

Praca oryginalna

EWA CISAK¹, JOLANTA CHMIELEWSKA-BADORA¹, JACEK ZWOLIŃSKI¹,
VIOLETTA ZAJĄC¹, ANGELINA WÓJCIK-FATLA¹, KRZYSZTOF
TOMASIEWICZ², JACEK DUTKIEWICZ¹

CHARAKTERYSTYKA TESTÓW WESTERN BLOT STOSOWANYCH
W DIAGNOSTYCE BORELIOZY U LUDZI

*CHARACTERISTICS OF WESTERN BLOT TESTS APPLIED IN BORELLIOSIS
DIAGNOSTICS IN HUMANS*

*ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТОВ WESTERN BLOT УПОТРЕБЛЯЕМЫХ В
ДИАГНОСТИКЕ КЛЕЩЕВОГО БОРРЕЛИОЗА У ЛЮДЕЙ*

*ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТІВ WESTERN BLOT ЗАСТОСОВАНИХ В
ДІАГНОСТИЦІ КЛІЩОВОГО БОРЕЛІОЗА У ЛЮДЕЙ*

¹Z Zakładu Biologicznych Szkodliwości Zawodowych Instytutu Medycyny Wsi w Lublinie
Kierownik Zakładu: dr N i m f a M . S t o j e k

Dyrektor Instytutu: prof. dr hab. n. med. L . W d o w i a k

²Z Kliniki Chorób Zakaźnych Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Kierownik Kliniki: prof. dr hab. n. med. R . M o d r z e w s k a

W pracy dokonano oceny porównawczej dwóch rodzajów testów Western blot stosowanych jako testy potwierdzające w dwustopniowej diagnostyce boreliozy u ludzi.

SŁOWA KLUCZOWE: borelioza, trudności diagnostyczne, test ELISA, testy Western blot, antygeny rekombinowane, pełne ekstrakty antygenowe.

KEY WORDS: borreliosis, diagnostic difficulties, ELISA test, Western blot tests, recombinant antigens, complete antigen extracts.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: клещевой боррелиоз, диагностические сложности, тест ELISA, тесты Western blot, рекомбинантные антигены, полные антигенные экстракты.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: кліщовий борреліоз, діагностичні складнощі, тест ELISA, тесту Western blot, рекомбінантні антигени, повні антигенні екстракти.

Podstawowym kryterium rozpoznania boreliozy z Lyme jest obecność określonych objawów klinicznych potwierdzona wywiadem epidemiologicznym i wynikiem badania laboratoryjnego. Odpowiednio dobrane metody laboratoryjne oraz poprawna interpretacja wyników badań warunkują prawidłowe rozpoznanie choroby z Lyme. Duża różnorodność antygenowa występującego w Europie krętka *Borrelia burgdorferi* s.lato, czynnika etiologicznego boreliozy, jest między innymi przyczyną trudności związanych z diagnostyką laboratoryjną

tej choroby, ponieważ testy przeznaczone do wykrywania swoistych przeciwciał mogą zawierać w swym składzie antygeny pochodzące z genogatunków *B. burgdorferi*, które na terenie osób diagnozowanych nie występują lub z gatunków genomowych, które mogą wywołać reakcje nieswoiste. Fakt ten, może być w niektórych przypadkach przyczyną nadrozpoznawalności lub nierozpoznawalności boreliozy [2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 14, 15, 17].

Według nowoczesnych standardów europejskich, przyjętych w 2005 roku, diagnostyka laboratoryjna boreliozy powinna być procesem dwustopniowym w którym w pierwszym etapie stosuje się test przesiewowy o dużej czułości (np. test ELISA), co stwarza możliwość uzyskania wyników fałszywie dodatnich, a w drugim etapie jakościowy test potwierdzający o wysokiej swoistości - Western blot (WB). Dodatni wynik uzyskany w teście ELISA oznacza jedynie prawdopodobieństwo zakażenia *Borrelia burgdorferi* i zawsze powinien być potwierdzany testem WB [3, 5, 6, 7, 14, 15, 16].

Testy Western blot przeznaczone do diagnostyki laboratoryjnej boreliozy mogą zawierać w swoim składzie pełne, natywne lizaty bakteryjne *B. burgdorferi* jak również celowo syntetyzowane antygeny rekombinowane otrzymane metodami inżynierii genetycznej.

