

Two-Tiered Serological Testing for Borrelia Infection: Immunological Background and Analytical Limitations

Nagy Előd Ernő^{1,2}, Zaharia-Kézdi Iringó³, Székely Edit^{4,5}

¹George Emil Palade UMPHST, Department of Biochemistry-Environmental Chemistry, ²Mures County Hospital, Infectious Diseases Laboratory,

³George Emil Palade UMPHST, Infectious Diseases Clinic I, ⁴George Emil Palade UMPHST, Department of Microbiology, ⁵Târgu Mureș Emergency Clinical Hospital, Clinical Microbiology Laborator

Abstract • Two-tiered serological testing is the recommended laboratory diagnostic approach for Borrelia infection, as outlined in international guidelines. This approach utilizes a screening test, typically an indirect immunofluorescence assay (IFA) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), followed by a confirmatory Western blot (immunoblot) technique. While effective in diagnosing complex manifestations of Lyme disease, such as Lyme arthritis and neuroborreliosis, this method exhibits lower sensitivity and specificity in early infection. Consequently, published data correlating serological results with clinical presentations are often variable. This study analyzed ELISA results from 878 patients, along with 181 IgM and 157 IgG immunoblot results, evaluating ELISA performance in relation to immunoblot outcomes. We also explored potential and practical factors contributing to discrepancies between ELISA and immunoblot results. The sensitivity and specificity of our anti-Borrelia IgM ELISA tests were 78.9% and 82.9%. For the IgG ELISA tests, sensitivity was 83.3% and specificity was 90%. The positive predictive values were 68.2% for IgM and 71.4% for IgG. The ELISA false positivity could have arisen from cross-reactivity with antigens such as the p41 protein. Antibodies targeting immunodominant, pathogen-specific proteins often appear concurrently. Notably, antibodies against OspC proteins from multiple Borrelia species (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*, and *B. spielmannii*) were detected in some immunoblot samples. Our study demonstrated adequate performance of IgM and IgG ELISA tests, consistent with published data. Optimizing test selection based on immunodominant antigens, minimizing false-positive and false-negative results, and ensuring appropriate application and timing of two-tiered serological diagnostics require enhanced clinical expertise.

Keywords • Borrelia, ELISA test, immunoblot, two-tiered diagnostics

DOI: 10.2478/orvtudert-2023-0008

Bulletin of Medical Sciences 2023, 96(1): 89–106

Introduction

Lyme disease is a complex, multi-organ condition caused by *Borrelia burgdorferi sensu lato*, a spirochete transmitted by Ixodes tick species. It can affect

the skin, muscles, joints, and central nervous system. The incidence of Lyme disease is rising in Europe, with more than a tenfold increase in reported cases between 1990 and 2010, reaching 35,000 cases per year in 2010 [1]. Prevalence varies significantly across countries. Belgium, Finland, the Netherlands, and Switzerland report the highest rates, exceeding 100 cases per 100,000 people, whereas in countries such as Belarus, Croatia, Denmark, France, Ireland, Portugal, Russia, Slovakia, Sweden, and the United Kingdom, the rates are much lower, with fewer than 20 cases per 100,000 people annually [2]. In Romania, the incidence fluctuates but remained below 4.5 cases per 100,000 annually from 2010 to 2020 [3].

Corresponding author

Előd Ernő Nagy

George Emil Palade UMPHST, Department of Biochemistry-Environmental

Gh. Marinescu str. 38

Targu-Mures, 540142

elod.nagy@umfst.ro

In March 1996, 14 European countries (12 from the then-European Union) launched the EUCALB (European Concerted Action on Lyme Borreliosis) initiative to study and monitor the ecological, taxonomic, and geographical distribution of the pathogen, as well as its pathological and epidemiological significance. This initiative was necessary due to challenges in detection, variability in laboratory results, and the potential for severe complications [4]. In 2011, Stanek and colleagues from 11 European centers published a comprehensive review on the clinical presentations of Lyme disease [5]. Later, experts from the European Centre for Disease Prevention and Control published a systematic review on the accuracy of serological methods for detecting the infection [1].

