BORELIOZA LA CÂINI IN TRANSILVANIA SEROPREVALENŢĂ ŞI ASPECTE DE DIAGNOSTIC

KISS Timea[1)], Florina Alexandra KRUPACI[1)],
Armela Diana BORDEANU[1)],
Mihaela NICULAE[1)], Marina SPÂNU[1)]

REZUMAT

Evaluarea seroprevalenţei anticorpilor anti-*Borrelia burgdorferi* sensu lato în populaţiile canine dintr-o anumită regiune oferă date valoroase pentru estimarea riscului pentru om. Scopul acestei lucrări a fost stabilirea seroprevalenţei infecţiei cu *B. burgdorferi* s.l. la câini din mai multe judeţe din Transilvania, identificarea factorilor care o influenţează şi evaluarea specificităţii şi sensibilităţii testului rapid SNAP® 4DX, comparativ cu metoda clasică de diagnostic în doi paşi, folosită şi în medicina umană. Au fost testaţi 285 de câini provenind din 7 judeţe din Transilvania, pentru prezenţa anticorpilor anti-*Borrelia,* prin testul imunoenzimatic. S-a folosit un kit ELISA comercial, rezultatele pozitive şi cele dubioase fiind retestate prin tehnica Western Blot, pe modelul diagnosticului în doi paşi folosit în medicina umană. Seroprevalenţa medie obţinută a fost de 4,21%, cu valori maxime obţinute în judeţele Bihor şi Hunedoara. Utilizarea câinilor testaţi a influenţat semnificativ valorile seroprevalenţei la câinii de lucru, comparativ cu cei de companie. Testarea unui număr de 14 seruri folosind testul rapid SNAP 4Dx® a permis stabilirea unei specificităţi de 100% şi a unei sensibilităţi de 62% a kitului utilizat.

Cuvinte cheie: *Borrelia burgdorferi* sensu lato, câini,Transilvania, seroprevalenţă, test rapid,

LYME DISEASE IN DOGS IN TRANSYLVANIA SEROPREVALENCE AND DIAGNOSE ASPECTS

ABSTRACT

Evaluation of canine anti-*Borrelia burgdorferi* sensu lato seroprevalence in a certain area provides essential data for human risk evaluation. In this study, 285 dogs from 7 counties of Transylvania were tested using a commercial ELISA kit, with positive and doubtful results retested using the Western Blot technique, in accordance with the 2-step diaggnostic approach from human medicine.

1)Facultatea de Medicină Veterinară Cluj-Napoca, E-mail: timcyke@yahoo.com

A mean seroprevalence of 4,21% was obtained, with statistically significant differences among counties. Service of dogs had a significant influence on seropositivity, working dogs having an increased prevalence compared to pets. Testing of 14 samples using SNAP 4Dx® rapid test allowed an estimated specificity of 100% and a sensibility of 62% to be calculated.

Key words: *Borrelia burgdorferi* sensu lato, dogs, Transylvania, seroprevalence, rapid test,

Borelioza este cea mai importantă boală vectorială a emisferei nordice, fiind produsă de spirochete din grupul *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) şi transmisă atât la om, cât şi la animale, prin intermediul muşcăturii căpuşelor din genul *Ixodes*.

Aspectele clinice ale bolii sunt descrise detaliat la om, traducându-se în principal, dar nu exclusiv, prin manifestări cutanate (eritem migrator, acrodermatita cronică atrofiantă), articulare şi nervoase (paralizii ale nervului facial). La câine, la cal şi la bovine au fost descrise artite şi şchiopături provocate de infecţia cu *Borrelia burgdorferi* s.l. (Štefančíková, 2008),(11).