Do frakcji antygenowych mających znaczenie w diagnostyce immunologicznej boreliozy należą między innymi: OspC - wysoko immunogenne białko powierzchniowe, które jest markerem wczesnej odpowiedzi immunologicznej w klasie przeciwciał IgM oraz VlsE-plazmidowe białko składające się z regionów genetycznie zmiennych i stałych z wysoko immunogennym regionem C6 stanowiące główny marker odpowiedzi immunologicznej w klasie IgG [5, 8, 9, 14, 16, 18].

CEL BADAŃ

Celem badań była próba oceny dwóch rodzajów komercyjnych testów Western blot, stosowanych jako testy potwierdzające w rutynowej diagnostyce boreliozy u ludzi.

MATERIAŁ I METODY

W celu określenia zgodności jakościowej testów ELISA i Western blot zbadano:

- 80 surowic pacjentów z podejrzeniem boreliozy zbadanych w testach ELISA IgM i ELISA IgG (Bellco Biomedica, Austria), zbadano testami Western blot IgM i Western blot IgG (*Borrelia recom blot*, Mikrogen, Niemcy), które zawierały w swym składzie wyłącznie rekombinowane frakcje antygenowe (w skrócie: WB IgM RA, WB IgG RA).

- 80 surowic pacjentów z podejrzeniem boreliozy, które zbadano testami ELISA IgM i IgG (Bellco, Biomedica, Austria) oraz Western blot IgM i Western blot IgG (Euroline *Borrelia WB*, Euroimmun, Niemcy) z frakcjami antygenowymi pochodzącymi z pełnych natywnych ekstraktów komórkowych

Borrelia burgdorferi i jedną frakcją rekombinowaną (w skrócie: WB IgM PA, WB IgG PA).

- 49 surowic pacjentów z rozpoznaną boreliozą, którzy byli diagnozowani w Klinice Chorób Zakaźnych AM w Lublinie oraz w Przychodni IMW w Lublinie, zbadanych testami ELISA IgM i IgG (Bellco Biomedica, Austria), zbadano równoległe obydwoma testami Western blot IgM i Western blot IgG (*Borrelia recom blot*, Mikrogen, Niemcy i Euroline *Borrelia WB*, Euroimmun, Niemcy).

Wyniki badań testu Western blot z antygenem rekombinowanym odczytywano wizualnie, w odniesieniu do paska kontrolnego, a testu Western blot z pełnym lizatem komórkowym przy pomocy programu komputerowego połączonego ze skanerem. Rozkład wyników badań laboratoryjnych badany był testem χ^2 .

WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Porównując ze sobą test ELISA i testy Western blot oceniano zgodność jakościową, czyli proporcję sumy wyników badań zgodnie ujemnych, zgodnie granicznych i zgodnie dodatnich w stosunku do wszystkich wykonanych badań.

Zgodność wyników dodatnich, granicznych i ujemnych w testach ELISA IgM i Western blot IgM RA wykazano w 42 (52,5%) spośród 80 surowic badanych pacjentów. W klasie przeciwciał IgG zgodność jakościowa ELISA i WB IgG RA była znacznie wyższa i wyniosła 78,7% (tab.I). Porównując wyniki badań w testach ELISA IgM i WB IgM PA, stwierdzono, że zgodność jakościowa tych testów wynosi 52,5%, a w przypadku ELISA IgG i WB IgG PA - 72,5% (tab. II). Rozkład wyników był statystycznie istotny dla ELISA IgG i WB IgG RA oraz ELISA IgG i WB IgG PA ($p < 0,00001$).

Analogiczne porównania przeprowadzone na próbie badań 49 pacjentów z rozpoznaną boreliozą, pokazały podobne wartości dla ELISA IgM i WB IgM RA (63,3%) i ELISA IgG i WB IgG RA (77,6%) oraz ELISA IgM i WB IgM RA (51,0%) i ELISA IgG i WB IgG RA (75,5%). Natomiast zgodność jakościowa testów Western blot wyniosła 69,4% ($p < 0,001$) w klasie IgM oraz 77,6% ($p < 0,00001$) w klasie IgG (tab. III, IV). Z punktu widzenia diagnostyki laboratoryjnej powyższe testy wykazały niską zgodność jakościową.

