

Ocena zgodności wyników oznaczania przeciwciał przeciw *Borrelia burgdorferi* sensu lato uzyskanych techniką ELISA z wykorzystaniem testów różnych producentów

Assessment of result compatibility of anti-*Borrelia burgdorferi* sensu lato antibodies determination by use of ELISA technique-based kits of different manufacturers

BOGUMIŁA HAJDROWSKA^{1/}, TOMASZ WIELKOSZYŃSKI^{2/}, JOANNA STRZELCZYK^{2/}, PIOTR CUBER^{3/},
ANDRZEJ WICZKOWSKI^{4/}

^{1/} Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

^{2/} Katedra i Zakład Biologii Medycznej i Molekularnej, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

^{3/} Zakład Parazytologii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

^{4/} Katedra Pielęgniarstwa i Ratownictwa, Akademia Techniczno-Humanistyczna w Bielsku-Białej

Wprowadzenie. Borelioza jest jednym z najczęściej diagnozowanych zakażeń przenoszonych przez kleszcze. Wobec trudności w izolacji krętka z grupy *Borrelia burgdorferi* sensu lato z materiału biologicznego i jego hodowli, jej rozpoznanie opiera się głównie na badaniach serologicznych. Testy ELISA powinny charakteryzować się wysoką czułością i swoistością diagnostyczną, jednak pomimo ciągłego doskonalenia nadal cechują się niedostateczną porównywalnością.

Cel. Ocena porównywalności wyników uzyskanych z użyciem wybranych testów ELISA pochodzących od trzech różnych producentów.

Materiały i metody. Materiałem do badań było 70 surowic pochodzących od osób podejrzanych o zakażenie *B. burgdorferi* s.l. Oznaczenia wykonano zestawami ELISA firm Euroimmun, Aescu Diagnostics i Genzyme Virotech GmbH, a próbki surowic dające dodatnie lub graniczne wyniki w testach firmy Euroimmun weryfikowano techniką immunoblot z wykorzystaniem zestawów RecomLine Borrelia (Mikrogen, Niemcy).

Wyniki. W przypadku przeciwciał klasy IgG seropozytywność stwierdzono dla 36-40% surowic w zależności od producenta testu ELISA. Zgodność wyników dla wszystkich trzech testów wynosiła 22,9% (wyniki dodatnie), 27,1% (wyniki graniczne) i 50,0% (wyniki ujemne). Natomiast w przypadku przeciwciał klasy IgM wyniki dodatnie stwierdzano dla 18-33% próbek w zależności od producenta, a zgodność wyników dla wszystkich trzech testów wynosiła zaledwie 7,1% dla wyników pozytywnych, 34,3% dla wyników granicznych oraz 41,4% dla wyników negatywnych.

Wnioski. Porównywalność testów ELISA stosowanych jako testy przesiewowe w diagnostyce boreliozy jest bardzo słaba i niezadowalająca, zarówno z punktu widzenia diagnostyki laboratoryjnego, jak i klinicysty. Interpretacja wyników badań przesiewowych w kierunku choroby z Lyme powinna uwzględniać ryzyko wystąpienia zarówno wyników fałszywie ujemnych, jak i fałszywie dodatnich.

Słowa kluczowe: *Borrelia burgdorferi sensu lato*, metoda immunoenzymatyczna, ELISA, borelioza z Lyme, porównywalność wyników

Introduction. Borreliosis is one of the most frequently diagnosed tick-borne infections. Isolation and cultivation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochetes from the biological material is difficult, thus, the serological methods are widely used for its diagnostics. ELISA tests should present high diagnostic sensitivity and specificity, but despite continuous improvements their comparability is still unsatisfactory.

Aim. To compare the results of selected ELISA kits for detection of IgM and IgG antibodies against *B. burgdorferi* s.l.

Material & method. The study involved 70 serum samples from patients suspected to be *B. burgdorferi* s.l. infected. The ELISA kits were from Euroimmun, Aescu Diagnostics and GenzymeVirotech GmbH. Positive and borderline results from the Euroimmun kits were confirmed by the use of immunoblot method (RecomLine Borrelia, Mikrogen, Germany).

Results. The seropositivity of IgG was ranging from 36 to 40% depending on the ELISA kit manufacturer. The compatibility of the results for all kits was 22.9% (positive results), 27.1% (borderline) and 50.0% (negative results). However, the seropositivity of IgM was observed in 18 to 33% of the samples depending on the manufacturer. The compatibility of the results for all tests reached only 7.1% for positive results, 34.3% for borderline and 41.4% for negative results.

Conclusion. The comparability of ELISA tests used for screening in the diagnosis of Lyme disease is very low and unsatisfactory from the point of view of laboratory diagnosticians and clinicians. The interpretation of the results of screening tests for borreliosis should include the risk of incidence of both false negative and false positive results.

Key words: *Borrelia burgdorferi sensu lato*, immunoenzymatic method, ELISA, Lyme borreliosis, results compatibility

Wprowadzenie

Borelioza jest najczęściej występującym w Polsce zakażeniem odkleszczowym. Pomimo dysponowania szerokim wachlarzem metod bakteriologicznych, serologicznych czy molekularnych, diagnostyka tego zakażenia wciąż nastęrcza licznych trudności i może prowadzić do uzyskiwania wyników zarówno fałszywie ujemnych, jak i fałszywie dodatnich. Złożony cykl życiowy krętka *Borrelia burgdorferi* oraz nabyte w toku ewolucji strategie przeżycia mikroorganizmu powodują, że diagnostyka boreliozy jest trudna i wymaga często indywidualizacji postępowania diagnostycznego [1-6]. Sprawę komplikuje dodatkowo możliwość współwystępowania wraz z boreliozą innych zakażeń przenoszonych przez kleszcze, których objawy kliniczne są zbliżone do objawów choroby z Lyme.

