

Microarray alapú Borrelia szerodiagnosztika: lehetőségek és kihívások



Zóka András, Baráth András, Bacsó Jennifer, Bekő Gabriella

Dél-pesti Centrumkórház, Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet, Központi Laboratórium, Budapest

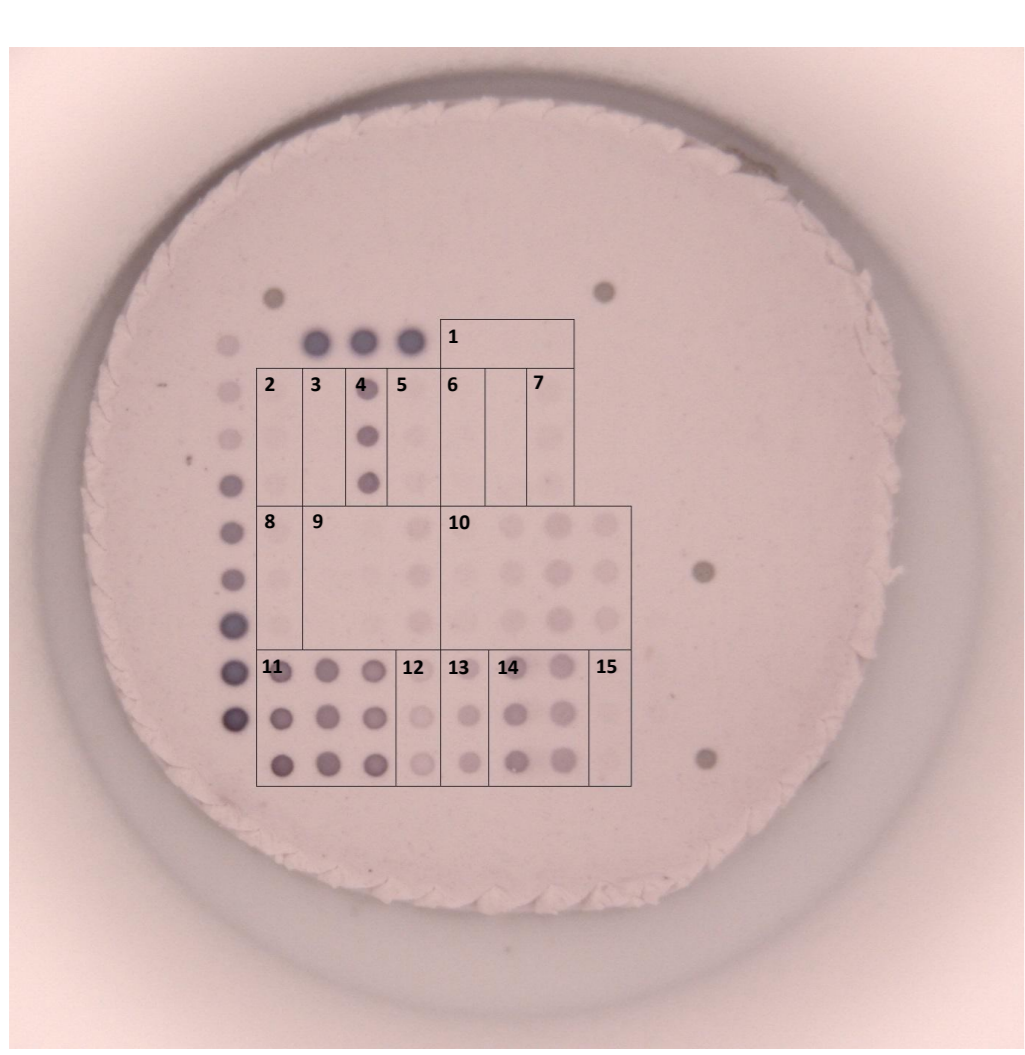
A rekombináns antigének átalakították a tesztelés gyakorlatát. A teljes sejt lizátuma csak az adott speciest fedi tökéletesen¹, és tartalmazza az aspecifikus antigéneket. Így az érzékenység csak a fajlagosság kárára növelhető, korlátozottan. Az in vitro tenyésztésben nem expresszált VlsE az egyik legérzékenyebb, specifikus, a *Borrelia* speciestek között kiválóan keresztreakáló antigénnek bizonyult¹. A rekombináns ELISA-k lehetővé tették a VlsE, illetve a rosszul keresztreakáló antigének közül több species alkalmazását, az aspecifikus antigéneket elhagyását. A megerősítés feladata a valós és fals pozitívítás elkülönítése helyett inkább a pozitívítás részleteinek meghatározása lett. A rekombináns megerősítő vizsgálatok új generációját jelenti a microarray, amely nagyszámú antigén, illetve kórokozó-panelek vizsgálatát is lehetővé teszi. A nitrocellulóz membránok a 96 well-es lemezek well-jeiben fekszenek, a kivitelezés megegyezik az ELISA esetén megszokottal. Munkánk célja a TestLine microblot array jellemzése.

