

*Maciej Kondrusik, Jerzy Daniluk, Teresa Hermanowska-Szpakowicz*

**PORÓWNANIE TESTÓW SEROLOGICZNYCH ELISA FIRM  
BIOMEDICA GES.M.B.H. I VIRO-IMMUN LABOR DIAGNOSTICA GMBH  
W DIAGNOSTYCE BORELIOZY (DONIESIENIE WSTĘPNE)**

Klinika Chorób Pasożytniczych i Neuroinfekcji Akademii Medycznej w Białymstoku  
Kierownik: prof. dr hab. *T. Hermanowska-Szpakowicz*

*W pracy przedstawiono wyniki uzyskane za pomocą dwóch testów ELISA do wykrywania przeciwciał IgM i IgG przeciwko *Borrelia burgdorferi*, wykonane w dwóch grupach badanych: 96 osób podejrzanych o boreliozę i 48 osób podających w wywiadzie liczne pokłucia przez kleszcze. Wykazano większą wykrywalność przeciwciał klasy IgM przy użyciu testu wykorzystującego rekombinowane antygeny krętka.*

Pierwszy w Polsce przypadek serologicznie potwierdzonej boreliozy został opisany w 1987 roku przez *Januszkiewicza* i *Kiedę* (3). Obecnie dzięki dużej dostępności komercyjnych testów diagnostycznych możliwa stała się wczesna diagnostyka choroby z Lyme, chociaż w wielu wątpliwych przypadkach interpretacja wyników nadal sprawia klinicystom wiele trudności.

Teoretycznie do potwierdzenia zakażenia *Borrelia burgdorferi* można użyć kilku metod:

1. techniki mikroskopowej (wykrycie krętków w badanym materiale) (6)
2. hodowli krętków z badanego materiału (4, 6)
3. ilościowych testów serologicznych wykrywających specyficzne przeciwciała IgM i IgG przeciwko *B. burgdorferi* (1)
4. jakościowych testów serologicznych wykrywających specyficzne przeciwciała IgM i IgG wykorzystujące technikę Western blot (2)
5. badania polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR).

Zarówno mikroskopowe badanie jak i hodowla nie są przeznaczone do rutynowej diagnostyki boreliozy. Mikroskopowa identyfikacja krętka wymaga specjalnej techniki barwienia preparatu, natomiast hodowla na pożywkach trwa do kilku tygodni z powodu długiego cyklu reprodukcyjnego bakterii.

Rutynowa diagnostyka boreliozy opiera się więc na określaniu poziomu specyficznych przeciwciał klasy IgM i IgG głównie we krwi, płynie mózgowo-rdzeniowym, płynie stawowym. Do najczęściej stosowanych metod należą: odczyn immunofluorescencji pośredniej (IF) oraz odczyn immunoenzymatyczny ELISA. W większości testów jako antygenów używa się „rozbitych” ultradźwiękami całych krętków *Borrelia*

*burgdorferi*, a różne ich szczepy służą do wzbogacania gamy antygenowej testów. Porównanie czułości i specyficzności oferowanych testów jest często ograniczone z powodu standaryzacji metod, różnie ustalanych wartości granicznych oraz różnic w próbkach kontrolnych służących do ustalania wartości przyjętych za negatywne.

Wyniki fałszywie ujemne w boreliozie mogą być skutkiem zbyt wczesnego badania tj. przed pojawieniem się swoistych przeciwciał lub też oznaczania przeciwciał tylko w surowicy w przypadku neuroboreliozy, gdzie przeciwciała mogą być obecne tylko w płynie mózgowo-rdzeniowym. Podwyższenie czułości testów możliwe jest poprzez zastosowanie techniki „wychytującej” specyficzne IgM oraz przez użycie izolowanych protein krętków jako antygenów (antygen rżęskowy 41 kDa odpowiada za wczesną produkcję IgM).

Fałszywie dodatnie wyniki obecności przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* w klasie IgM mogą dotyczyć pacjentów z dodatnim czynnikiem reumatoidalnym lub ostrą infekcją wirusem Epstein-Barr. Zakażenia innymi krętkami mogą dawać reakcje krzyżowe.