Boreliozę wywołują krętki z genogrupy *Borrelia burgdorferi sensu lato*, do której należy co najmniej 15 genogatunków krętków. Pięć z nich uznawanych jest za niewątpliwe czynniki etiologiczne boreliozy. Należą do nich: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bissettii*, oraz *B. spielmanii*. Wszystkie wymienione gatunki występują w Europie (w tym w Polsce), natomiast na półkuli zachodniej (USA) występuje tylko jeden patogeniczny genogatunek krętka: *B. burgdorferi sensu stricto* [1, 3, 7].

Współczesna diagnostyka choroby z Lyme opiera się na wykorzystaniu zarówno metod bezpośrednio wykrywających obecność czynnika etiologicznego w organizmie, jak i metod pośrednich. Ze względu na trudności w bezpośredniej izolacji krętków oraz niską czułość diagnostyczną metod PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy – *polymerase chain reaction*), rutynowo stosowane są metody pośrednie, w szczególności oparte o techniki immunoenzymatyczne fazy stałej (ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*) i immunoblot [1-7]. Ponadto, w związku z niedoskonałością rutynowo stosowanych metod, stale poszukuje się nowych metod diagnostycznych poprawiających wydajność diagnostyczną w tej chorobie.

Powszechnie zalecane, rutynowe postępowanie diagnostyczne przy podejrzeniu zakażenia krętkiem *B. burgdorferi s.l.* obejmuje wykonanie w pierwszym etapie badania przesiewowego z wykorzystaniem techniki ELISA lub podobnej, np. IIF (metoda immunofluorescencji pośredniej – *indirect immunofluorescence method*), ELFA (metoda enzymatycznej fluorescencji – *enzyme-linked fluorescence assay*), FPIA (metoda immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym – *fluorescence polarization immunoassay*), a następnie w przypadku uzyskania dodatniego lub granicznego wyniku, wykonanie testu typu immunoblot, będącego tzw. testem potwierdzenia [1-3, 8-12]. Metody przesiewowe, w tym techniki ELISA, stosowane do detekcji przeciwciał przeciw *B. burgdorferi s.l.*, powin-

ny z założenia cechować się wysoką czułością diagnostyczną, przy stosunkowo miernej lub małej swoistości diagnostycznej (dodatni wynik testu przesiewowego zawsze podlega weryfikacji testem potwierdzenia). W praktyce klinicznej często obserwowana jest niewielka porównywalność wyników uzyskiwanych testami immunochemicznymi (ELISA i immunoblot) różnych producentów, co niejednokrotnie spowalnia i utrudnia proces diagnostyczny. Jest to poważny i niestety wciąż niedoceniany w praktyce problem w diagnostyce serologicznej różnych zakażeń, w tym również i choroby z Lyme.

Cel

Ze względu na sygnalizowane w piśmiennictwie oraz obserwowane w praktyce problemy dotyczące porównywalności wyników uzyskiwanych technikami immunochemicznymi stosowanymi w diagnostyce boreliozy (głównie techniką ELISA) celem pracy była ocena porównywalności wyników testu ELISA uzyskanych z wykorzystaniem zestawów trzech różnych producentów.

Materiały i metody

Materiałem do badań było 70 surowic pobranych od osób zamieszkałych na terenach Górnego Śląska i podejrzanych o zakażenie *B. burgdorferi s.l.* Badania wykonano w ramach realizacji projektu polsko-norweskiego „Ryzyko ekspozycji na kleszcze (*Acari, Ixodida*) i przenoszone przez nie patogeny na terenie Polski”, w ramach którego zbierano wywiad epidemiologiczny (ankieta wypełniana przez badanego) oraz wykonywano badania serologiczne w kierunku zakażenia krętkiem *B. burgdorferi s.l.* wśród ludności zamieszkującej obszary Polski południowej i podającej w wywiadzie pokąsanie przez kleszcza (kleszcze). Osoby z pozytywnymi wynikami badań serologicznych (szczególnie testu immunoblot) kierowane były następnie do lekarza chorób zakaźnych w celu podjęcia ewentualnego leczenia przyczynowego. Na wykonanie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (nr KNW-6501-100/08).

W toku badania, od każdego pacjenta pobrano 5 ml krwi żyłnej z żyły łokciowej, z której po wykrzepieniu i odwirowaniu oddzielano surowicę. Uzyskany materiał przechowywano w temp. -70°C do czasu wykonania badań.

Badania przesiewowe techniką ELISA wykonywano rutynowo z wykorzystaniem testów firmy Euroimmun (Niemcy) w klasach IgG i IgM (anti-*Borrelia burgdorferi* IgM i anti-*Borrelia burgdorferi* plus VlsE IgG). Uzyskane w teście ELISA graniczne i dodatnie wyniki potwierdzano wykonując test immunoblot (RecomLine *Borrelia*, Mikrogen Diagnostik, Niem-

cy). Oznaczenia tą metodą wykonywano manualnie, zgodnie z instrukcją producenta, a do interpretacji wyników wykorzystano oprogramowanie RecomScan (Mikrogen Diagnostik, Niemcy). Zgodnie z założoną procedurą (i obowiązującymi zaleceniami dotyczącymi diagnostyki boreliozy [1, 10, 12]), badania potwierdzające techniką immunoblot przeprowadzono jedynie w próbkach surowic dających pozytywne lub graniczne wyniki w teście ELISA firmy Euroimmun.