Betegek módszerek

Szeropozitív (Mikrogen RecomLine, Mikrogen GmbH, Neuried, Németország), kullancsexpozíciónak kitett és/vagy típusos erythema migrans-t (EM) észlelő személyek mintáit (n=62), 15 savópárt (Mikrogen: 4 progresszor, 4 regresszor, 7 változatlan) és 10 syphiliten átesett, TPHA és RPR (<1:4) pozitív személy savóját vizsgáltuk. Az antitestek belépési dinamikájának leírásához a microarray bevezetése óta mért további mintákat is használtuk ($\Sigma n=137$). Statisztika: Kyplot 6.0 (KyensLab Inc., Tokyo, Japan) és Online ROC Curve Calculator (Johns Hopkins University, Baltimore, MA, USA).

Esetdefiníciók:

- Korai: fennálló EM, vagy korai posztprimer kórkép tünetei (meningoradiculitis, facialis paresis, disszeminált EM) és expozíció/EM 3 hónapon belül;
- Késői: Múltban expozíció és/vagy EM, típusos fennálló panaszok (perifériás neuroathia, arthritis);
- Maradvány: Múltban expozíció és/vagy EM, jelenleg panaszmentes, vagy más kórkép igazolt/valószínű.

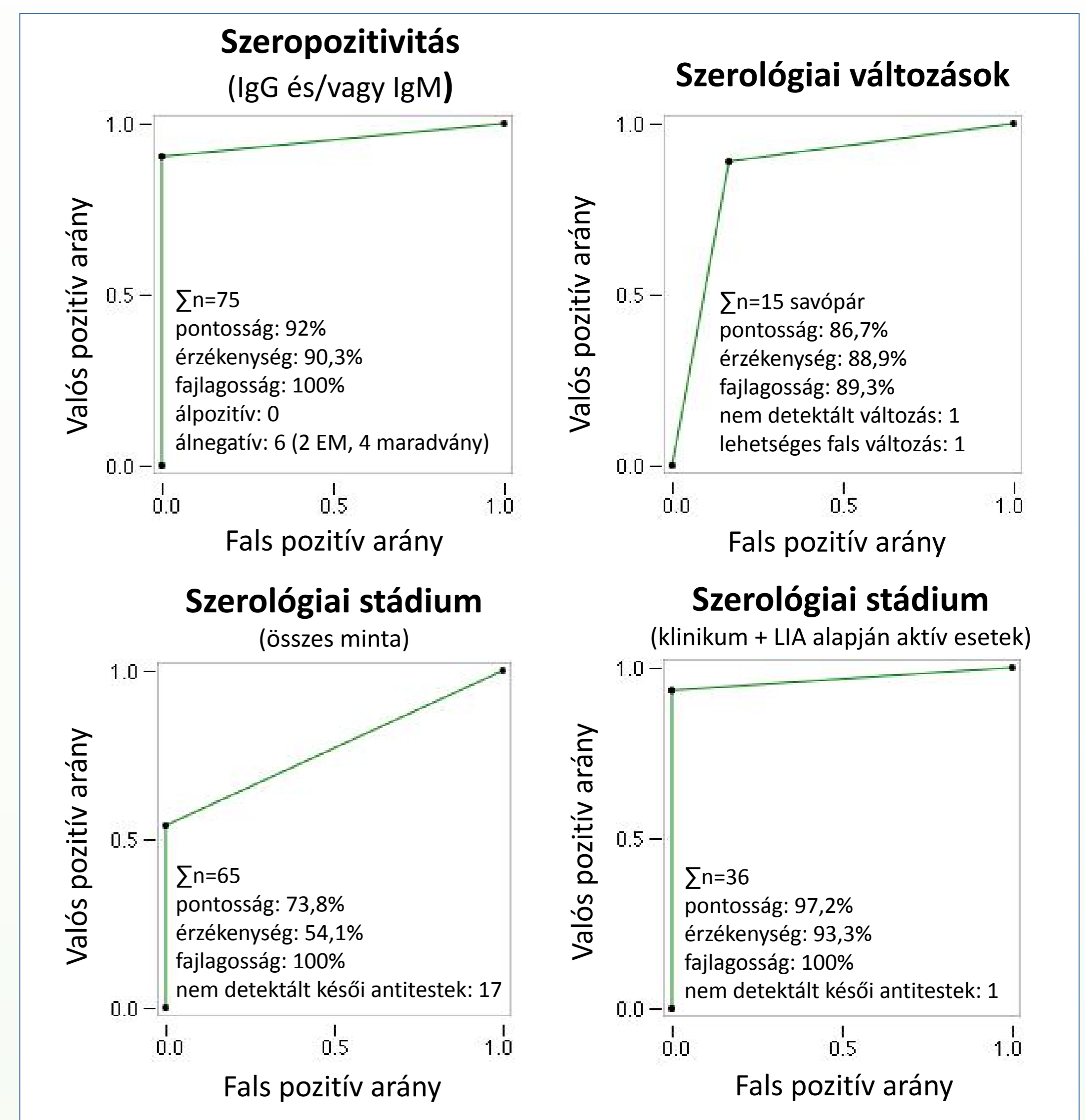
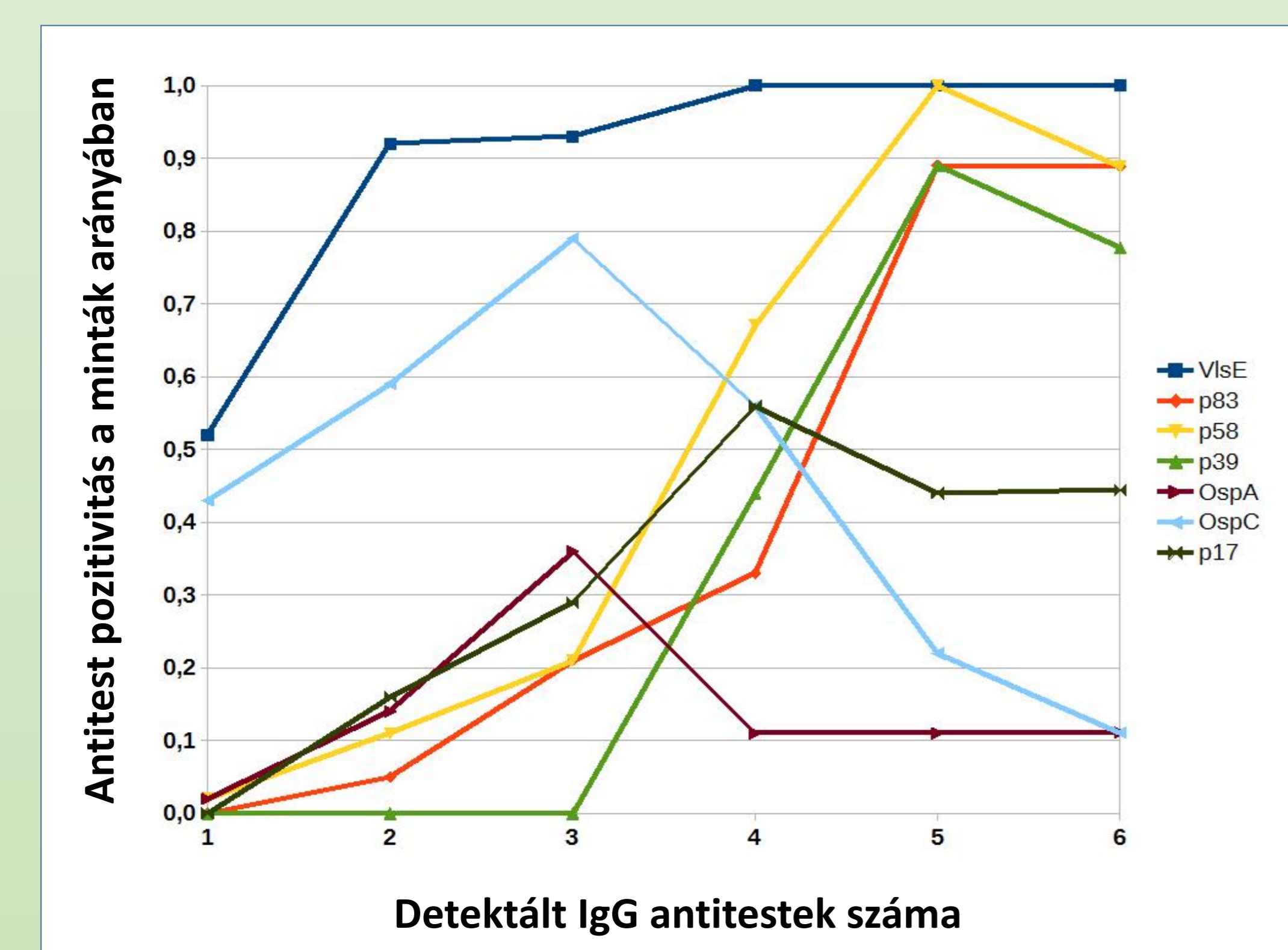