Tabela I. Wyniki testów ELISA i Western blot RA w surowicach 80 pacjentów z podejrzeniem boreliozy

Table I. Results of ELISA test and Western blot RA in plasma of 80 patients with the suspicion of borreliosis

Таблица I. Результаты тестов ELISA и Western blot RA в сыворотках 80 пациентов с подозрением клещевого боррелиоза

Таблиця I. Результати тестів ELISA та Western blot RA в сироватках 80 пацієнтів з підозрою на кліщовий бореліоз

| Western blot IgM RA | | | | | |
|---------------------|-------------|-------------|-----------|-------------|-------------|
| ELISA IgM | wynik testu | dotatni | graniczny | ujemny | razem |
| | dotatni | 27 (33,75%) | 4 (5,0%) | 11 (13,75%) | 42 (52,5%) |
| | graniczny | 4 (5,0%) | 1 (1,25%) | 4 (5,0%) | 9 (11,25%) |
| | ujemny | 13 (16,25%) | 2 (2,5%) | 14 (17,5%) | 29 (36,25%) |
| | razem | 44 (55,0%) | 7 (8,75%) | 29 (36,25%) | 80 (100%) |
| Western blot IgG RA | | | | | |
| ELISA IgG | wynik testu | dotatni | graniczny | ujemny | razem |
| | dotatni | 28 (35,0%) | 1 (1,25%) | 3 (3,75%) | 32 (40,0%) |
| | graniczny | 1 (1,25%) | 0 (0%) | 1 (1,25%) | 2 (2,5%) |
| | ujemny | 9 (11,25%) | 2 (2,5%) | 35 (43,75%) | 46 (57,5%) |
| | razem | 38 (47,5%) | 3 (3,75%) | 39 (48,75%) | 80 (100%) |

Tabela II. Wyniki testów ELISA i Western blot PA w surowicach 80 pacjentów z podejrzeniem boreliozy

Table II. Results of ELISA test and Western blot PA in plasma of 80 patients with the suspicion of borreliosis

Таблиця II. Результати тестів ELISA та Western blot PA в сироватках 80 пацієнтів з підозрою на кліщовий бореліоз

Таблиця II. Результати тестів ELISA та Western blot PA в сироватках 80 пацієнтів з підозрою на кліщовий бореліоз

| Western blot IgM PA | | | | | |
|---------------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| ELISA IgM | wynik testu | dotatni | graniczny | ujemny | razem |
| | dotatni | 19 (23,7%) | 4 (5,0%) | 28 (35,0%) | 51 (63,7%) |
| | graniczny | 1 (1,25%) | 0 (0%) | 2 (2,5%) | 3 (3,7%) |
| | ujemny | 3 (3,75%) | 0 (0%) | 23 (28,7%) | 26 (32,5%) |
| | razem | 23 (28,7%) | 4 (5,0%) | 53 (66,2%) | 80 (100%) |
| Western blot IgG PA | | | | | |
| ELISA IgG | wynik testu | dotatni | graniczny | ujemny | razem |
| | dotatni | 15 (28,7%) | 5 (6,2%) | 0 (0%) | 20 (25%) |
| | graniczny | 2 (2,5%) | 1 (1,2%) | 0 (0%) | 3 (3,75%) |
| | ujemny | 10 (12,5%) | 5 (6,2%) | 42 (52,5%) | 57 (71,2%) |
| | razem | 27 (33,7%) | 11 (13,7%) | 42 (52,5%) | 80 (100%) |

Analizując szczegółowo wyniki badań 49 pacjentów z rozpoznaną boreliozą, wykazano, że 11 surowic pacjentów reagujących ujemnie w ELISA IgM, reagowało zgodnie ujemnie w obu testach Western blot (tab. III), co świadczy o tym, że zastosowany test ELISA IgM jest testem czułym i nie pojawiają się w nim wyniki fałszywie ujemne. Natomiast możliwość występowania wyników fałszywie dodatnich została potwierdzona, gdy w 29 surowicach pacjentów reagujących dodatnio w ELISA IgM, stwierdzono 8 wyników zgodnie ujemnych w obu testach Western blot. Ponadto w surowicach 9 pacjentów z wynikiem wątpliwie dodatnim (granicznym) w ELISA IgM, zanotowano 5 wyników zgodnie ujemnych w dwóch testach Western blot, co potwierdza wysoką czułość i możliwość występowania wyników nieswoiście dodatnich w ELISA IgM. Takie niezgodne reakcje sugerujące wynik fałszywie dodatni obserwowano częściej w teście Western blot IgM z antygenem pełnym, niż w Western blot IgM z antygenem rekombinowanym (tab. III).