Dodatkowo w wybranej puli 70 surowic pochodzących od pacjentów uczestniczących w projekcie, wykonano niezależnie badania metodą ELISA z wykorzystaniem testów ELISA dwóch innych producentów, tj. zestawów AescuLISA anti-Borrelia IgG i IgM firmy Aescu Diagnostics (Niemcy) oraz anti-Borrelia afzelii IgG i IgM firmy Genzyme Virotech GmbH (Niemcy).

Skład i pochodzenie antygenów krętkowych stosowanych przez producentów testów do opłaszczenia fazy stałej przedstawiono w tabeli I, natomiast charakterystykę analityczną testów w tabeli II.

Badania techniką ELISA przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producentów. Do odczytów absorbancji wykorzystano czytnik płytek ELISA PowerVave XS (Biotek, USA), zaś do akwizycji i opracowania wyników – program KCJunior (Biotek, USA).

Statystyczne opracowanie wyników objęło procentową ocenę częstości występowania wyników ujemnych, granicznych i dodatnich, uzyskanych poszczególnymi testami ELISA w grupie analizowanych próbek oraz korelację wyników pomiędzy testami róż-

nych producentów, którą przeprowadzono w oparciu o współczynnik korelacji rang Spearmana.

Wyniki

Wyniki oznaczeń przeciwciał przeciwko *B. burgdorferi s.l.* w klasie IgG z podziałem na ujemne, graniczne i dodatnie uzyskane zestawami firm Euroimmun, Aescu Diagnostics i Genzyme Virotech przedstawia tabela III. Podane zostały również wartości średnie ($M \pm SD$). W celu umożliwienia porównania wartości stężeń, dodatkowo zastosowano ich normalizację względem podanych przez producentów testów wartości odcięcia, wyliczając stosunek wartości stężeń do wartości odcięcia podanej przez producenta (S/Co – indeksy pozytywności).

Zgodność wyników dla wszystkich trzech testów wynosiła 22,9% (wyniki dodatnie), 27,1% (wyniki graniczne) i 50,0% (wyniki ujemne).

Test immunoblot dla próbek surowic dających dodatnie lub graniczne wyniki w teście ELISA firmy Euroimmun w klasie IgG wykonano dla 44 próbek, uzyskując 16 wyników dodatnich (co stanowiło 36% badanych próbek), 4 wyniki graniczne (9%) i 24 wyniki ujemne (55%).

Wyniki oznaczeń przeciwciał przeciwko *B. burgdorferi s.l.* w klasie IgM z podziałem na ujemne, graniczne i dodatnie uzyskane zestawami firm Euroimmun, Aescu Diagnostics i Genzyme Virotech przedstawia tabela IV. Dodatkowo podane zostały wartości średnie oznaczonych stężeń przeciwciał ($M \pm SD$).

Tabela I. Skład i pochodzenie antygenów krętkowych wykorzystywanych w ocenianych zestawach ELISA
Table I. Composition and origin of antigens used in evaluated ELISA kits

Producent testu ELISA /ELISA kit manufacturer	Antygeny na fazie stałej dla przeciwciał IgG /Solid phase antigens for IgG antibodies	Antygeny na fazie stałej dla przeciwciał IgM /Solid phase antigens for IgM antibodies
Euroimmun	natywne antygeny <i>B. garinii</i> , <i>B. afzelii</i> i <i>B. sensu stricto</i> + rekombinowane VlsE /native antigens of <i>B. garinii</i> , <i>B. afzelii</i> and <i>B. sensu stricto</i> + recombinant VlsE	natywne antygeny <i>B. garinii</i> , <i>B. afzelii</i> i <i>B. sensu stricto</i> /native antigens of <i>B. garinii</i> , <i>B. afzelii</i> and <i>B. sensu stricto</i>
Aescu Diagnostics	natywne antygeny (wszystkie genogatunki) + rekombinowane VlsE /native antigens (all geno-species) + recombinant VlsE	natywne OspC (genogatunek) + rekombinowane p41i (fragment wewnętrzny) /native OspC (geno-species) + recombinant p41i (internal fragment)
Genzyme Virotech GmbH	natywne antygeny <i>B. afzelii</i> (szczep Pko) + rekombinowane VlsE /native antigens of <i>B. afzelii</i> (Pko strain) + recombinant VlsE	natywne antygeny <i>B. afzelii</i> (szczep Pko) /native antigens of <i>B. afzelii</i> (Pko strain)

Tabela II. Charakterystyka analityczna stosowanych zestawów ELISA
Table II. Analytical characteristics of evaluated ELISA kits

Producent testu /Kit manufacturer	klasa przeciwciał /class of antibodies	wartość odcięcia /cut-off point	zakres pomiarowy /analytical range	czułość analityczna (dane producenta) /analytical sensitivity (manufacturer's data)	współczynnik zmienności /coefficient of variation [%]	
					wewnątrzseryjnej /intra-assay (n=12)	międzyseryjnej /inter-assay (n=12)
Euroimmun	IgG	20 RU/ml	2-200 RU/ml	<2 RU/ml	4,8	7,4
	IgM	20 RU/ml	2-200 RU/ml	<2 RU/ml	5,0	8,2
Aescu Diagnostics	IgG	15 U/ml	0-300 U/ml	1 U/ml	4,4	9,1
	IgM	15 U/ml	0-300 U/ml	1 U/ml	5,1	8,5
Genzyme Virotech GmbH	IgG	10 VE	0-100 VE	0,05 VE	4,6	7,7
	IgM	10 VE	0-100 VE	0,05 VE	6,1	9,5

Tabela III. Wyniki oznaczeń przeciwciał przeciw *B. burgdorferi s.l.* w klasie IgG uzyskane z wykorzystaniem zestawów ELISA firm Euroimmun, Aescu Diagnostics i Genzyme Virotech GmbH w grupie 70 surowicTable III. Results of analysis of antibodies against *B. burgdorferi s.l.* in IgG class obtained by use of ELISA kits from Euroimmun, Aescu Diagnostics and Genzyme Virotech GmbH in a group of 70 sera

