

ODLIŠNOSTI V SÉROLOGICKÉ DIAGNOSTICE INFEKČÍ ZPŮSOBENÝCH CHLAMYDIEMI A VIREM EPSTEINA-BARROVÉ U DĚTÍ

MUDr. Petr Hejnar

Ústav mikrobiologie, LF UP, Olomouc

Etiologickým agens chlamydiových infekcí (převážně respiračního traktu) v dětském věku je v naprosté většině *Chlamydia pneumoniae*. Sérologické vyšetřovací metody jsou v tomto případě nejvhodnějším diagnostickým prostředkem. K průkazu chlamydiových protilátek se nejčastěji používá nepřímé mikroimunofluorescence a imunoenzymatických metod. Aktivita infekce se stanovuje na základě séropozitivity ve třídách IgA a IgM. Diagnosticky důležité jsou také signifikantní změny titrů IgA, IgG a IgM protilátek. Zvláště v případě imunoglobulinů M lze očekávat velmi časnou reakci na počínající infekci *C. pneumoniae*.

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

Klíčová slova: chlamydie, virus Epstein-Barrové, sérologická diagnostika.

Diagnostika chlamydiových infekcí je v dětském věku zaměřena především na průkaz účasti druhu *Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae* v etiologii daného onemocnění. Tento mikroorganismus patří mezi poměrně významné původce respiračních infekcí, například faryngitid, sinusitid, bronchitid a pneumonií. Další species, *C. trachomatis*, je důležitým etiologickým agens konjunktivitid, faryngitid, otitid a pneumonií u novorozenců porozených matkami s genitální infekcí. Později (pokud pomineme kriminální případy a možnost akvizice mikroba v rodinách s nízkou úrovní hygieny) je význam *C. trachomatis* zanedbatelný a opět stoupá až v období dospívání. V případech, kdy dítě přichází do úzkého a častého kontaktu s ptáky (ale i savci, například kočkami), je nutno pomyslet na třetí druh chlamydie patogenní pro člověka, *C. psittaci*. Nejčastějším projevem infekce touto zoonotropatogenní bakterií je pneumonie s prolongovaným průběhem, frekvence jejího výskytu je však nízká (1, 3, 12, 14, 15).

K sérologické diagnostice chlamydiových infekcí se používají především 3 druhy testů: komplement-fixační reakce (KFR), nepřímý mikroimunofluorescenční test (MIFT) a imunoenzymatické metody (zejména ELISA). Antigen používaný v KFR má pouze rodovou specifitu a neumožňuje tedy odlišit jednotlivé druhy chlamydií. KFR se v současné době považuje za obsolentní, protože její citlivost je velmi nízká. MIFT byl donedávna jediným testem, který umožňoval detekci species-specifických protilátek. Jako antigen v tomto případě slouží čištěná elementární tělíska jednotlivých druhů chlamydií. MIFT je akceptován jako zlatý standard v sérologické diagnostice chlamydiových infekcí, jeho hodnocení však vyžaduje značné zkušenosti, je časově náročné a může být subjektivní. Poměrně často také dochází ke zkříženým reakcím mezi jednotlivými species. V ČR se nyní nejvíce používá ELISA metody. Ta většinou neumožňuje určení druhu chlamydie (podobně jako v KFR se používá genus-specifického lipopolysacharidového antigenu), i když se už na trhu objevují první species-

specifické ELISA soupravy. Ve srovnání s MIFT je jejich senzibilita stejná nebo i vyšší, zvláště v případě časných stadií akutních infekcí (4, 9, 11, 12, 14, 15).

U dětí, u kterých lze očekávat především respirační infekce způsobené *C. pneumoniae*, lze s výhodou použít rodově specifických ELISA testů. V případě onemocnění způsobených *C. pneumoniae* se sérologie obecně považuje za nejvhodnější prostředek průkazu infekce. Lze ji použít k rutinní diagnostice (ne pouze k retrospektivnímu potvrzení) a podle výsledků eventuálně nasadit antibiotickou terapii (5, 6, 11, 12, 14).

Aktivita chlamydiové infekce se většinou stanovuje na základě séropozitivity ve třídách IgA a IgM. Imunoglobuliny A jsou spíše než pro akutní stadia primárních infekcí typické pro chronické infekce a reinfekce. IgM se vyskytují hlavně v akutní fázi primoinfekce a poté mizí. Občas však také mohou dlouhodobě přetrvávat u chronických perzistujících infekcí nebo zareagovat na reinfekci. V dětském věku mají imunoglobuliny M zásadní význam, poněvadž do 14 let věku se většina dětí poprvé setká s chlamydiovou infekcí, a navíc tyto protilátky rychlostí svého nástupu nejspíše umožňují včasnou diagnostiku respirační infekce. Samotné IgG protilátky v nízkých až středních titrech jsou považovány za anamnestické. Jejich trvale vysoké hladiny však mohou signalizovat i chronickou aktivní infekci (u osob s defekty v tvorbě IgA) (1, 4, 6, 12, 14, 15).

