo vůbec. Různě vysoké titry anti-VCA IgG a anti-EBNA-1 IgG jsou typické pro latentní infekci. Pokud dojde k reaktivaci, objeví se anti-VCA IgM a anti-EA IgG. K určení fáze infekce EBV je také možno stanovit index avidity protilátek (zejména anti-VCA IgG). Metoda využívá skutečnosti, že v průběhu infekce se postupně tvoří protilátky pevněji vážící antigen. Je potřebné doplnit, že se zřejmě lze obejít i bez průkazu anti-EA IgG. Tyto protilátky mohou dokonce příležitostně přispět k nepřesnému určení fáze infekce. Mohou totiž chybět až u 20 % případů IM a naopak je lze prokázat u přibližně stejného procenta osob s latentní infekcí EBV (6, 11, 12, 14).

Tabulka 1. shrnuje interpretace výsledků sérologických testů (bez použití anti-EA IgG).

Lymeská borrelióza (LB) je klíšťaty přenášené zánětlivé onemocnění vyvolané spirochetami z rodu *Borrelia*. Méně často se v přenosu infekce uplatňuje krev sající hmyz. V České republice mají jako etiologická agens hlavní význam druhy *B. afzelii* a *B. garinii*. Průběh LB se dá přibližně rozdělit do 3 fází (stadií). Časná lokalizovaná infekce (stadium I) je u 30 - 80 % (v Evropě spíše do 50 %) nemocných charakterizována vznikem erythema migrans (EM)

nebo borreliového lymfocytomu v místě přisátí klíštěte. EM může být doprovázeno regionální lymfadenitidou celkovými příznaky připomínajícími chřipkové onemocnění. Diseminovaná infekce (stadium II) nastupuje v odstupu 3 týdnů až 5 měsíců. Může se projevit postižením lokomočního ústrojí (artritidy, burzitidy aj.), srdce (lymeská karditis), kůže a nervového systému. Pozdní infekce (stadium III) se objevuje přibližně za půl roku až několik let po nákaze. Postiženo bývá opět ústrojí pohybové, dále centrální nervový systém (neuroborrelióza s encefalopatickými, meningeálními a dalšími příznaky) a kůže (acrodermatitis chronica atrophicans). V České republice převažuje postižení kůže (1, 3, 4, 7, 8, 13).

Základním prostředkem diagnostiky LB jsou v současné době nepřímé metody prokazující specifické protilátky v séru, mozkomíšním moku, případně i v synoviální tekutině a jiných biologických materiálech. Využívá se především imunoenzymatických testů (převážně ELISA), Western blotu (WB), méně často i nepřímé imunofluorescence. ELISA test je nejpoužívanější pro svou poměrně vysokou senzitivitu a specifitu, snadné provedení a hodnocení. Na trhu je nabízeno široké spektrum komerčních ELISA testů, které využívají nejrůznějších borreliových antigenů. Tato skutečnost představuje částečný diagnostický problém, protože borreliie, která vyvolala prokazovanou infekci, může být mírně antigenně odlišná (značná pestrost sérovariant borrelií v Evropě). Pro vyloučení nespecificky pozitivních, ale i falešně negativních výsledků získaných ELISA testem, je ve sporných případech účelné provádět konfirmaci WB. Tato metoda slouží k průkazu úzce specifické protilátkové odpovědi, která umožňuje stanovení jednotlivých antigenů o různé molekulové váze (1-5, 7-9, 14).