Nazwa zestawu ELISA i producentu testu /Name of ELISA kit and manufacturer	Wyniki /Results			M±SD (wartości znormalizowane±SD) /M±SD (normalised values±SD)
	ujemne /negative	graniczne /borderline	dodatnie /positive	
Anti-Borrelia plus VIsE ELISA IgG (Euroimmun)	37% (n=26)	23% (n=16)	40% (n=28)	46,9±69,3 RU/ml (2,34±3,46)
AescuLisa IgG (Aescu Diagnostics)	53% (n=37)	11% (n=8)	36% (n=25)	87,9±219,6 U/ml (5,86±14,64)
Anti-Borrelia afzelii IgG ELISA (Genzyme Virotech GmbH)	47% (n=33)	17% (n=17)	36% (n=25)	12,6±11,3 VE (1,27±1,13)

Tabela IV. Wyniki oznaczeń przeciwciał przeciw *B. burgdorferi s.l.* w klasie IgM uzyskane z wykorzystaniem zestawów ELISA firm Euroimmun, Aescu Diagnostics i Genzyme Virotech GmbH w grupie 70 surowicTable IV. Results of analysis of antibodies against *B. burgdorferi s.l.* in IgM class obtained by use of ELISA kits from Euroimmun, Aescu Diagnostics and Genzyme Virotech GmbH in a group of 70 sera

Nazwa zestawu ELISA i producentu testu /Name of ELISA kit and manufacturer	Wyniki /Results			M±SD (wartości znormalizowane±SD) /M±SD (normalised values±SD)
	ujemne /negative	graniczne /borderline	dodatnie /positive	
Anti-Borrelia ELISA IgM (Euroimmun)	56% (n=39)	21% (n=15)	23% (n=16)	36,3±52,9 RU/ml (1,82±2,64)
AescuLisa IgM (Aescu Diagnostics)	73% (n=51)	8,5% (n=6)	18,5% (n=13)	16,3±55,1 U/ml (1,09±3,67)
Anti-Borrelia afzelii IgM ELISA (Genzyme Virotech GmbH)	53% (n=37)	14% (n=10)	33% (n=23)	9,8±9,1 VE (1,00±0,91)

Podobnie, jak w przypadku wyników w klasie IgG, podane zostały również znormalizowane względem wartości odcięcia wyniki oznaczeń (S/Co).

Zgodność wyników dla wszystkich trzech testów wynosiła zaledwie 7,1% dla wyników pozytywnych, 34,3% dla wyników granicznych oraz 41,4% dla wyników negatywnych.

Test immunoblot dla próbek surowic dających dodatnie lub graniczne wyniki w teście ELISA firmy Euroimmun w klasie IgM wykonano dla 31 próbek, uzyskując 10 wyników dodatnich (co stanowiło 32% badanych próbek), 2 wyniki graniczne (7%) i 19 wyników ujemnych (61%).

Ponieważ weryfikacji metodą immunoblot podlegały jedynie próbki dające wynik dodatni lub graniczny w teście ELISA firmy Euroimmun, porównanie wyników pomiędzy techniką ELISA i immunoblot było możliwe jedynie dla podgrupy 44 wyników w klasie IgG i 31 wyników w klasie IgM. Pozwoliło to jedynie na zakwalifikowanie uzyskanych wyników testu ELISA jako prawdziwie bądź fałszywie dodatnie i uniemożliwiło wyliczenie czułości i swoistości diagnostycznej dla ocenianych testów ELISA.

Ponadto wykazano dodatnie korelacje pomiędzy wynikami uzyskanymi testami ELISA trzech producentów. W klasie IgG wykazano następujące korelacje między wynikami uzyskanymi testami firm: Euroimmun i Aescu Diagnostics ($R=0,540$; $p<0,001$); Euroimmun i Virotech ($R=0,524$; $p<0,001$); Virotech

i Aescu Diagnostics ($R=0,634$; $p<0,001$). W klasie IgM wykazano następujące korelacje między wynikami uzyskanymi testami firm: Euroimmun i Aescu Diagnostics ($R=0,670$; $p<0,001$); Euroimmun i Virotech ($R=0,778$; $p<0,001$); Virotech i Aescu Diagnostics ($R=0,751$; $p<0,001$).

Dyskusja

Rutynowa diagnostyka zakażeń krętkami *B. burgdorferi s.l.* opiera się na wykrywaniu obecności przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom tego krętka w materiale biologicznym [1-3, 5, 8-11]. Wykorzystywane są do tego testy serologiczne, najczęściej oparte o techniki ELISA i immunoblot. Pomimo ciągłego doskonalenia metod immunochemicznych, diagnostyka zakażeń krętkami *B. burgdorferi s.l.* jest trudna [5, 6, 10]. Przyczyną trudności diagnostycznych i fałszywie ujemnych wyników badań serologicznych jest m.in. występowanie różniących się antygenowo genogatunków krętków, zmiana prezentowanych w trakcie zakażenia antygenów, zmienność antygenowa i genotypowa białek krętkowych, kompartmentyzacja odpowiedzi immunologicznej oraz występowanie przeciwciał w postaci skompleksowanej z antygenami krętka [1, 5]. Interpretację kliniczną obecności przeciwciał przeciwko *B. burgdorferi s.l.* utrudnia również długie utrzymywanie się odpowiedzi immunologicznej, brak standaryzacji stosowanych testów oraz brak testu jednoznacznie związanego z aktywnym okresem choroby [1, 2, 5].