Tabulka 1 uvádí přístupy k interpretaci jednotlivých sérologických nálezů.

Nesmírně důležitým faktorem, který zásadně ovlivňuje eventuální použití sérologických nálezů v diagnostice a terapii, je rychlost, s jakou se podaří prokázat signifikantní změny v titrech protilátek. Otziepka et al. (5) prokázali v případě chlamydiové lymfadenitidy sérokonverzi v IgA, IgG a IgM třídách protilátek už 2 dny po začátku symptomů. Ouchi et al. (6) často nalézali u dětí s akutními respiračními infekcemi sérologickou odezvu (akutní protilátky) už při jejich hospitalizaci. Obecně lze konstatovat, že titr

IgM vrcholí v 1.-2. týdnu primární infekce a potom pomalu klesá. Opožděně reagují IgA a IgG. Reinfekce *C. pneumoniae* je charakterizována rychlou reakcí IgA a vzestupem anamnestických IgG, IgM protilátky většinou chybějí (4, 9).

Podobně jako v případě sérologické diagnostiky jiných infekcí platí, že etiologii akutně probíhajícího onemocnění (primoinfekce, reinfekce) potvrzuje průkaz signifikantního vzestupu titrů protilátek. Verkooyen et al. (12) v této souvislosti doporučují následující kritéria:

- nejméně trojnásobný vzestup titru IgG a / nebo IgA
- a / nebo titr IgM ≥ 16 (MIFT), případně dvojnásobný vzestup titru IgM (ELISA)
- nebo dvojnásobný vzestup titru IgG v kombinaci s dvojnásobným vzestupem IgA

Co se týká průkazu chlamydiového antigenu, u dětí přichází v úvahu prakticky pouze v novorozeneckém věku při pátrání po infekci *C. trachomatis* získané v průběhu po-

rodu. Lze provést stěr ze spojivek speciálním tamponem, antigen se prokazuje například přímým imunofluorescenčním testem nebo ELISA metodou (3, 15).

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 (nejčastěji již brzy po narození slinami séropozitivní matky), přičemž většinou se akvizice agens nijak klinicky neprojeví. Co se týká české populace, u dětí do 5 let byla zjištěna séropozitivita v 80 %, u mladistvých do 20 let v 95 %. 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 infekce EBV, reaktivovaná infekce EBV) je charakterizována tvorbou infekčních virionů spojenou se zánikem hostitelské buňky. 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 primární infekce EBV fulminantní průběh, případně se rozvine chronická aktivní infekce EBV spojená s trvalou 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 imunodeficitem jsou však v tomto případě opět ohroženy rozvojem lymfoproliferativního onemocnění (7, 8, 10).

Rutiní diagnostika infekcí EBV je založena na sérologických testech. Již desítky let je známa Paulova-Bunellova reakce (PBR) prokazující virově nespecifické tzv. heterofilní protilátky (HP), které aglutinují nebo v přítomnosti komplementu lyzují erythrocyty jiných živočišných druhů. HP

Tabulka 1. Hodnocení sérologicky pozitivních nálezů u chlamydiových infekcí

Sérologický nálezh	Interpretace	Alternativní interpretace (méně pravděpodobná)
IgG (nízké - střední titry) ¹	anamnestické protilátky ²	—
IgG (vysoké titry) ¹	chronická perzistující infekce ²	anamnestické protilátky
IgA, IgG ¹	reinfekce chronická perzistující infekce	primární infekce
IgA ³	reinfekce chronická perzistující infekce	primární infekce
IgA, IgG, IgM	primární infekce	reinfekce chronická perzistující infekce
IgG, IgM	primární infekce	reinfekce chronická perzistující infekce
IgM ³	časné stadium primoinfekce	reinfekce chronická perzistující infekce
IgA, IgM ³	časné stadium primoinfekce	reinfekce chronická perzistující infekce

1. tyto nálezy jsou nejčastější, připadá na ně více než 75 % všech séropozitivit (1)
2. u dětí do 1 roku se zřejmě jedná o protilátky mateřského původu
3. v případě těchto výsledků je vhodné pokusit se o průkaz sérokonverze ve třídě IgG (vyloučení nespecifických IgA / IgM pozitivit)