Tabela. III. Porównanie wyników badań testów WB IgM RA i WB IgM PA w odniesieniu do ELISA IgM w surowicach 49 pacjentów ze zdiagnozowaną boreliozą

Table III. Comparison of results of tests: WB IgM RA and WB IgM PA with respect to ELISA IgM in plasma of 49 patients with the diagnosis of borreliosis

Таблица III. Сравнение результатов исследований тестов WB IgM RA и WB IgM PA относительно ELISA IgM в сыворотках 49 пациентов с диагностируемым клещевым боррелиозом

Таблиця III. Порівняння результатів досліджень тестів WB IgM RA і WB IgM PA щодо ELISA IgM в сироватках 49 пацієнтів з підтвердженим кліщовим борреліозом

| WB IgM PA | | | | | |
|-----------------|-------------|---------|-----------|--------|-------|
| ELISA IgM (-) | | Dodatni | Graniczny | ujemny | razem |
| WB IgM RA | dodatni | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | graniczny | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | ujemny | 0 | 0 | 11 | 11 |
| | razem | 0 | 0 | 11 | 11 |
| ELISA IgM (+/-) | | Dodatni | Graniczny | ujemny | razem |
| WB IgM RA | dodatni | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | graniczny | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | ujemny | 0 | 2 | 5 | 7 |
| | razem | 0 | 2 | 7 | 9 |
| ELISA IgM (+) | wynik testu | Dodatni | Graniczny | ujemny | Razem |
| WB IgM RA | dodatni | 10 | 3 | 6 | 19 |
| | graniczny | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | ujemny | 2 | 0 | 8 | 10 |
| | razem | 12 | 3 | 14 | 29 |

Spośród 27 surowic pacjentów wykazujących wynik ujemny w teście ELISA IgG tylko szesnaście reagowało zgodnie ujemnie w obydwu testach Western blot

natomiast 4 surowice - zgodnie dodatnio (tab.IV) co oznacza, że oba testy Western blot IgG wykazały większą czułość niż test ELISA IgG, i że istnieje możliwość wystąpienia wyników fałszywie ujemnych w ELISA IgG. Spośród 21 surowic z dodatnim wynikiem w ELISA IgG, 18 wykazało reakcje pozytywne w WB IgG RA i 18 w WB IgG PA, 16 reagowało zgodnie dodatnio, a w jednej surowicy z granicznym wynikiem ELISA IgG uzyskano wynik dodatni zarówno w WB IgG RA jak i WB IgG PA (tab. IV).

Tabela. IV. Porównanie wyników badań testów WB IgG RA i WB IgG PA w odniesieniu do ELISA IgG w surowicach 49 pacjentów ze zdiagnozowaną boreliozą

Table IV. Comparison of results of tests: WB IgM RA and WB IgM PA with respect to ELISA IgG in plasma of 49 patients with the diagnosis of borreliosis

Таблица IV. Сравнение результатов исследований тестов WB IgG RA и WB IgG PA относительно ELISA IgG в сыворотках 49 пациентов с диагностируемым клещевым боррелиозом

Таблиця IV. Порівняння результатів досліджень тестів WB IgG RA і WB IgG PA щодо ELISA IgG в сироватках 49 пацієнтів з підтвердженим кліщовим борреліозом

| WB IgG PA | | | | | |
|---------------|-----------|---------|-----------|--------|-------|
| ELISA IgG (-) | | Dodatni | Graniczny | ujemny | razem |
| WB IgG RA | dodatni | 4 | 0 | 3 | 7 |
| | graniczny | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | ujemny | 1 | 3 | 16 | 20 |
| | razem | 5 | 3 | 19 | 27 |
| ELISA IgG (+) | | Dodatni | Graniczny | ujemny | razem |
| WB IgG RA | dodatni | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | graniczny | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | ujemny | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | razem | 1 | 0 | 0 | 1 |
| ELISA IgG (+) | | Dodatni | Graniczny | ujemny | Razem |
| WB IgG RA | dodatni | 16 | 1 | 1 | 18 |
| | graniczny | 2 | 1 | 0 | 3 |
| | ujemny | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | razem | 18 | 2 | 1 | 21 |

Tabela V. Wyniki badań 49 pacjentów z rozpoznaniem boreliozy w testach: ELISA i Western blot w zależności od postaci choroby

Table V. Results of examinations of 49 patients with diagnosis of borreliosis by ELISA and Western blot tests according to the form of the disease

Таблиця V. Результати досліджень 49 пацієнтів з розпознаним клещевим борреліозом в тестах: ELISA і Western blot в залежності від форми болезни