Przesiewowe testy ELISA stosowane do diagnostyki boreliozy z założenia powinny cechować się wysoką czułością diagnostyczną, zakładającą nadrozpoznawalność, czyli względnie częste występowanie wyników fałszywie dodatnich, powodowanych innymi niż borelioza zakażeniami lub związanych z reaktywnością krzyżową wykrywanych przeciwciał [1-3, 5, 10].

Zwyczajowo do konstrukcji testów ELISA stosowane są antygeny krętkowe, uzyskiwane przez sonifikację krętków *B. burgdorferi s.l.* hodowanych w warunkach *in vitro* (są to tzw. testy I generacji). Zawierają one oprócz zmiennych ilości antygenów gatunkowo swoistych, również znaczne ilości nieswoistych antygenów bakteryjnych (np. flagelinę i białka szoku cieplnego), prowadzących do uzyskiwania wyników nieswoiście dodatnich. Warto pamiętać też, że ultrasonaty krętków hodowanych *in vitro* nie zawierają ważnego diagnostycznie antygeny VlsE, którego biosynteza u krętka zachodzi jedynie w organizmie kręgowca [1, 10]. W nowszych wersjach testów immunoenzymatycznych (II generacja testów ELISA), jako antygeny stosowane są rekombinowane antygeny krętkowe, a także natywne białka antygenowe uzyskiwane w hodowli krętków *in vitro*, a następnie poddane izolacji i wieloetapowemu oczyszczeniu. Biosynteza natywnych białek w hodowli krętków może zależeć od warunków hodowli, takich jak: skład podłoża, temperatura, pH, stężenie tlenu czy dwutlenku węgla, co powoduje, że wyizolowane białka mogą różnić się reaktywnością. Wskazują na to m.in. doniesienia o heterogennej ekspresji antygeny OspC (białko zewnętrznej osłonki A-C – *outer surface protein A-C*) [1, 7, 13]. Również poszczególne genogatunki i serotypy krętków, stosowane jako źródło antygenów w testach immunochemicznych, mogą cechować się zmienną ekspresją poszczególnych antygenów, a antygeny te mogą różnić się sekwencją aminokwasową, co warunkuje zmienną reaktywność przeciwciał z tak otrzymanymi białkami antygenowymi. Wspomniane wyżej różnice sekwencji dotyczą w największym stopniu tak ważnych diagnostycznie antygenów, jak białko OspC (p25) lub DbpA (p18) (białko A wiążące dekorynę – *decorin-binding protein A*) i mogą sięgać nawet 60% [1, 14]. Z drugiej strony wiadomo, iż rekombinowane białka OspC mogą słabiej reagować z przeciwciałami IgM w surowicach pacjentów, co prowadzi do uzyskiwania fałszywie ujemnych wyników [13]. W piśmiennictwie przedmiotu przeważa pogląd, że czułość zarówno testu ELISA, jak i testu immunoblot, jest tym większa, im szerszy jest zestaw antygenów krętkowych (jak również ich pochodzenie – genogatunki krętka) stosowanych przez producenta testu do opłaszczenia fazy stałej [10, 15, 17, 18].

Pewne nadzieje w diagnostyce serologicznej choroby z Lyme stanowią antygeny peptydowe, będące

krótkimi (od kilku do dwudziestu kilku reszt aminokwasowych) fragmentami antygenów krętkowych, wybranymi z uwagi na największą i najbardziej specyficzną reaktywność z surowicami pacjentów w różnych fazach zakażenia. Najbardziej znanym antygenem tego typu jest tzw. antygen C6 lub IR6 (szósty region konserwatywny – *sixth invariant region*), będący fragmentem antygeny VlsE [16], jednak opisywano również zależność wyników badań serologicznych od zmian w sekwencji peptydu C6 (różne sekwencje reprezentujące różne genogatunki krętków).

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań własnych, w których oceniano porównywalność wyników uzyskanych testami ELISA trzech różnych producentów, generalnie wskazują na brak zgodności tych wyników. Przyczynami obserwowanych rozbieżności mogą być m.in. różnice w składzie antygenów opłaszczających fazę stałą oraz ich pochodzenie (genogatunki krętków wykorzystanych przez producentów jako źródło antygenów), a także odmienne, arbitralnie ustalane przez producentów, punkty odcięcia tych testów. Stan taki spowodowany jest brakiem międzynarodowych ustaleń dotyczących doboru antygenów i wzorca przeciwciał, a także ustalenia jednolitych zasad konstrukcji i zastosowania testów immunochemicznych w diagnostyce boreliozy, co podkreślają również inni autorzy [1, 6, 8, 10, 19-25]. Przyczyną obserwowanych różnic w uzyskanych wynikach może być również zależna od fazy choroby swoistość i dynamika produkcji swoistych przeciwciał przeciwko *B. burgdorferi s.l.*, a wraz z tym zmieniająca się czułość diagnostyczna metod serologicznych [24, 25].

W przypadku wyników dla klasy IgG wykonanych z wykorzystaniem zestawów firm Euroimmun, Aescu Diagnostics i Genzyme Virotech GmbH uzyskano podobny odsetek wyników dodatnich (36-40%) oraz stosunkowo dobrą korelację pomiędzy wynikami testów różnych producentów. Jednak zgodność wyników dla wszystkich trzech testów wynosiła 23% dla wyników pozytywnych, 27% dla wyników granicznych oraz 50% dla wyników negatywnych, co stanowi o co najmniej miernej użyteczności wyników z punktu widzenia praktyki klinicznej.