Egy well a plate-en (minden antigén tripletként szerepel)

1. *Treponema pallidum* TpN17
2. *Borrelia burgdorferi* s.l. OspE
3. *Borrelia burgdorferi* s.l. NapA
4. *Anaplasma phagocytophilum* p44
5. *Anaplasma phagocytophilum* OmpA
6. *Anaplasma phagocytophilum* Asp62
7. *Borrelia burgdorferi* s.l. OspB
8. *Borrelia burgdorferi* s.s., afzelii, garinii OspA
9. *Borrelia burgdorferi* s.s., afzelii, garinii, spielmannii OspC
10. *Borrelia burgdorferi* s.s., afzelii, garinii, spielmannii VlsE
11. *Borrelia burgdorferi* s.l. p83
12. *Borrelia burgdorferi* s.l. p58
13. *Borrelia burgdorferi* s.s., afzelii p41
14. *Borrelia burgdorferi* s.l. p39

Eredmények

A vártan megfelelően az anti-VlsE adta a szeropozitivitás alapját, korai esetekben ez kiegészült az anti-OspC-vel, amely szeroprogresszióval gyakran revertál. A pontszám emelkedésével folyamatosan léptek be a típusos késői antitestek. A TestLine microarray 90,3% érzékenységgel azonosította a szeropozitivitást 100% fajlagosság mellett). A hat álnegatív eredmény közül 2 EM, 4 pedig a klinikum és a Mikrogen LIA alapján maradványantitestek mellett mutatkozott, így a releváns érzékenység gyakorlatilag 100%. A szerológiai változások (savópárok) azonosításakor 2 esetben tapasztaltunk eltérést. Az esetek ismeretében (mindkettő kezelés közben ill. közvetlenül utána ismételt szerológia) a különbségnek valószínűleg nincs klinikai jelentősége, illetve a kezelés során felszabaduló antigénekkal is összefügghet.