The causative agents of Lyme-like borreliosis belong to the *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Bbsl) complex, which includes *Borrelia burgdorferi* (dominant in North America), *Borrelia afzelii*, and *Borrelia garinii* (more common in Europe), as well as some rarer subtypes [6]. In a mouse model, different strains have demonstrated distinct tropisms and infection dynamics. For instance, *Borrelia sensu lato* BRE-13 primarily infects the brain, while the rare PBI strain of *Borrelia bavariensis* infects both the brain and heart early, often within 12 hours of a tick bite [7]. Polymorphisms within the *OspC* gene and the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences hold diagnostic and clinical significance. This is because mutual immunity between genotypes is not always present, making successive infections possible. Moreover, laboratory detection varies in sensitivity between genotypes, requiring serological tests to be optimized for current epitopes. Certain genotypes are also more virulent than others [8, 9, 10], with *OspC* genotypes A, B, H, I, and K considered key virulence factors [6]. The RST1 strain isolate, used for antigen detection in North America, is less detectable with RST2 and RST3 strains, which are less prevalent in the bloodstream and tend to cause milder inflammation and disease [11].

According to Stanek and colleagues, the clinical manifestations of Lyme disease include the following:

- **Cutaneous forms:** erythema migrans, *Borrelia* lymphocytoma, acrodermatitis chronica atrophicans.
- **Lyme arthritis:** synovitis, inflammation of one or more large joints, typically the knee.
- **Skeletal and myocardial symptoms:** rarely, myositis, as well as endocarditis, myocarditis, pericarditis, and arrhythmias.

- **Ocular symptoms:** uveitis, conjunctivitis, episcleritis, keratitis.
- **Neuroborreliosis:** presenting with a wide variety of symptoms [5].

The culture of *Borrelia burgdorferi* remains the gold standard for laboratory diagnosis. However, this method has variable sensitivity, ranging from 1% to 70% in patients with Lyme arthritis or cutaneous manifestations. It is also technically demanding and not widely accessible, meaning a negative culture does not exclude infection.

Serological methods are the most widely used diagnostic tools due to their ease of sampling, improving sensitivity and specificity, and broader availability [5]. However, erythema migrans and early neuroborreliosis do not always result in positive seroconversion. For erythema migrans, this is typically not problematic, as diagnosis relies primarily on clinical presentation and patient history [12]. For neuroborreliosis, specific diagnostic recommendations have been developed by Mygland and colleagues for the EFNS (European Federation of Neurological Sciences) [13].

The serological diagnosis of *Borrelia sensu lato* infection follows a two-step process, as recommended internationally [14]. Immuno-enzymatic and immuno-fluorescent antibody detection methods serve as initial screening tests, followed by confirmatory Western blot (immunoblot) techniques to detect complex antibody patterns. Among screening methods, immuno-enzymatic tests are simpler, more accurate, and easier to perform, but they generally provide only qualitative estimates of antibody titres [6]. These two-tier diagnostic recommendations are summarized in recent publications (Figure 1) [6, 14].

The aim of this manuscript is to review common pitfalls in conventional two-step IgM and IgG antibody determination against *Borrelia*, report the diagnostic experience of the Infectious Diseases Laboratory at Targu Mures County Hospital, and assess the performance indicators of ELISA tests used.

Material and Methods

2.1 Purpose and Study Methods

Between 2015 and 2017, 878 cases of *Borrelia* serology were analyzed at the Infectious Diseases Laboratory of Clinical County Hospital, Targu Mures using ELISA and