W przypadku wyników dla przeciwciał klasy IgM uzyskane wyniki cechowały się jeszcze większym rozrzutem, co najwyraźniej widoczne jest w przypadku wyników dodatnich (od 18,5% dla testu AescuLisa IgM do 33% dla testu firmy Genzyme Virotech GmbH). Zgodność wyników dodatnich w testach wszystkich 3 producentów wyniosła zaledwie 7,1%, co przy braku innych badań diagnostycznych (np. testu typu immunoblot) czyni pojedynczy wynik testu ELISA wykonany przygodnie dostępnym zestawem niewiarygodnym i praktycznie bezużytecznym z punktu widzenia kliniczno-diagnostycznego.

Dane z piśmiennictwa dotyczące porównywalności testów ELISA oraz ich czułości i swoistości diagnostycznej dostarczają podobnych do opisanych w niniejszym doniesieniu wyników. W badaniach Chmielewskiej-Badory i wsp. [20] wykazano, że odpowiednio 61,7 i 53,9% próbek surowic pochodzących od pacjentów z rozpoznaną klinicznie boreliozą charakteryzowało się dodatnimi lub granicznymi wynikami testu ELISA w klasach IgM i IgG oraz 62,2 i 59,4% w teście immunoblot w klasach IgM i IgG. Ponadto stwierdzono w nich silną, dodatnią korelację pomiędzy pozytywnym wynikiem testu ELISA, a dodatnim wynikiem testu immunoblot, szczególnie potwierdzającego obecność przeciwciał przeciw antygenowi OspC w klasie IgM i antygenowi VlsE w klasie IgG [20].

Natomiast badania Smismans i wsp., oceniające czułość i specyficzność diagnostyczną testów ELISA dwóch różnych producentów wykazały czułość dla przeciwciał klasy IgG w zakresie od 53 do 88%, zaś IgM – od 64 do 89%. Natomiast specyficzność diagnostyczną kształtowała się odpowiednio w klasach IgM i IgG w zakresach od 52 do 78% i od 92 do 100%. W badaniu tym największą czułością i specyficznością diagnostyczną cechował się test C6 Lyme, oparty o peptydowy antygen C6 będący fragmentem antygeny VlsE i oceniający obecność przeciwciał obu klas łącznie (czułość diagnostyczna 91%, specyficzność diagnostyczna 92%) [19], co jednak nie znajduje potwierdzenia w badaniach własnych autorów [dane niepublikowane].

Również badania Ang i wsp., oceniające porównywalność wyników ośmiu testów ELISA i pięciu testów immunoblot, opartych zarówno na natywnych lizatach krętkowych, jak i rekombinowanych antygenach krętkowych, wykonane na 89 próbkach surowic wykazały, że czułość diagnostyczna testów ELISA wynosiła od 34 do 59%. Również wyniki oznaczeń wykonanych techniką immunoblot było bardzo rozbieżne. Notowano m.in. pozytywne wyniki testów WesternBlot w próbkach surowic negatywnych we wszystkich ośmiu badanych testach ELISA. Autorzy tego badania konkludują, że wybór testu ELISA i immunoblot w znaczący sposób wpływa na wykrywalność boreliozy i międzylaboratoryjną porównywalność wyników badań serologicznych wykonywanych w jej kierunku [21].

Ocena bieglności analitycznej 516 laboratoriów dokonana w ramach *Wisconsin State Laboratory of Hygiene/College of American Pathologist Proficiency Testing Program* w latach 1992-1994 wskazuje, że około połowa uczestniczących laboratoriów nieprawidłowo identyfikowało nadsyłane w ramach programu surowice kontrolne. Specyficzność diagnostyczna oznaczeń wynosiła od 81 do 95% w zależności od okresu badania, zaś czułość diagnostyczna od 75 do 93%. Fałszywie pozytywne wyniki badań przesiewo-

wych (głównie techniką ELISA) uzyskiwano nawet w ok. 55% dla niektórych próbek surowic kontrolnych (np. próbka surowicy zawierająca przeciwciała przeciw *Treponema pallidum* została zakwalifikowana jako pozytywna przez 70% uczestników programu). W ślad za tymi wynikami, autorzy opracowania sugerują wprowadzenie sztywnych kryteriów dopuszczających komercyjnie dostępne zestawy do użytku w diagnostyce laboratoryjnej choroby z Lyme (czułość diagnostyczna powyżej 90%, a swoistość diagnostyczna powyżej 95%) [22], co w praktyce i przy obecnym braku ogólnoświatowej standaryzacji metod służących do serologicznej diagnostyki boreliozy z Lyme wydaje się mało możliwe.

Metanaliza 18 publikacji oceniających czułość diagnostyczną testów ELISA opublikowana w 2016 r. przez Cook'a i Puri wykazała, że parametr ten dla poszczególnych prac wahał się w zakresie od 30,6 do 86,2%, zaś średnia ważona dla wszystkich analizowanych prac wносиła 59,5% [25].

Również analiza zmian czułości diagnostycznej stosowanych w diagnostyce boreliozy z Lyme metod serologicznych w latach 1996-2016, przeprowadzona przez tych samych autorów [25] nie wykazała znaczącej poprawy czułości diagnostycznej na przestrzeni tego czasu.