Az antitestek számát tekintve a gyári cutoff értékekkel a microarray aluldetektált. A háttér + 2SD (in-house) cutoff-kritériumot alkalmazva a különbség csökkent. Ezen plusz antitestek szemmel tisztán kivehetők voltak.

	IgG			IgM		
	Mikrogen	TestLine	TestLine 2SD	Mikrogen	TestLine	TestLine 2SD
Pontszám (átlag±SD)	3,44±2	1,93±1,64	2,72±1,69	0,98±1,27	0,87±0,97	1±1,1
p (Wilcoxon vs. Mikrogen)		<0,001	<0,001		n.s.	n.s.

Említést érdemel a p17 (p18, DbpA) detekciós deficitje. Ahol a Mikrogen LIA eredménye egy speciestre utalt, a *B. afzelii* IgG pozitívítások esetén 15-ből 8-at azonosított a microarray, a *B. garinii/bavariensis* specifikus IgG-k esetén 5-ből egyet sem.

A tíz TPPA és RPR pozitív mintából a microarray 8-at azonosított, ugyanakkor a fennmaradó kettő is átlag + 2SD tartományon kívüli értéket adott. A *Borrelia* szeropozitív minták közül 3 (4,6%) esetében merült fel *Anaplasma phagocytophilum* szeropozitivitás, így esetleges koinfekció lehetősége.

Következtetések

A TestLine microblot array véleményünk szerint alkalmas a szeropozitivitás megbízható igazolására és jellemzésére. Előnyei:

- jó automatizálhatóság,
- a kontamináció lehetőségének minimalizálása,
- a differenciáldiagnosztikai szemlélet.

Az antitestek számszerű aluldetektálásának a jelentősége kérdéses, mivel az érzékenységet és a szerológiai stádium azonosítását a klinikailag aktív esetekben nem érintette, a maradvány-antitestek diagnosztikus értéke pedig kérdéses. A jelenség háttérében az alábbi okok feltételezhetők:

- a (túl?) szigorú cutoff érték,
- az anti-OspC IgG szeroreverzija (biológiailag helyesen²),
- az anti-p17 (DbpA) IgG gyenge észlelése.

A szerológiai változások jól leképezhetők voltak. Kiemelendő, hogy az automatizált leletezés mellett sem elhagyható a vizuális ellenőrzés, a gyenge reaktivitások értékelése, és a mintázatok figyelembevétele. Rekombináns tesztekkel az antitestszám helyett célszerű az antitest-mintázatot a klinikummal összevetve értelmeznünk³. A microarray alkalmazása önálló syphilitiszűrővizsgálatként nem javasolható.

Bármely tesztet használjuk, érdemes összeasonlító mérésnek alávetnünk. Fontos az antitest-kinetika követhetősége és az egyes kórformákban jelentős speciestek virulenciafaktorainak detektálása (VlsE minden esetben, neuroborreliosis - *B. garinii* DbpA/p17/18; arthritis - *B. burgdorferi* OspA és NapA).

Limitáció

A Mikrogen LIA értékelése vizuálisan történt, ami az antitestszám értékelésében hátrányt jelenthet a TestLine microarray számára annak szoftveres értékelésekor.

Irodalom

1. Wilske és mtsai. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. FEMS Immunol Med Microbiol 2007; 49:13-21.
2. Jobe és mtsai. Rapid Decline of OspC Borreliacidal Antibodies following Treatment of Patients with Early Lyme Disease. Clin Vaccine Immunol 2011; 18:1034-1037.
3. Zóka és mtsai. Testing for Lyme borreliosis: could serology tell more? Journal of Immunology and Clinical Microbiology. 2020; 5:85-93.