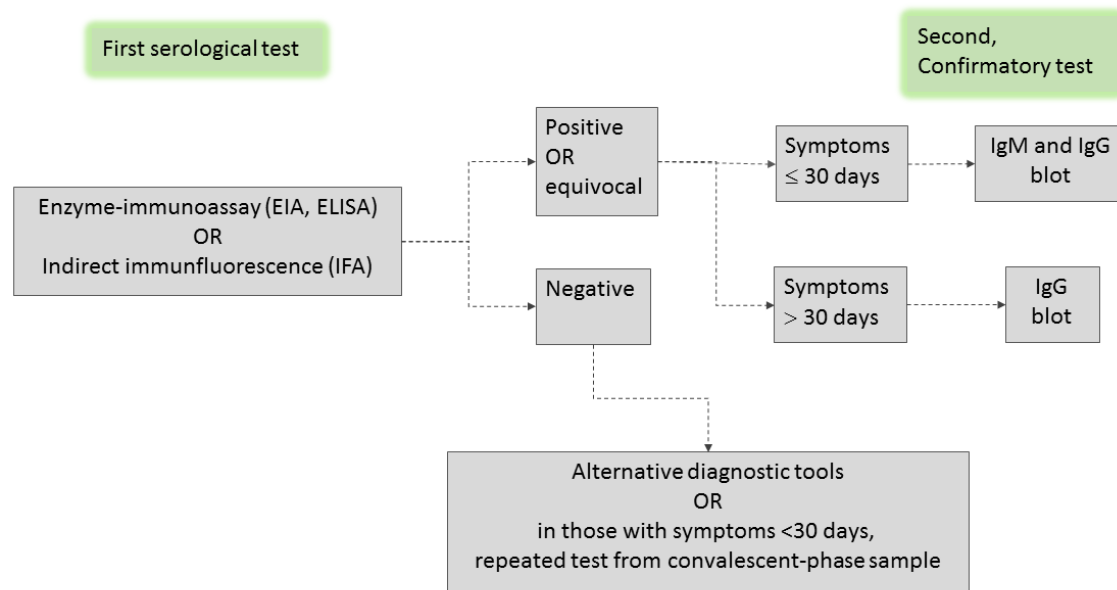


Figure 1. Conventional two-tiered Borrelia serology recommendations (according to Moore et al., 2016).

Western blot (immunoblot) methods. The two-tier diagnostic algorithm could only be partially validated due to challenges such as the high volume of outpatients, the relatively high cost of Western blot testing, the partial lack of justification for test requests, repeated testing, and limited adherence to the diagnostic algorithm by referring specialists.

A total of 372 cases were screened using Virotech ELISA kits and 506 with Mikrogen ELISA kits. Additionally, 181 cases underwent IgM Western blot analysis, and 157 cases were tested for IgG using Mikrogen RecomLine reagents.

The primary goal of this study was to evaluate the performance (sensitivity, specificity, and predictive values) of ELISA methods from serum compared to Western blot and to identify potential sources of error in the diagnostic process. Patient demographics, medical history, clinical symptoms, and treatment data were not included in the analysis.

2.2 ELISA Methods

The quality of ELISA reagents used varied based on their antigen content. The Virotech ELISA IgM Test Kit and Borrelia + VlsE IgG Europe ELISA IgG Test Kit utilize antigenic lysates containing a mixture of *B. afzelii* strain PKo, *B. garinii* strain PBr, and *B. burgdorferi* strain ZS7. In contrast, the Mikrogen RecomWell Borrelia IgM ELISA® and RecomWell Borrelia IgG ELISA® employ a recombinant immunodominant antigen mixture from

three Borrelia species: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, and *B. afzelii*. The IgM kit includes the antigens OspC, p41, and VlsE, while the IgG kit contains p100, OspC, VlsE, and p18.

The Virotech ELISA Borrelia IgM and IgG methods were conducted according to the manufacturer's instructions. Reagents were preheated, and samples along with control sera (negative, cut-off, and positive) were diluted 1:100 in dilution buffer, loaded onto microtiter plates, and incubated for 30 minutes at 37°C. Following incubation, the plates were washed four times with 350 µL wash buffer. Afterward, 100 µL of anti-human IgM or IgG conjugate was added to each well, incubated for another 30 minutes, and washed four times. Subsequently, 100 µL of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution was added and incubated for 30 minutes. The reaction was stopped using 50 µL citrate stopping solution, and absorbance was measured at 450 nm.

For the Mikrogen RecomWell Borrelia IgM and IgG methods, reagents were allowed to reach room temperature before use. Samples and control sera were diluted 1:100 with dilution buffer and added to the microtiter plates. Plates were incubated for 60 minutes at 37°C, washed four times with 300 µL wash buffer, and then treated with 100 µL of anti-human IgM or IgG horseradish peroxidase conjugate for 30 minutes. After a final wash, 100 µL of TMB substrate solution was added to each well and incubated for 30 minutes. The reaction was

terminated using 100 µL of stopping solution, and light absorbance was measured at 450 nm.

Both methods were automated, performed using Personal Lab (Adaltis, Italy) and Virclia ThunderBolt (Virclia, Spain) ELISA systems. Antibody titres were evaluated against a cut-off value of 10 U/mL for the Virotech test and 20 MU/mL for the Mikrogen test.

2.3 Immunoblot Method

The Mikrogen Immunoblot, RecomLine Borrelia IgM/IgG[®], used for confirmatory diagnosis, is designed to detect several genotypes: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii*, and *B. bavariensis*. This kit employs a combination of recombinant antigens, including OspC, p18 from all species, p100, p39, p41, P58, VlsE, and OspA. The immunoblot relies on antigens separated via electrophoresis on a solid-phase foil, enabling comprehensive antibody detection.