Таблиця V. Результати досліджень 49 пацієнтів з підтвердженим кліщовим бореліозом в тестах: ELISA та Western blot в залежності від форми хвороби

| Liczba badanych | Postać boreliozy | ELISA IgM + | ELISA IgG + | WB IgM ra + i +/- | WB IgG ra + i +/- | WB IgM pa + i +/- | WB IgG pa + i +/- |
|-----------------|------------------|-------------|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 41 | stawowa | 32 | 22 | 19 | 27 | 15 | 26 |
| 15 | skórna | 14 | 5 | 9 | 6 | 4 | 8 |
| 8 | inna* | 6 | 3 | 3 | 5 | 2 | 5 |
| 49** | ogółem | 38 | 22 | 21 | 29 | 17 | 29 |

* 6 pacjentów z neuroboreliozą, 1 pacjent z postacią kardiologiczną i 1 pacjent z postacią oczną

** liczba badanych ogółem jest niższa niż suma poszczególnych postaci, ponieważ pacjenci wykazywali więcej niż jedną postać chorobową

Jak wynika z tabeli V, u pacjentów u których zdiagnozowano boreliozę z Lyme (postać stawową, skórą, i neurologiczną) w badaniach serologicznych wyniki dodatnie stwierdzano najczęściej w klasie przeciwciał IgM. Reakcje te częściej potwierdzano w teście Western blot IgM z antygenem rekombinowanym niż w teście Western blot IgM z pełnym ekstraktem komórkowym jako antygenem.

Analizując wyniki badań pacjentów z postacią stawową boreliozy i zakładając, że występuje ona w późniejszych stadiach choroby z Lyme, należałoby oczekiwać, że większość wyników dodatnich powinna pojawić się w klasie przeciwciał IgG, podczas gdy w przeprowadzonych badaniach spośród 41 pacjentów z *Lyme arthritis* 32 reagowało dodatnio w ELISA IgM, z czego 19 potwierdzono w WB IgM RA, a 15 w WB IgM PA, co świadczy, że testy Western blot były bardziej swoiste niż test ELISA i że test WB IgM z antygenem rekombinowanym (RA) był bardziej czuły niż test WB IgM z pełnym lizatem (PA) jako antygenem, przez co mógł być mniej swoisty.

Immunoglobuliny klasy IgG wykryto w teście ELISA u 22 pacjentów ze zmianami stawowymi, a w testach WB IgG RA i WB IgG PA odpowiednio w 27 i 26 przypadkach. Fakt ten wskazuje na możliwość wystąpienia reakcji fałszywie ujemnych w ELISA IgG i o konieczności potwierdzenia wyników negatywnych uzyskanych w ELISA IgG testem Western blot.

U 15 pacjentów ze skórą postacią boreliozy (*erythema migrans*) pojawiająca się w pierwszym okresie zakażenia, wykazano 14 reakcji dodatnich w ELISA IgM, z których 9 potwierdzono w WB IgM RA i tylko 4 w IgM PA, co może sugerować niższą czułość testu WB IgM z pełnym lizatem komórkowym jako antygenem w porównaniu z WB IgM ra.

Fracja VlsE jest dobrym markerem obecności przeciwciał IgG w testach WB IgG RA i WB IgG PA, natomiast frakcja OspC jest znacznie lepszym wskaźnikiem przeciwciał IgM w teście WB IgM RA niż w WB IgM PA (tab. VI).

Tabela VI. Wyniki badań testów Western blot z uwzględnieniem podstawowych frakcji OspC i VlsE charakterystycznych dla wczesnej i późnej odpowiedzi immunologicznej

Table VI. Results of examinations with Western blot tests with consideration of basic OspC i VlsE fractions characteristic of early and late immune response

Таблица VI. Результаты исследований тестов Western blot с учетом основных фракций OspC и VlsE характерных для раннего и позднего иммунологического ответа

Таблиця VI. Результати досліджень тестів Western blot з врахуванням основних фракцій OspC i VlsE характерних для ранньої і пізньої імунологічної відповіді

| | Liczba zbadanych | Liczba dodatnich i granicznych | Liczba dodatnich we frakcji VlsE |
|---------------------|------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Western blot IgG RA | 49 | 29 | 19 |
| Western blot IgG PA | 49 | 29 | 17 |
| | Liczba zbadanych | Liczba dodatnich i granicznych | Liczba dodatnich we frakcji OspC |
| Western blot IgM RA | 49 | 21 | 17 |
| Western blot IgM PA | 49 | 17 | 4 |