Zgodnie z założoną ogólną procedurą oraz zaleceniami [1, 3, 10, 12, 14], badania potwierdzające techniką immunoblot przeprowadzono jedynie w próbkach surowic dających pozytywne lub graniczne wyniki w teście ELISA firmy Euroimmun. Z uwagi na powyższe ograniczenia autorzy opracowania nie są w stanie w pełni ocenić rzeczywistej czułości i swoistości diagnostycznej wszystkich badanych testów ELISA. Ze względu na brak obiektywnych danych klinicznych (dostępne jedynie dane ankietowe), trudno jest też jednoznacznie określić symptomatologię i czas trwania zakażenia (fazę choroby) u badanych pacjentów. Dlatego przy opracowaniu wyników możliwa była jedynie ocena seropozytywności dla testów poszczególnych producentów oraz ocena zgodności ich wyników (porównywalności), a dla testów ELISA firmy Euroimmun, stosowanych jako podstawowy test przesiewowy w I etapie badań populacyjnych, możliwe było porównanie wyników testu ELISA z wynikami testu potwierdzenia (test immunoblot). W klasie IgM potwierdzalność dodatnich i granicznych wyników testu ELISA firmy Euroimmun wynosiła 39% (32% próbek dodatnich i 7% granicznych w teście Recline Borrelia IgM), zaś w klasie IgG – 45% (36% próbek dodatnich i 9% granicznych w teście Recline Borrelia IgG). Podczas interpretacji powyższych wyników należy zwrócić uwagę na wynoszącą ok. 40% potwierdzalność wyników pozytywnych i granicznych uzyskiwanych techniką ELISA dokonywaną testem

typu immunoblot. Pośrednio dowodzić to może uzyskiwania w teście ELISA wyników fałszywie dodatnich. Pamiętać należy jednak o specyficznym składzie grupy badanej (większość próbek stanowiły surowice dające wyniki graniczne lub słabododatnie w teście ELISA), co niewątpliwie może zaburzać obiektywną ocenę ryzyka wystąpienia wyników fałszywie dodatnich uzyskanych z użyciem ocenianych zestawów ELISA.

Problem niskiej swoistości diagnostycznej testów ELISA stosowanych w diagnostyce boreliozy wynika z faktu stosowania jako antygenów, nieoczyszczonych białek krętkowych (natywne antygeny otrzymywane z bakteryjnych lizatów komórkowych) lub wybranych, pojedynczych antygenów rekombinowanych i peptydowych. Ponadto, do uzyskania fałszywie dodatniego wyniku testu przesiewowego mogą się przyczyniać obecne w próbkach, ogólnie znane czynniki interferujące w metodach immunochemicznych, takie jak czynniki reumatoidalne, przeciwciała heterofilne i skierowane przeciw białkom zwierzęcym oraz krzyżowo reagujące przeciwciała związane z zakażeniem innymi gatunkami krętków (kiła i inne krętkowice, krętka saprofityczne) lub bakteriami posiadającymi wspólne antygeny nieswoiste (flagellina, białka szoku cieplnego). Opisano również fałszywie dodatnie reakcje pojawiające się w przebiegu wirusowych zapaleń wątroby, zakażeniu wirusem Epsteina-Barra (EBV – mononukleozą zakaźną) oraz w chorobach autoimmunologicznych [1, 5, 10, 14].

Zgodnie z zaleceniem Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych (PTEiLChZ), dotyczącym diagnostyki i leczenia boreliozy, rozpoznanie każdej postaci klinicznej boreliozy z wyjątkiem rumienia wędrującego, wymaga dwuetapowego protokołu diagnostycznego. W pierwszym etapie należy wykazać obecność swoistych przeciwciał w klasie IgM lub IgG metodą immunoenzymatyczną (ELISA lub równorzędną), a w drugim etapie u chorych z wynikami dodatnimi lub wątpliwymi, należy wykonać badania techniką immunoblot [12]. Przy takim, powszechnie zalecanym dwuetapowym toku postępowania diagnostycznego, kontrowersyjna wydaje się możliwość uzyskania na pierwszym etapie diagnostyki (w teście przesiewowym wykonywanym np. techniką ELISA) wyniku fałszywie ujemnego, co eliminuje pacjenta z dalszych etapów diagnostyki i odsuwa rozpoznanie zakażenia w czasie. Spowodowane to może być różnymi czynnikami, zarówno zależnymi od stosowanej metodyki badań (np. nieodpowiednio dobranych wartości odcięcia lub składu antygenów opłaszczających fazę stałą), jak i indywidualnych cech odpowiedzi immunologicznej pacjenta. Biorąc pod

uwagę powyższe obserwacje własne oraz liczne, cytowane powyżej dane z piśmiennictwa, w tym również ryzyko uzyskania fałszywie ujemnego wyniku testu ELISA, za wysoce zasadne wydaje się wykonywanie obu etapów diagnostycznych (ELISA + immunoblot) jednocześnie, zwłaszcza u pacjentów, u których istnieją kliniczne przesłanki do rozpoznania boreliozy, a wyniki testu ELISA dostarczają wyników ujemnych bądź granicznych. Również ze względu na obserwowany brak porównywalności wyników testu ELISA, rzetelne monitorowanie stężenia przeciwciał skierowanych przeciw *B. burgdorferi* s.l. (tj. seryjne oznaczanie stężenia tych przeciwciał u tego samego pacjenta), może być wykonywane tylko z wykorzystaniem testów tego samego producenta, tj. opierających się na wykorzystaniu jednakowych antygenów opłaszczających fazę stałą oraz materiałów kalibracyjnych i kontrolnych.

Podsumowując należy podkreślić, że obecnie nie dysponujemy testami serologicznymi (zarówno typu przesiewowego, jak i testami potwierdzającymi) o 100% czułości i specyficzności diagnostycznej. Nie należy więc zapominać o ryzyku uzyskania fałszywie ujemnego lub dodatniego wyniku badania przesiewowego, a uzyskane wyniki interpretować w powiązaniu z obrazem klinicznym i sytuacją epidemiologiczną panującą na danym terenie.