Per the manufacturer's instructions, reagents were allowed to reach room temperature, and test strips were pre-soaked in 2 mL of dilution buffer for three minutes. For IgM determination, 40 µL of sample was added per test strip, while 20 µL was used for IgG analysis. The strips were incubated at room temperature for one hour, lightly agitated, and washed three times with 2 mL of wash buffer for 5 minutes each. Subsequently, 2 mL of diluted anti-human IgM or IgG horseradish peroxidase conjugate was added, followed by a 45-minute incubation and a final wash. Afterward, 1.5 mL of diluted TMB substrate solution was applied to each strip for eight minutes, and the reaction was stopped by rinsing with distilled water.

Table 1. Scale for Immunoblot reactions

Antigen	IgM score	IgG score
p100	5	5
VlsE	5	5
p58	4	4
p41	1	1
p39	4	5
OspA	5	5
OspC	8	5
p18	5	5
Summary		
≤5	Negative	Negative
6	Borderline	Borderline
≥7	Positive	Positive

Antibody positivity was evaluated by assigning scores based on the pattern of staining, as recommended by the manufacturer:

- **0–5 points:** Negative.
- **6 points:** Borderline.
- **≥7 points:** Positive.

The scoring system weights specific antibody reactions differently. For instance, anti-OspC antibody positivity is assigned a score of 8 for IgM (sufficient for a positive evaluation) but only 5 for IgG. Anti-VlsE antibody positivity, which typically indicates acute infection, is scored at 5, while anti-p41 protein antibody is assigned only 1 point. Band intensities were compared visually or using scanning software, with scores assigned only to bands equal to or more intense than the control band.

According to Mikrogen Diagnostik test, the combined sensitivity of IgM and IgG detection by immunoblot is:

- 79% for erythema migrans,
- 96% for Lyme arthritis,
- 100% for neuroborreliosis,
- 100% for Lyme arthritis.

Results

3.1 ELISA Results

The majority of immunoenzymatic measurements for detecting antibodies against *Borrelia* were conducted using Mikrogen ELISA, with a smaller proportion performed using Virotech ELISA. The methodologies and reference ranges of the two manufacturers differ significantly. **Table 2** provides descriptive statistics, including the mean, standard deviation, and overall range of measured values.

Table 2. Descriptive Statistics for Immunoenzymatic Determinations

Method	Average ± SE	Min–Max Value	Reference Range
Virotech			
IgM (n=372)	11.47 ± 0.84	0.88–175.83	0–9
IgG (n=266)	10.40 ± 0.86	0.40–77.96	0–9
Mikrogen			
IgM (n=506)	15.93 ± 1.45	0.76–296.65	0–20
IgG (n=370)	17.11 ± 1.70	0.81–140.48	0–20

Values are given in VU/mL (Virotech) or MU/mL (Mikrogen)

Table 3.A. Qualitative Distribution of Results, *Virotech* ELISA Results

ELISA Result	IgM (n=372)	IgG (n=266)
Negative	211 (56.7%)	184 (69.2%)
Equivocal	37 (9.9%)	24 (9.0%)
Positive	124 (33.3%)	58 (21.8%)
Total	372 (100%)	266 (100%)

Results are presented as absolute numbers and percentages (in brackets)

Table 3.B. Qualitative Distribution of Result, *Mikrogen* ELISA Results

Category	IgM (n=506)	IgG (n=370)
Negative	334 (66.0%)	283 (76.5%)
Equivocal	31 (6.1%)	10 (2.7%)
Positive	141 (27.9%)	77 (20.8%)
Total	506 (100%)	370 (100%)

Results are presented as absolute numbers and percentages (in brackets)

The Virotech method results showed mean values in the slightly positive range for IgM and in the borderline range for IgG. In contrast, Mikrogen's results remained in the negative range for both IgM and IgG antibodies. Despite these differences, the positivity ratios for both methods were comparable: 33.3% vs. 27.9% for IgM and 21.8% vs. 20.8% for IgG. **Tables 3.A** and **3.B** present the qualitative distribution and primary quantitative characteristics of the results.