W ostatnich latach stwierdzono, że po wprowadzeniu do diagnostyki laboratoryjnej boreliozy testów opartych na rekombinowanym konserwatywnym białku C6, wchodzącym w skład antygeny VlsE, który jest głównym białkiem z ekspresją *in vivo*, poprawiła się znacznie swoistość tych testów jak również zwiększyła możliwość wykrywania *B. burgdorferi* o dużej zmienności antygenowej [1, 9, 10, 11, 16, 18, 19]. Wysoką wartość diagnostyczną rekombinowanej frakcji VlsE jako markera zakażeń *B. burgdorferi* wykazano w pracach z wielu europejskich ośrodków naukowych [1, 9, 11, 18, 19].

W badaniach własnych stwierdzono, że VlsE jest dobrym markerem obecności przeciwciał klasy IgG w późnych okresach boreliozy. Lencakova i wsp. obserwowali, że testy Western blot z antygenami proteinowymi VlsE posiadają wysoką czułość w wykrywaniu przeciwciał IgG u pacjentów z *Lyme arthritis*, oraz to, że frakcja antygenowa VlsE wspólnie z OspC są użyteczne przy wykrywaniu przeciwciał klasy IgM u pacjentów z rumieniem wędrującym [9].

Podobnie Zajkowska i wsp. stwierdzili, że testy Western blot wykrywające przeciwciała przeciwko VlsE w obu klasach może mogą mieć zastosowanie jako testy weryfikujący zarówno we wczesnej jak i późnej postaci boreliozy [18, 19]. Z kolei Aguero-Rosenfeld i wsp. oraz Liang i wsp. wskazują wysoką czułość VlsE u pacjentów z neuroboreliozą oraz w późnych stadiach choroby z Lyme [1, 10]. Wyniki badań własnych pacjentów z rozpoznaniem wczesnej

fazy boreliozy (rumienia wędrującego) wykazały, że w teście Western blot rekombinowane białko antygenowe OspC jest dobrym wskaźnikiem obecności immunoglobulin IgM. Wniosek ten potwierdzają badania *Aguero-Rosenfeld* i wsp., *Jobe* i wsp. oraz *Mathiesen* i wsp. [1, 8, 13].

WNIOSKI

1. Oceniane testy Western blot IgM i Western blot IgG, różniące się między sobą rodzajem zastosowanego antygeny, przeznaczone do potwierdzania wyników badań uzyskanych w teście ELISA, nie wykazały między sobą dostatecznie wysokiej zgodności wyników badań.

2. Oceniane testy Western blot IgM są bardziej swoiste w porównaniu do ELISA IgM, natomiast Western blot IgG są bardziej czułe niż ELISA IgG.

3. Test Western blot IgM wyprodukowany na bazie antygenów rekombinowanych jest testem bardziej czułym niż test Western blot IgM z pełnym ekstraktem komórkowym jako antygenem, przez co może być mniej swoisty niż test WB IgM PA.

4. Test Western blot IgM z pełnym ekstraktem komórkowym jest testem swoistym, jednak może być niewystarczająco czuły, aby potwierdzić dodatni wynik w ELISA IgM.

5. Istnieje konieczność prowadzenia dwustopniowej diagnostyki boreliozy także w przypadku wyników ujemnych w teście ELISA w klasie IgG.

6. Testy Western blot wykrywające przeciwciała klasy IgG w późniejszych stadiach zakażenia mają większą wartość diagnostyczną w porównaniu z testami Western blot wykrywającymi przeciwciała IgM w świeżej infekcji.

7. Wprowadzenie do badań rutynowych boreliozy testów Western blot jako testów potwierdzających nie rozwiązuje całkowicie problemów diagnostyki laboratoryjnej choroby z Lyme, a interpretacja wyników badań serologicznych powinna być powiązana z charakterystyką objawów klinicznych.

E. Cisak, J. Chmielewska-Badora, J. Zwoliński, V. Zając, A. Wójcik-Fatla, K. Tomaszewicz, J. Dutkiewicz

CHARACTERISTICS OF WESTERN BLOT TESTS APPLIED IN BORELLIOSIS DIAGNOSTICS IN HUMANS

Summary

Two types of commercial Western blot tests were evaluated, applied as confirmatory tests in the diagnostics of borreliosis in humans, i.e. tests containing exclusively recombinant antigen fractions and tests with antigen fractions from complete lysates and one recombinant fraction.