Humorální reakce na borreliovou infekci je velmi komplexní a individuálně značně variabilní. V typickém případě se přibližně od 2. týdne po nákaze začínají vytvářet specifické imunoglobuliny M. Vrcholu jejich tvorby bývá dosaženo mezi 3.-8. týdnem od začátku infekce. Poté u většiny nemocných jejich hladiny postupně klesají. IgG protilátky se objevují v 6.-8. týdnu a následně je lze v séru zjišťovat po léta. Jejich prevalence tedy stoupá s věkem. Obvykle jsou chápány jako marker prodělaného onemocnění. Vysoké hladiny imunoglobulinů (hlavně IgG) se vyskytují prakticky u všech nemocných ve III. stadiu choroby. Poměrně často se však vyskytují odchylky od popsaného průběhu. Sérologické vyšetření může zůstat negativní až do 8. týdne po nákaze, případně i trvale (u 5-24 % nemocných). Někdy jsou zachyceny jako jediné imunoglobuliny G, někdy chybí vystřídaní tvorby IgM protilátkami třídy IgG. Imunoglobuliny M mohou u části pacientů dlouhodobě přetrvávat, a to i ve vysokých hladinách, občas se paradoxně objeví až po skončení terapie. Interpretace výsledků sérologických vyšetření je tedy často problematická. Chybění protilátek v séru je charakteristické pro časná stadia infekce (jsou přítomny u méně než 50 % pacientů ve stadiu I), bývá také následkem brzké léčby antibiotiky a nebo je jeho příčinou sekvestrace imunoglobulinů v imunokomplexech. Opakovaný odběr séra se nedoporučuje provést dříve než za 4-6 týdnů.

nů po prvním. Pátrá se po signifikantním vzestupu titrů protilátek, případně sérokonverzi. Falešná séropozitivita se vyskytuje u pacientů s chorobami vyvolanými jinými spirochetami, infekční mononukleózou, lupus erythematoses, antinukleárními protilátky, u gravidních žen apod. Poměrně častá je séropozitivita u lidí, kteří nikdy neměli klinické projevy LB (v ČR 2 % IgM- a 10 % IgG-pozitivních nálezů u zdravých lidí) (1–5, 7–9).

Obecně platí, že výška titrů protilátek neodpovídá závažnosti ani aktivitě onemocnění. Monitorování hladin IgG není spolehlivým kritériem pro odhad perzistence nebo reaktivity infekce a má rovněž malou výpovědní hodnotu při posuzování efektivity terapie. Jejich stabilně vysoký titr nemusí znamenat selhání léčby, naopak v případě úspěšné terapie někdy pozorujeme vzestup hladin IgG (i IgM) protilátek následkem zvýšené nabídky antigenu z rozpadlých borrelií – a teprve potom pokles. U časných infekcí lze korektní léčbou dosáhnout úplného vymizení specifických imunoglobulinů během 6–24 měsíců, u pozdních fází se to zdaří pouze ojediněle (1, 2).

Řada tzv. chronických borrelióz jsou zřejmě onemocnění autoimunní povahy. Jsou známy zkřížené reakce protilátek proti některým antigenům borrelií s buňkami myelinových pochev a neuroglií. Spirochety jsou také schopny perzistovat například v meningách a organismus opakovaně vystavovat expozici antigenů. Pro diagnostiku infekcí centrálního nervového systému je důležitý průkaz autochtonní tvorby protilátek (paralelní vyšetření séra a mozkomíšního moku). Séronegativita nevylučuje přítomnost specifických imunoglobulinů v likvoru. U pacientů s neuroborreliózou lze protilátky v mozkomíšním moku prokázat ve 20–40 % (1, 3–5).

Diagnostiku LB je v indikovaných případech vhodné doplnit přímými metodami průkazu původce.

Literatura

1. Bartůněk P a kol. Lymeská borrelióza. Grada Publishing, Praha 1996, 76 s.
2. Bartůněk P, Mrázek V, Vařejka P, Janovská D, Valešová M. Lymeská borrelióza: možnosti a meze interpretace sérologických nálezů. *Prakt Lék* 1998; 78: 611–614.
3. Bartůněk P, Mrázek V, Bina R, Lišvanová S, Valešová M, Janovská D. Diagnostika lymeské borreliózy. *Prakt Lék* 2000; 80: 207–209.
4. Bojar M. Lymeská borrelióza. Maxdorf Jessenius, Praha 1996, 224 s.
5. Černý Z, Blažiková I, Šnerelová M. Zkušenosti s diagnostikou a léčbou lymeské borreliózy u souboru 518 dospělých nemocných hospitalizovaných na infekční klinice FN Brno-Bohunice v letech 1993–1997. *Klin Mikrobiol Inf Lék* 1999; 5: 198–205.
6. Chalupa P, Šlesinger P, Krchňáková A, Prásek J. Protilátky třídy IgA proti kapsidovému antigenu viru Epstein-Barr. *Čas Lék Čes* 1992; 17: 526–529.
7. Mrázek V, Bartůněk P. Lymeská borrelióza. *Čas Lék Čes* 1999; 138: 329–332.
8. Pazdiora P, Benešová J, Brejcha O, Holeček J, Kubátová A, Machovská E, Morávková I, Ouřádová R, Spáčilová M, Turková D, Vodrážková Z, Štruncová V. Výskyt lymeské borreliózy v Jihozápadě českého kraje v letech 1993–1997. *Prakt Lék* 1999; 79: 209–213.