Dintre animalele domestice, diagnosticul de boreliază (Boala de Lyme) se stabileşte cel mai des la câini, chiar dacă se consideră, pe baza studiilor de seroprevalenţă, că doar 5 – 10 % din câinii care au venit în contact cu agentul patogen manifestă semne de boală (Bhide, 2008, Leschnik, 2010), (3, 9). Deoarece trăiesc în proximitatea omului, câinii sunt expuşi într-o măsură mai mult sau mai puţin egală cu aceştia la muşcătura unei căpuşe infectate şi sunt consideraţi specie santinelă pentru infecţia cu *B. burgdorferi* s.l. la om (Duncan, 2005), (5). De asemenea, anticorpii anti-*Borrelia* la câini au o durată de viaţă mai scurtă comparativ cu cei de la om - 1-1,5 ani, faţă de câţiva ani (Bhide, 2004), (2).

Studiul seroprevalenţei canine este de aceea un indicator mai fidel al situaţiei epidemiologice curente într-o anumită zonă, fiind important şi recomandat ca parte componentă a evaluării riscului de contractare a boreliozei Lyme la om.

MATERIAL ŞI METODĂ

Probele incluse în studiu au provenit de la 285 de câini din 7 judeţe diferite din Transilvania. Serurile au fost păstrate la -20° C până în momentul testării. Pentru fiecare animal s-au obţinut date care au permis împărţirea câinilor în categorii, pe baza sexului, vârstei (tineri 2 luni – 2 ani, adulţi 3 – 7 ani, vârsnici peste 8 ani) şi a utilizării (companie, lucru, comunitari).

Testarea s-a făcut utilizând în prima etapă kitul comercial Lyme Borrelia Canine IgG ELISA (NovaTec Immunodiagnostica, GmbH, Germania), destinat identificării anticorpilor anti-*Borrelia burgdorferi* s.l., conform indicaţiilor producătorului. Valorile de absorbţie au fost citite la cititorul de plăci PR 3100

TSC™ (Bio-Rad, USA), utilizând filtrul de 450/620 nm. Evaluarea reacţiilor s-a făcut comparând valorile de absorbţie obţinute cu cea a martorului cut-off din kit.

În cea de-a doua etapă a diagnosticului, serurile care au reacţionat pozitiv sau dubios au fost supuse examinării prin tehnica Western Blot, folosind kitul comercial Lyme Blot IgG Canine (NovaTec Immunodiagnostica, GmbH, Germania). Citirea s-a realizat prin compararea benzilor fiecărei probe cu cele ale martorului pozitiv inclus în kit. Au fost considerate pozitive probele care au acumulat un punctaj de minim 8 în urma însumării punctajului aferent fiecărei benzi identificate.

Un număr de 14 probe, dintre care 10 pozitive la Western Blot, au fost alese aleatoriu şi supuse testării cu testul rapid Snap® 4Dx (Idexx Laboratories, USA), conform indicaţiilor producătorului. Rezultatul a fost considerat pozitiv la apariţia unui punct albastru în zona corespunzătoare a testului.

Analiza statistică a rezultatelor a fost realizată cu programul R 2.12.0. Valorile obţinute pentru diferiţii factori studiaţi (sex, vârstă, ocupaţie, judeţ de provenienţă) au fost comparate folosind testul exact Fisher, valorile $p < 0,05$ fiind considerate semnificative.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Datele epidemiologice referitoare la răspândirea *B. burgdorferi* s.l. în ţara noastră sunt relativ puţine, chiar dacă vectorul, *I. ricinus*, este larg răspândit (Coipan 2010), (4). În România, Boala de Lyme nu face parte din categoria bolilor declarabile, şi până nu demult, din cauza multiplelor şi foarte variatelor manifestări clinice, a fost probabil mult subdiagnosticată.

Din totalul probelor testate în acest studiu, un număr de 14 au reacţionat pozitiv la testarea ELISA, dintre care, acestea 12 au fost confirmate prin Western Blot, rezultând o seropozitivitate canină medie de 4,21%. Cea mai mare seroprevalenţă a fost înregistrată în judeţul Hunedoara (25%), iar cea mai mică în judeţele Alba, Braşov şi Maramureş (0%). Diferenţa dintre prevalenţele diferitelor judeţe este semnificativă statistic ($p = 0,001$). Valoarea globală este aproximativ egală cu cea înregistrată la populaţiile de câini din Suedia (3,9% - Egenvall, 2000), Spania (6,9% - Amusategui, 2008) şi Cehia (6,5% - Pejchalová, 2006), dar inferioară seroprevalenţei raportate în Bulgaria (22.6%, Zarkov, 2003) şi Slovacia (33,5%, Štefančíková, 2008).