Testy Western blot wykazują większą specyficzność niż testy ELISA i są przeznaczone do weryfikacji wyników fałszywie dodatnich.

Technika PCR jest najczulszą metodą wykrywającą krętki *Borrelia burgdorferi* jednak ze względu na wysokie wymagania techniczne dostępność tego badania jest ograniczona.

Celem pracy była porównawcza ocena wykrywalności przeciwciał w klasie IgM i IgG przeciwko *Borrelia burgdorferi* przy pomocy dwóch rodzajów testów immunoenzymatycznych (ELISA): VIRO ELISA-Test anti-*Borrelia*-IgM i IgG oraz *Borrelia burgdorferi* IgM i IgG Recombinate Antigene.

## MATERIAŁ I METODY

Zbadano obecność przeciwciał IgM w 96 próbkach surowic uzyskanych od pacjentów podejrzanych o chorobę z Lyme, w tym 54 (56%) mężczyzn i 42 (44%) kobiet. Chorzy ci zgłaszali pokłucie przez kleszcze w okresie ostatnich dwóch miesięcy oraz w wielu przypadkach pojawienie się dolegliwości takich jak: stany gorączkowe, bóle głowy, stawów oraz obecność rumienia na skórze.

Poszukiwanie przeciwciał przeciwko *B. burgdorferi* wykonano w surowicy 48 pracowników leśnych – mężczyzn, którzy mimo że zgłaszali wielokrotne pokłucia przez kleszcze w ciągu ostatnich dwóch lat nie podawali dolegliwości, których wystąpienie łączyliby z tym faktem.

Obecność przeciwciał przeciwko *B. burgdorferi* IgM i IgG badano w surowicach równolegle przy użyciu dwóch rodzajów testów immunoenzymatycznych ELISA.

1. Test I-VIRO ELISA -Test anti *Borrelia*-IgM i IgG firmy Viro-Immun Labor Diagnostika GmbH, w którym rolę antygenów spełniały fragmenty krętków *Borrelia burgdorferi* – szczepów europejskich. Jakościowe oznaczenie przeciwciał IgM oraz ilościowe oznaczenie miana IgG wykonano według instrukcji producenta przy użyciu surowic rozcieńczonych 1:100, odczytując ekstynkcję próbek w spektrofotometrze firmy METERTECH Inc, przy długości fali 450 nm. Przy oznaczaniu miana IgG korzystano z diagramu wykreślonego na podstawie kontrolnych próbek surowic z danymi przez producenta mianami.

2. Test II – *Borrelia burgdorferi* IgM i IgG Recombinante Antigene firmy BIOMEDICA Ges.m.b.H gdzie wykorzystano antygeny rekombinowane uzyskane drogą inżynierii genetycznej. Dla testu IgM były dwa antygeny: p21Da (wykazujący czułość we wczesnej fazie zakażenia) oraz pochodny antygen p4Da-flageliny antygen p41 i kDa – uzyskany z wewnętrznej części flageliny. Natomiast w teście IgG, oprócz tych dwóch, zawarty był także antygen p100kDa (charakteryzujący się czułością w późnej fazie zakażenia). Ten jakościowy test ELISA został wykonany według zaleceń producenta przy użyciu próbek surowic w rozcieńczeniu 1:100, a ekstynkcja została odczytana przy pomocy spektrofotometru firmy METERECH Inc. przy długości fali 450 nm.

### WYNIKI I OMÓWIENIE

Wśród 96 pacjentów, którym wykonano oznaczenia przeciwciał IgM przeciwko *B. burgdorferi*, w 5 przypadkach stwierdzono dodatnie wyniki w obu testach, natomiast aż w 25 przypadkach dodatnie wyniki uzyskano przy użyciu zestawu II przy ujemnych wynikach przy zastosowaniu zestawu I. U wszystkich tych 25 chorych w powiązaniu z obrazem klinicznym rozpoznano boreliozę. U 21 chorych przebiegała ona jako *erythema chronicum migrans*, u 3 chorych rozpoznano *Lyme meningitis*, u 1-go chorego *Lyme arthritis*.