Tabulka 1. Interpretace výsledků sérologických vyšetření na průkaz EBV infekce

Sérologický nálezy				Interpretace
Anti-VCA IgG	Anti-VCA IgM	Anti-EBNA1 IgG	HP	
+	-	+	-	Latentní infekce
+	-	-	-	Latentní infekce ¹
+	-	-	+	Postakutní fáze primární infekce ²
+	+	-	+	Primární infekce
-	+	-	+/-	Velmi časná fáze primární infekce ³
+	+	+/-	-	Chronická infekce ⁴ , reaktivity ^{1, 5}
-	-	+	-	Latentní infekce ⁶
-	+	+/-	-	Chronická infekce ^{4, 6} , reaktivity ^{1, 5, 6}

¹ až 20 % osob v populaci netvoří anti-EBNA-1 IgG (genetická podmíněnost)

² v případě, že anti-VCA IgM vymizí dříve než HP

³ nutno prokázat sérokonverzi anti-VCA IgG (vyloučení „falešné“ IgM pozitivity)

⁴ diagnózu chronické infekce je možno stanovit pouze na základě znalosti anamnézy a klinického stavu pacienta

⁵ převážně bez klinických příznaků

⁶ u osob s nízkaviduitními anti-VCA IgG, které některé komerční ELISA soupravy nezachytí

Používají se: kultivace na speciálních médiích, histologické vyšetření, polymerázová řetězová reakce a DNA hybridizace. Právě u séronegativních nemocných lze občas prokázat živé borrelii v krvi nebo mozkomíšním moku (1–5, 7, 9, 13).

Je třeba upozornit, že problematika diagnostiky LB je komplexní a sérologické vyšetřovací metody v ní zdaleka nehrají hlavní roli. Stanovení diagnózy musí vycházet především z posouzení pacientovy anamnézy a klinického nálezu. S ohledem na tyto skutečnosti byla vypracována řada diagnostických schémat, která vymezují pravděpodobnost onemocnění a značně usnadňují rozhodování ošetřujícího lékaře. Například v Burrascanově schématu přísluší séropozitivitě v ELISA testu 3 body, přísátí klišé 2 body, EM ověřenému lékařem 7 bodů apod. Pro stanovení diagnózy s vysokou pravděpodobností je nutno dosáhnout více než 7 bodů (1–4, 13).

Finanční podpora:

Výzkumný záměr MŠMT č. MSM 151100002

9. Picha D, Skalská S, Hulínková D, Moravcová L, Hančil J, Roháčková H, Kořínková M, Havlíčková I, Hobstová J, Pataková E, Příhodová J. Diagnostika lymeské borreliózy se zaměřením na polymerázovou řetězovou reakci (PCR) z pohledu klinického lékaře. *Klin Mikrobiol Inf Lék* 1998; 4: 186–189.
10. Roubalová K. Biologie viru Epstein-Barr (EBV). *Klin Mikrobiol Inf Lék* 1998; 4: 5–9.
11. Roubalová K, Seeman J. Sérologický přehled protilátek proti herpetickým virům CMV, EBV, VZV. *Zprávy ČEM (SZÚ, Praha)* 1998; 7 (příl. 1): 29–31.
12. Suchánková A. Sérologická diagnostika infekcí způsobených virem Epstein-Barr. *Remedia Klin Mikrobiol* 1997; 1: 48–51.
13. Štruncová V, Sedláček D, Šubrt I, Pazdiora P, Kvasničková M, Bárta R, Matoušková D, Šestáková B, Pecan L. Možnosti využití skórovacího systému v diagnostice lymeské borreliózy. *Prakt Lék* 1999; 79: 686–690.
14. Votava M. K interpretaci sérologických nálezů. *Prakt Lék* 2000; 80: 183–187.