Dintre factorii de influenţă studiaţi, nu s-au înregistrat diferenţe semnificative statistic în ceea ce priveşte sexul şi vârsta ($p = 0,13$, respectiv $p = 0,509$) (Tabel).

Ocupaţia a avut o influenţă semnificativă în ceea ce priveşte seroprevalenţa. Astfel, câinii din grupa „lucru", categorie care a inclus câinii de vânătoare, câinii ciobăneşti şi câinii de pază, au prezentat o valoare a

seroprevalenţei semnificativ mai mare faţă de câinii din grupa „companie" (p = 0,03). Diferenţele dintre seroreactivitatea înregistrată la câinii din grupele „lucru" şi „comunitari", respectiv „comunitari" şi „companie" nu au fost semnificative statistic (Tabel).

Distribuţia seroprevalenţei în funcţie de variabilele studiate
Seroprevalence distribution dependind on studied varibles

Variabilă	Categorie	Nr. animale pozitive/ total(%)	Variabilă	Categorie	Nr. animale pozitive/ total(%)
Judeţ	Alba	0/11 (0)	Sex	Masculi	4/161(2,48)
	Bihor	3/13(23,07)		Femele	8/124(6,45)
	Braşov	0/14(0)	Vârstă	Tineri	4/108(3,7)
	Cluj	5/180(2,77)		Adulţi	7/119(5,88)
	Hunedoara	3/12(25)		Vârstnici	1/56(1,78)
	Maramureş	0/45(0)	Serviciu	Companie	2/117(1,7)
	Mureş	1/10(10)		Lucru	7/83(8,43)
				Comunitari	3/85(3,52)

Lipsa influenţei vârstei asupra valorii seroreactivităţii poate fi datorată persistenţei limitate a anticorpilor anti-*B. burgdorferi*, care nu permite detectarea acestora în cazul unei infecţii de peste 2 ani. Valoarea mai mare a seroprevalenţei înregistrate la câinii din grupa „lucru" se datorează cel mai probabil expunerii mai frecvente a acestor animale la căpuşe, având în vedere că în această categorie au fost incluşi câinii de vânătoare, câinii ciobăneşti şi câinii de pază. Un studiu efectuat de către Goosens şi colab. (2001) a relevat o corelaţie bună între seroprevalenţa la câinii de vânătoare şi cea înregistrată la vânători, subliniind utilitatea evaluării seroreactivităţii canine în aprecierea riscului la om.

Diagnosticul serologic al bolii Lyme rămâne o provocare atât la om, cât şi la animalele domestice. Standardul de aur în diagnosticul borreliozei Lyme îl reprezintă abordarea în doi paşi: un test de screening (ELISA sau IF), urmat de retestarea probelor care au reacţionat pozitiv prin Western Blot. Deşi dă rezultatele cele mai bune, această abordare presupune metode care au dezavantajul de a fi rezervate exclusiv laboratoarelor, necesitând manopere complexe şi uneori un timp îndelungat de execuţie. Testele rapide au avantajul de a putea fi utilizate în clinici şi cabinete, iar rezultatul poate fi citit în 8 minute. În studiul nostru, testul rapid SNAP® 4Dx a demonstrat o specificitate foarte bună, de 100%, şi o sensibilitate medie, de 62%.

Peptidul sintetic numit C6, folosit în producerea acestui test, reproduce o porţiune conservată a lipoproteinei de suprafaţă Vls-e, din celula *B. burgdorferi*. Anticorpii împotriva acestui antigen apar rapid în urma infecţiei, sunt foarte specifici, dar dispar în cursul infecţiei cronice înaintea anticorpilor faţă de alte antigene bacteriene (Johnsons, 2008). Aceasta ar putea explica sensibilitatea mai redusă a testului rapid prin detectarea mai slabă a infecţiilor vechi.