3.2 Immunoblot Results

Immunoblot analysis was exclusively conducted using the Mikrogen Recomblot IgM/IgG kit during the study period. As a confirmatory diagnostic method, it detected IgM antibodies in 21.5% of cases and IgG antibodies in 22.9%. Retesting of borderline results was not feasible. The highest scores recorded were 32 for IgM and 25 for IgG. Approximately three-quarters of patients were negative, with aggregate scores between 0–5, indicative of either no reaction or nonspecific low antibody titers. The distribution of immunoblot results is summarized in **Table 4**.

3.3 ELISA Performance Analysis

As ELISA and other immunoenzymatic methods are primarily recommended as screening tests, their diagnostic value is often debated due to significant variability in

Table 4. Distribution of Immunoblot Results

Category	IgM Recomblot (n=181)	IgG Recomblot (n=157)
Negative	135 (74.6%)	118 (75.2%)
Borderline	7 (3.9%)	3 (1.9%)
Positive	39 (21.5%)	36 (22.9%)
Total	181 (100%)	157 (100%)

performance data. To assess the Mikrogen ELISA's performance, a subset of 60 IgM and 52 IgG cases underwent immunoblot testing for confirmatory diagnostics. The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) are shown in **Tables 5.A** and **5.B**.

3.4 Examples of Complex Immunoblot Antibody Patterns

Figure 2 illustrates typical immunoblot patterns observed in the study. Positive immunoblot results frequently revealed antibodies against multiple immunodominant antigens (lanes 2.B, C, D, E). Commonly detected antibodies included those targeting p100, VlsE, OspC, and p18 proteins.

Table 5.A. Performance Characteristics of ELISA Results, IgM Performance (n=60)

Immunoblot Result	ELISA Negative	ELISA Positive
Negative	34	4
Positive	7	15

Performance Metric	Value (%)	95% CI
Sensitivity	78.95	54.43–93.95
Specificity	82.93	67.94–92.85
PPV*	68.18	51.22–81.39
NPV**	89.47	77.87–95.36

Table 5.B. Performance Characteristics of ELISA Results, IgG Performance (n=52)

Immunoblot Result	ELISA Negative	ELISA Positive
Negative	36	2
Positive	4	10

Performance Metric	Value (%)	95% CI
Sensitivity	83.33	51.59–97.91
Specificity	90.00	76.34–97.21
PPV*	71.43	48.82–86.76
NPV**	94.74	83.49–98.46

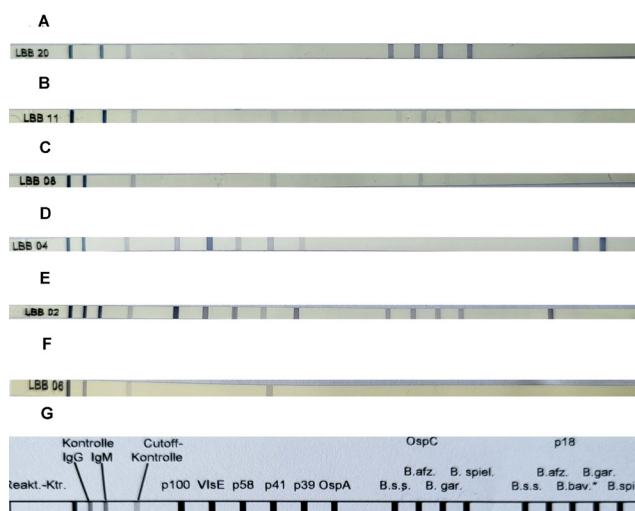


Figure 2. Examples of *Borrelia* immunoblot results. A- multiple Osp C IgM positivity, B- multiple Osp C and p41 IgM positivity, C- Osp C (*Borrelia afzelii*) and p41 positivity, D- complex double IgM+IgG positivity without Osp C reactivity; E- complex IgG positivity with Osp C reactivity; F- presence of isolated p41 IgG, G- identification control band. In all cases, the immunoblot method shows the reaction against protein antigens separated according to their molecular weight and other physico-chemical properties, allowing weighting of seropositivity.

For IgG, these antibodies are each scored at 5 points during evaluation. While individually insufficient to meet the 7-point threshold for positivity, their cumulative presence in a sample often results in a high overall score. For IgM, simple positivity is generally driven by OspC reactivity, which alone scores 8 points.

Interestingly, multiple anti-OspC reactivities against *Borrelia sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*, and *B. spielmanii* were detected in several positive samples (e.g., samples A and B). The manufacturer did not provide specific data regarding cross-reactivity among strains. Consequently, it is hypothesized that in these cases, infections with multiple pathogenic strains, either concurrently or sequentially, may have occurred.