Tabulka 2. Interpretace výsledků sérologických vyšetření na průkaz EBV infekce

Sérologický nálezh				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 , reaktivace ^{1, 5}
—	—	+	—	latentní infekce ⁶
—	+	+/-	—	chronická infekce ^{4, 6} , reaktivace ^{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 nízkavidinými anti-VCA IgG, které některé komerční ELISA soupravy nezachytí

jsou poměrně spolehlivým znakem IM způsobené EBV. V průběhu prvního týdne onemocnění se objevují u 70 % a do 3 týdnů u 90 % nemocných, ztrácejí se přibližně po měsíci trvání choroby. Podstatná je skutečnost, že u dětí mladších 5 let jsou velmi nespolehlivé – chybějí asi u 50 % případů IM. U těchto dětí je nutno prokazovat virově specifické protilátky (2, 10, 13).

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 nejuplněnější diagnostiku EBV infekcí co nejmen-

ším počtem metod. V případě typické IM u starších dětí a dospívajících lze vystačit s PBR. U dětí do 5 let věku a dále 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 vázající 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 (2, 8, 10, 13).

Tabulka 2 shrnuje interpretace výsledků sérologických testů (bez použití anti-EA IgG).

Finanční podpora:

Výzkumný záměr MŠMT č. MSM 151100002

Literatura

1. Hejnar P, Krátká J. Výskyt chlamydiových protilátek u pacientů Fakultní nemocnice v Olomouci a význam detekce IgM pro diagnostiku aktivních infekcí. *Klin Mikrobiol Inf Lék* 1999; 5: 163–165.
2. Chalupa P, Šlesinger P, Krchňáková A, Prášek J. Protilátky třídy IgA proti kapsidovému antigenu viru Epstein-Barrové. *Čas Lék Čes* 1992; 17: 526–529.
3. Korych B. Chlamydie a jimi vyvolané infekce. *Remedia Klin Mikrobiol* 1998; 2: 72–74.
4. Mazzoli S, Tofani N, Fantini A, Semplici F, Bandini F, Salvi A, Vergassola R. Chlamydia pneumoniae antibody response in patients with acute myocardial infarction and their follow-up. *Am Heart J* 1998; 135: 15–20.
5. Oztipka E, Fenner T, Leinonen M, Saikku P. Chlamydia pneumoniae and lymphadenitis: possibility of early diagnosis – follow up by defined Chlamydia rLPS-serology: a case report. In: Proceedings 3rd Meeting of the European Society for Chlamydia Research, p. 231. Austrian Society for Dermatology and Venerology, Vienna 1996.
6. Ouchi K, Nomura K, Nonaka Y, Tsumura N, Hagiwara K. Evaluation of the ELISA kit using the recombinant Chlamydia genus-specific LPS to diagnose C. pneumoniae infections in pediatric patients with acute respiratory tract infections. In: Proceedings 3rd Meeting of the European Society for Chlamydia Research, p. 373. Austrian Society for Dermatology and Venerology, Vienna 1996.
7. Roubalová K. Biologie viru Epstein a Barrové (EBV). *Klin Mikrobiol Inf Lék* 1998;4: 5–9.
8. Roubalová K, Seeman J. Sérologický přehled protilátek proti herpetickým virům CMV, EBV, VZV. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 1998; 7 (příl. 1): 29–31.
9. Sodja I. Sérologie chlamydií. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 1996; 5 (2): 17–18.
10. Suchánková A. Sérologická diagnostika infekcí způsobených virem Epstein a Barrové. *Remedia Klin Mikrobiol* 1997; 1: 48–51.
11. Tjhie HT, Roosendaal R, Simoons-Smit AM, MacLaren DM, Vandenbroucke-Grauls CMJE. Comparison of three different serological tests for the diagnosis of Chlamydia pneumoniae respiratory tract infections in patients in the age of 0,5–20 years. In: Proceedings 3rd Meeting of the European Society for Chlamydia Research, p. 237. Austrian Society for Dermatology and Venerology, Vienna 1996.
12. Verkooyen RP, Van Lent NA, Mousavi Joulandan SA, Snijder RJ, Van den Bosch JM, Van Helden HP, Verbrugh HA. Diagnosis of Chlamydia pneumoniae infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease by micro-immunofluorescence and ELISA. *J Med Microbiol* 1997; 46: 959–964.
13. Votava M. K interpretaci sérologických nálezů. *Prakt Lék* 2000; 80: 183–187.
14. Žampachová E. Chlamydia pneumoniae jako původce respiračních infekcí. *Klin Mikrobiol Inf Lék* 1998; 4: 54–56.
15. Žampachová E. Diagnostika infekcí způsobených Chlamydia trachomatis. Souhrn více než desetiletých zkušeností. *Remedia Klin Mikrobiol* 1998; 2: 75–78.