De asemenea, numărul redus de probe testate ar putea influenţa negativ corectitudinea estimării sensibilităţii.

CONCLUZII

1. Seroprevalenţa canină a anticorpilor anti-*Borrelia burgdorferi* s.l. în Transilvania este uşor inferioară mediei altor ţări europene.
2. În ţara noastră, diferenţele semnificative între valorile seropozitivităţii înregistrate în judeţele studiate sugerează o răspândire neuniformă a agentului patogen.
3. Diferenţele dintre categoriile de utilizare a câinilor influenţează semnificativ în unele cazuri incidenţa anticorpilor anti-*Borrelia* (câini folosiţi pentru diferite activităţi comparativ cu câinii de companie), datorită accesului diferenţiat la habitatele căpuşelor.
4. Pe baza rezultatelor obţinute se consideră că în unele cazuri testul rapid SNAP 4Dx® poate înlocui cu succes abordarea diagnostică în doi paşi.

BIBLIOGRAFIE

1. **Amusategui, I, Tesouro, MA, Kakoma, I, Sainz, Á.** , (2008) **-** Serological Reactivity to *Ehrlichia canis, Anaplasma phagocytophilum, Neorickettsia risticii, Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in Dogs from Northwestern Spain. Vector Borne Zoonot Dis; 8(6):797-803.
2. **Bhide, M, Travnicek, M, Curlik, J, Štefančíková A.**, (2004) - The importance of dogs in eco-epidemiology of Lyme borreliosis: a review. *Vet Med– Czech*; 49: 135-142.
3. **Bhide, M, Yilmaz, Z, Golcu, E, Torun, S**., (2008) - Seroprevalence of anti-Borrelia burgdorferi antibodies in dogs and horses in Turkey. Ann Agric Environ Med.; 15: 85–90.
4. **Coipan, E.C., Vladimirescu, AF**., (2010) - First report of lyme disease spirochetes in ticks from Romania (Sibiu County). Exp Appl Acarol; 52(2):193-197.
5. **Duncan, AW, Correa, MT, Levine, JF, Breitschwerdt, EB.,** (2005) **-** The dog as a sentinel for human infection: prevalence of *Borrelia burgdorferi* C6 antibodies in dogs from southeastern and mid-Atlantic States. Vector Borne Zoonotic Dis 2005; 5:101–109.
6. **Egenvall, A, Bonnett, BN, Gunnarsson, A, Hedhammar, A,** (2000) - Sero-prevalence of granulocytic *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Swedish dogs 1991–94. Scand J Infect Dis; 32:19–25.
7. **Goosens, HAT , AE. Van Den Bogaard, MKE Nohlmans.,** (2001) **-** Dogs as Sentinels for Human Lyme Borreliosis in The Netherlands. J Clin Microbiol 2001, 39(3): 844–848
8. **Johnson, AL., TJ Divers, YF Chang,** (2008) **-** Validation of an in-clinic enzyme-linked immunosorbent assay kit for diagnosis of Borrelia burgdorferi infection in horses. J Vet Diagn Invest.; 20:321–324.

9. **Leschnik, MV, Kirtz, G, Khanakah, G, Duscher, G**., (2010) - Humoral Immune Response in Dogs Naturally Infected with *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato and in Dogs after Immunization with a *Borrelia* Vaccine. Clin Vacc Immunol 2010; 17(5):828-835.

10. **Pejchalová, K, Zákovská, A, Fucík, K, Schánilec, P.,** (2006) **-** Serological confirmation of *Borrelia burgdorferi* infection in dogs in the Czech Republic. Vet Res Commun 2006; 30:231–238.

11. **Štefančíková, A, Derdáková, M, Škardová, I, Szestáková, E.,** (2008) **-** Some epidemiological and epizootiological aspects of Lyme borreliosis in Slovakia with the emphasis on the problems of serological diagnostics. Biologia; 63(6): 1135—1142.

12. **Zarkov, IS, Marinov, MM.,** (2003) **-** The Lyme disease: results of a serological study in sheep, cows and dogs in Bulgaria. Revue Méd. Vét, 2003; 154(5): 363-366.