Wnioski

1. Porównywalność testów ELISA stosowanych jako testy przesiewowe w diagnostyce boreliozy jest bardzo słaba i niezadowalająca zarówno z punktu widzenia diagnosty laboratoryjnego, jak i klinicysty.
2. Słaba porównywalność wyników przesiewowych badań serologicznych prowadzi do wniosku, iż przy ich interpretacji należy brać pod uwagę możliwość wystąpienia zarówno wyników fałszywie dodatnich, spowodowanych np. przeciwciałami krzyżowo reagującymi z antygenami *B. burgdorferi* s.l., jak i wynikami fałszywie ujemnymi, spowodowanymi niedostateczną i często nieoszacowaną, czułością diagnostyczną tychże testów.

Źródło finansowania: Praca została wykonana w ramach realizacji projektu polsko-norweskiego „Ryzyko ekspozycji na kleszcze (Acari, Ixodida) i przenoszone przez nie patogeny na terenie Polski”, nr PL0343 realizowanego przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach w latach 2009-2011.

Konflikt interesów: Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

Piśmiennictwo / References

1. Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007, 49(1): 13-21.
2. Grzeszczuk A. Borelioza w praktyce klinicznej. PZWL, Warszawa 2009.
3. Diagnostyka laboratoryjna chorób odkleszczowych. Rekomendacje Grupy Roboczej. Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych, Warszawa 2014. http://kidl.org.pl/uploads/rekomendacje/05_kleszcze%20z%20okladka.pdf (22.03.2016).
4. Matuszek P, Herbst V, Woźniak M. Diagnostyka laboratoryjna boreliozy w środowisku pracowników leśnych. *Med Srod* 2013, 16(4): 16-25.
5. Zajkowska JM, Dunaj J. Borelioza z Lyme. Diagnostyka laboratoryjna, trudności i wyzwania. *Forum Zakażeń* 2013, 4(4): 241-249.
6. Diagnostyka i leczenie boreliozy z Lyme (choroby z Lyme). Wytyczne Niemieckiego Towarzystwa Boreliozy. Deutsche Borreliose-Gesellschaft e.V., Jena 2011. <http://www.borreliose-gesellschaft.de/Texte/Wytyczne.pdf> (22.03.2016).
7. Skotarczak B (red). Biologia molekularna patogenów przenoszonych przez kleszcze. PZWL, Warszawa 2006.
8. Fingerle V, Eiffert H, Gessner A, et al. MIQ 12 2017 Lyme-borreliose. [in:] Qualitätsstandards in der mikrobiologisch infektologischen Diagnostik. Podbielski A, Herrmann M, Kniehl E, et al (eds). Urban & Fischer, Munich 2000: 1-59.
9. Enders G. Die Labordiagnostik der Borreliose. <http://www.labor-enders.de/423.html> (15.01.2017).
10. Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004, 10(12): 1108-1132.
11. Wang G, van Dam AP, Schwartz I, Dankert J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato*: taxonomic, epidemiological and clinical Implications. *Clin Microbiol Rev* 1999, 12(4): 633-653.
12. Flisak R, Pancewicz S. Diagnostyka i leczenie Boreliozy z Lyme. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych, Warszawa 2011. <http://choroby-zakazne.pl/uploads/pdf/borelioza.pdf> (15.01.2017).
13. Probst C, Ott A, Schepers T, et al. N-terminal disulfide-bridging of *Borrelia* outer surface protein C increases its diagnostic and vaccine potentials. *Ticks Tick Borne Dis* 2012, 3(1): 1-7.
14. Wilske B. Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2003, 3(4): 215-227.
15. Zajkowska JM, Pancewicz SA, Grygorczuk S i wsp. Neuroborelioza – wybrane aspekty patogenety, diagnostyki i leczenia. *Pol Merk Lek* 2008, 24(143): 453-457.
16. Mogilyansky E, Loa CC, Adelson ME, et al. Comparison of Western Immunoblotting and the C6 Lyme Antibody Test for Laboratory Detection of Lyme Disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004, 11(5): 924-929.
17. Hauser U, Lehnert G, Wilske B. Validity of interpretation criteria for standardized Western Blots (Immunoblots) for serodiagnosis of Lyme Borreliosis based on sera collected throughout Europe. *J Clin Microbiol* 1999, 37(7): 2241-2247.
18. Hauser U, Lehnert G, Wilske B. Diagnostic value of proteins of three *Borrelia* species (*Borrelia burgdorferi sensu lato*) and implications for development and use of recombinant antigens for serodiagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998, 5(4): 456-462.
19. Smismans A, Goossens VJ, Nulens E, Bruggeman CA. Comparison of five different immunoassays for the detection of *Borrelia burgdorferi* IgM and IgG antibodies. *Clin Microbiol Infect* 2006, 12(7): 648-655.
20. Chmielewska-Badora J, Cisak E, Wójcik-Fatla A, et al. Correlation of tests for detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* infection in patients with diagnosed borreliosis. *Ann Agric Environ Med* 2006, 13(2): 307-311.
21. Ang CW, Notermans DW, Hommes M, et al. Large differences between test strategies for the detection of anti-*Borrelia* antibodies are revealed by comparing eight ELISAs and five immunoblots. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011, 30(8): 1027-1032.
22. Bakken LL, Callister SM, Wand PJ, Schell RF. Interlaboratory comparison of test results for detection of Lyme disease by 516 participants in the Wisconsin State Laboratory of Hygiene/College of American Pathologists Proficiency Testing Program. *J Clin Microbiol* 1997, 35(3): 537-543.
23. Brandenburg AH, van Dam AP, Schellekens J. Problems in comparing test strategies for detection of anti-*Borrelia* antibodies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011, 30(8): 1033-1034.
24. Leeflang MM, Ang CW, Berkhout J, et al. The diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis in Europe: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2016, 16: 140.
25. Cook MJ, Puri BK. Commercial test kits for the detection of Lyme borreliosis: a meta-analysis of test accuracy. *Int J Gen Med* 2016, 9: 427-440.