It was found that Western blot tests IgM produced on the basis of recombinant antigens is a more sensitive test, compared to Western blot test IgM with complete antigen extract. The study showed that, irrespective of the type of antigen applied, Western blot tests detecting IgG antibodies at later stages of the disease have a greater diagnostic value, compared to Western blot tests detecting antibodies in fresh infection. It was also confirmed that it is necessary to perform two-stage laboratory diagnostics for borreliosis in the case of negative results obtained in ELISA IgG test.

Е. Чисак, Е. Хмелевска-Бадора, Я. Зволинські, В. Зайонц,
А. Вуйчик-Фатля, К. Томасевич, Я. Дуткевич

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТОВ WESTERN BLOT УПОТРЕБЛЯЕМЫХ В ДИАГНОСТИКЕ КЛЕЩЕВОГО БОРРЕЛИОЗА У ЛЮДЕЙ

Аннотация

В работе проведена оценка двух видов коммерческих тестов Western blot, которые употребляются как подтверждающие тесты в диагностике клещевого боррелиоза у людей, т.е. тестов, которые содержат в своем составе исключительно рекомбинантные антигенные фракции, а также тестов с антигенными фракциями, которые получены из клеточных лизатов и одной рекомбинантной фракции.

Подтверждено, что тест Western blot IgM, выработанный на базе рекомбинантных антигенов, является тестом, более чувствительным чем тест Western blot IgM с полным антигенным экстрактом а также, что тесты Western blot, независимо от вида используемого антигена антигела класса IgG, которые обнаруживают, в более поздних стадиях болезни, имеют большую диагностическую весомость по сравнению с тестами Western blot, которые обнаруживают антитела в свежей инфекции. Показана также необходимость ведения двухступенчатой лабораторной диагностики клещевого боррелиоза в случае отрицательных результатов, полученных в тесте ELISA в классе IgG.

Е. Чісак, Е. Хмелевска-Бадора, Я. Зволінські, В. Зайонц, А. Вуйчік-Фатля,
К. Томасевич, Я. Дуткевіч

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТІВ WESTERN BLOT ЗАСТОСОВАНИХ В ДІАГНОСТИЦІ КЛІЩОВОГО БОРЕЛІОЗА У ЛЮДЕЙ

Анотація

У роботі проведена оцінка двох видів комерційних тестів Western blot, які вживаються, як підтвердуючі тести в діагностиці кліщового борреліоза у людей, тобто тестів, які містять в своєму складі виключно рекомбінантні антигенні фракції, а також тестів з антигенними фракціями, які отримуються з клітинних лізатів і однієї рекомбінантної фракції.

Підтверджено, що тест Western blot IgM, вироблений на базі рекомбінантних антигенів, є тестом, чутливішим чим тест Western blot IgM з повним антигенним екстрактом а також, що тести Western blot, незалежно від вигляду використовуваного антигена антитіла класу IgG, які виявляють, в пізніших стадіях хвороби, мають велику діагностичну ваговитість в порівнянні з тестами Western blot, які виявляють антитіла в свіжій інфекції. Показана також необхідність введення двоступінчатої лабораторної діагностики кліщового борреліоза у разі негативних результатів, отриманих в тесті ELISA в класі IgG.

PIŚMIENICTWO

1. Agüero-Rosenfeld M.E., Wang G., Schwartz I., Wormser G.P.: Diagnosis of Lyme borreliosis. J. Clin. Microbiol. 2005, 18, 484-509.
2. Binnicker M.J., Jespersen D.J., Harring J.A., Rollins L.O., Bryant S.C., Beito E.M.: Evaluation of two commercial systems for the automated processing, reading and interpretation of Lyme Western blots. J. Clin. Microbiol. 2008, 46, 2216-2221.
3. Brunner M.: New method for detection *Borrelia burgdorferi* antigen complexed to antibody in seronegative Lyme disease. J. Immunol. Methods 2001, 249, 185-190.

4. Chmielewska-Badora J., Cisak E., Wójcik-Fatla A., Zwoliński J., Buczek A., Dutkiewicz J.: Correlation of tests for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in patients with diagnosed borreliosis. Ann. Agric. Environ. Med. 2006, 13, 307-311.

5. Cisak E.: Mechanizmy patogenetyczne *Borrelia burgdorferi* w aspekcie nowoczesnej diagnostyki laboratoryjnej boreliozy z Lyme. Med. Ogólna 2006, 12, 151-157.