Wśród osób zgłaszających liczne pokłucia przez kleszcze w oznaczaniu przeciwciał IgG przeciwko *B. burgdorferi* w 2 przypadkach równolegle uzyskaliśmy dodatnie wyniki w dwóch testach; w 1 przypadku przy dodatnim wyniku w teście II wynik był ujemny w teście I oraz w 3 przypadkach przy ujemnym wyniku w teście II, w teście I stwierdzono wyniki dodatnie (tab. I).

Tabela 1. Porównanie wyników uzyskanych w teście I i II

Immunoglobuliny ELISA	Liczba badanych surowic	Wyniki dodatnie w teście I (%)	Wyniki dodatnie w teście II (%)	Dodatnie wyniki zgodne w obu testach
IgM	96	5 (5,2%)	30 (31,2%)	5 (5,2%)
IgG	48	3 (6,2%)	5 (10,4%)	2 (4%)

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu testu t-Studenta wykazując wyższą wykrywalność przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* IgM przy pomocy testu II, co przemawia za jego wyższą czułością, którą można wiązać z obecnością antygeny p21 pojawiającego się we wczesnej fazie zakażenia (1, 5). U wszystkich badanych chorych, u których wykryto obecność przeciwciał przeciwko *B. burgdorferi*, wykonano badania na obecność czynnika reumatoidalnego oraz czynnika WR (oznaczanego szybkim odczynem mikroflokulacyjnym z surowicą nieaktywną). Z przedstawionej analizy można wyciągnąć następujące wnioski:

– Uzyskane wyniki świadczą o większej czułości i swoistości testu wykorzystującego rekombinowane antygeny *Borrelia burgdorferi* do oznaczania przeciwciał IgM (*Borrelia burgdorferi* IgM Recombinante Antigene firmy BIOMEDICA) ponieważ

w 30 surowicach (31,2%) na 96 badanych wykazano obecność przeciwciał przeciwko *B. burgdorferi*, podczas gdy zestawem VIRO ELISA Test anti-*Borrelia*-IgM ich obecność była wykazywana w 5 (5,2%) przypadkach.

– Nie wykazano istotnej różnicy w wykrywalności przeciwciał przeciwko *B. burgdorferi* IgG między dwoma stosowanymi testami.

*M. Kondrusik, J. Daniluk, T. Hermanowska-Szapkowicz*

## THE COMPARISON OF TWO SEROLOGIC ELISA TESTS IN DIAGNOSIS OF LYME DISEASE

### SUMMARY

The purpose of this work was to evaluate detection of antibodies IgM and IgG against *B. burgdorferi*. We examined presence of IgM in 96 serum samples from patients suspected of Lyme disease. We looked for IgG in serum samples of 48 forest workers who submitted frequent tick bites in last two years. Among 96 patients whose sera were examined we had positive results in both tests in 5 cases and in 25 cases positive results were achieved only in test II. In 48 serum samples which we examined for presence of IgG in 2 cases positive results were in both tests, in 1 case positive in test II and negative in test I in 3 cases positive result in test I and negative in test II. According to these results we drew following initial conclusions: 1) obtained results testify better sensivity and specificity of test II which consists of recombinant antigenes of *Borrelia burgdorferi*, 2) no essential difference was shawn in detection IgG among two used tests.

### PIŚMIENICTWO

1. Callister S.M., Schell R.F., Case K.L.: J. Infect. Dis., 1993, 167, 158. – 2. Dressler F., Whalen J.A., Reinhard B.N.: J. Infect. Dis., 1993, 167, 392. – 3. Januszkiewicz J., Kieda A.: Przeg. Epid., 1987, 41, 327. – 4. Luger S.W., Krause E.: Arch. Intern. Med., 1990, 150, 761. – 5. Rahn D.W., Malawista S.E.: Ann. Intern. Med., 1991, 114, 472. – 6. Schwartz B.S., Goldstein M.D., Ribiero J.M.C.: JAMA, 1989, 262, 3431.

Adres: Klinika Chorób Pasożytniczych i Neuroinfekcji AMB,  
ul. Żurawia 14, 15-540 Białystok