6. Gąsiorowski J., Witecka-Knysz E., Knysz B., Gerber H., Gładysz A.: Diagnostyka boreliozy. Med. Pracy 2007, 58, 439-447.

7. Hauser U., Lehnert G., Lobentanzer R., Wilske B.: Interpretation criteria for standardized Western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. J. Clin. Microbiol. 1997, 35, 1433-1444.

8. Jobe D.A., Lovrich S.D., Asp K.E., Mathiason M.A., Albrecht S.E., Schell R.F., Callister S.M.: Significantly improved accuracy of diagnosis of early Lyme disease by peptide enzyme-linked immunosorbent assay based on the borreliacid antibody epitope of *Borrelia burgdorferi* OspC. Clin. Vaccine Immunol. 2008, 15, 981-985.

9. Lenčáková D., Fingerle V., Štefančíková A., Schulte-Spechtel U., Peřko B., Schręter I., Wilske B.: Evaluation of recombinant line immunoblot for detection of Lyme disease in Slovakia: comparison with two other immunoassays. Vector-Borne Zoon. Dis. 2008, 8, 381-390.

10. Liang F.T., Steere A.C., Marques A.R., Johnson B.J.B., Miller J.N., Philipp M.T.: Sensitive and specific serodiagnosis of Lyme disease by enzyme-linked immunosorbent assay with a peptide based on an immunodominant conserved region of *Borrelia burgdorferi* VlsE. J. Clin. Microbiol. 1999, 37, 3990-3996.

11. Marangoni A., Sparacino M., Mondardini V., Cavrini F., Storni E., Donati M., Cevenini R., Sambri V.: Comparative evaluation of two enzyme linked immunosorbent assay methods and three Western Blot methods for the diagnosis of culture confirmed early Lyme borreliosis in Italy. The New Microbiologica 2005, 28, 37-43.

12. Marangoni A., Moroni A., Accardo S., Cevenini R.: *Borrelia burgdorferi* VlsE antigen for the serological diagnosis of Lyme borreliosis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 2008, 27, 349-354.

13. Mathiesen M.J., Christiansen M., Hansen K., Holm A., Åsbrink E., Theisen M.: Peptide-based OspC enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of Lyme borreliosis. J. Clin. Microbiol. 1998, 36, 3474-3479.

14. Ořdak E., Sulik A., Rořkiewicz D.: Znaczenie testu immunoblot w diagnostyce boreliozy u dzieci. Przegł. Epidemiol. 2008, 62, supl.1, 83-87.

15. Robertson J., Guy E., Andrews N., Wilske B., Anda P., Granstrřm M., Hauser U., Moosmann Y., Sambri V., Schellekens J., Stanek G., Gray J.: A European multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of Lyme borreliosis. J. Clin. Microbiol. 2000, 38, 2097-2102.

16. Tylewska-Wierzbanowska S., Chmielewski T.: Diagnostyka serologiczna boreliozy - wytyczne europejskie. Post. Mikrobiol., 2005, 44, 289-293.

17. Witecka-Knysz E., Klimczak M., Lakwa K., Zajkowska J., Pancewicz S., Kondrusik M., Grygorczuk S., Świerzbińska R., Hermanowska-Szpakowicz T.: Borelioza: dlaczego diagnostyka jest taka trudna? Diagnosta laboratoryjny, 2007, 5(1), 11-13.

18. Zajkowska J., Kondrusik M., Pancewicz S., Grygorczuk S., Świerzbińska R., Hermanowska-Szpakowicz T., Czeczuga A., Sienkiewicz I.: Test Western blot z białkiem VlsE oraz antygenami "in vivo" w diagnostyce boreliozy z Lyme. Przegł. Epidemiol. 2006, 60, supl. 1, 177-185.

19. Zajkowska J.M., Kondrusik M., Pancewicz S.A., Grygorczuk S., Jamiołkowski J., Stalewska J.: Porównanie wyników testu

VlsE (C6) oraz testów z zastosowaniem antygenów rekombinowanych u chorych na boreliozę z Lyme. *Pol. Merk. Lek.* 2007, 134, 95-99.

Data otrzymania: 20.03.2009.

Adres Autorów: 20-090 Lublin, ul. Jaczewskiego 2, Zakład Biologicznych Szkodliwości Zawodowych, Instytut Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki w Lublinie.