The p41 protein, also known as flagellin, is not exclusively specific to *Spirochaetes* but is shared among other ciliated bacteria. Recent research indicates that it may also possess immunomodulatory properties [15]. Isolated p41 protein reactivity was noted in some cases, and this may correlate with ELISA positivity in both the Virotech and Mikrogen IgM kits, representing a frequent cause of false-positive ELISA results.

Notably, no OspA reactivity was identified in any of the analyzed samples. (Figure 2)

Discussions

4.1 Diagnostic Pitfalls – Timing of Serological Testing and Evaluation of Antibody Titres

Serology remains the primary diagnostic method for confirming *Borrelia* infections, given the challenges of directly detecting the pathogen. Accurate timing of laboratory testing is crucial: during the first two weeks of infection, antibody detection is typically ineffective. However, in the immediate post-infection period, two-step serological diagnostics offer good sensitivity and specificity. The IgM-to-IgG isotype switch occurs rapidly, leading to the swift appearance of IgG antibodies.

For neuroborreliosis, cerebrospinal fluid (CSF) antibody testing should supplement serum analysis. While serum antibody titres are often elevated in advanced disease and detectable by both methods, false-negative results may occur during the first six weeks of infection [13]. Antibody positivity can persist for months or even years following successful treatment [17].

Hammers-Berggren et al. conducted a nine-year follow-up study on 30 patients with erythema migrans and 91 with neuroborreliosis. Using ELISA assays with ciliary antigens, they found high IgM and lower IgG titres in early erythema migrans cases. IgM was positive in 70% of erythema migrans cases, with isolated IgM or IgG positivity in nine patients. After three years, IgM titres became negative in 17 cases but persisted in four patients for up to 17 months. For IgG, 57% of seropositive cases (12/21) remained positive after five years. In neuroborreliosis cases, 75% of patients showed declining IgM titres over nine years, while IgG titres decreased in 67%. Among patients with complications or residual symptoms, only one had persistently high IgM titres, and nine showed persistently high IgG [17].

Although serological tests are critical in diagnosis, variability in immune response duration complicates the differentiation between persistent infection and reinfection, limiting their utility in assessing treatment outcomes. Emerging methods, such as IgG avidity testing, could potentially distinguish between recent infections (low-avidity IgG) and late-stage infections (high-avidity IgG). However, these methods are hindered by limited reagent availability and standardization. Other promising

biomarkers include gamma-interferon release assays and CXCL13 measurements, which may differentiate active infection from prior treated cases and detect neuroinflammation [6].

A Bulgarian study of 219 erythema migrans cases examined IgM and IgG dynamics two months after disease onset. Seronegativity was observed in 63% of cases within the first 10 days and in 24% after two months. IgM positivity rates were 28% initially and 55% after two months, while IgG positivity increased from 3% to 16%. After antibiotic therapy, IgM reactivity persisted in 10% and IgG in 38% of cases after one year, with some patients remaining asymptomatic [18].

Kannian et al. compared IgG antibody profiles in antibiotic-refractory, drug-responsive, and untreated Lyme arthritis patients. In untreated cases, titres remained high for 2–5 years. In refractory cases, titres rose slightly during the first three months despite prolonged antibiotic treatment, while titres in successfully treated cases plateaued or decreased within one to three months [19].

In some instances, prolonged antibiotic therapy may be required. Moysa et al. described a case involving antibiotic resistance in an Irish patient with a challenging diagnosis, variable serological results, and diverse symptoms. Despite seven weeks of doxycycline therapy, symptoms persisted, necessitating an additional two months of combination antibiotic therapy to achieve symptom resolution [20].

Our results show a relatively low seropositivity rate, with 28–33% for IgM and 22–23% for IgG antibodies detected via ELISA. In subgroups where blot testing was performed, positivity rates were 21–23% for both isotypes. This low positivity highlights the importance of optimal timing for testing. However, we did not analyze the correlation between symptom onset, presumed diagnosis, and blood sampling timing, limiting further conclusions.

4.2 Diagnostic Pitfalls – Antigenic Variability and Diagnostic Test Characteristics

First-generation ELISA tests used ultrasonically prepared cell lysates as antigen mixtures but lacked stable concentrations of immunodominant antigens such as the VlsE protein. Modern second-generation tests incorporate extracted or recombinant antigens, including OspC, OspA, and epitopes like the C10 and C6 peptides [21]. The Western blot (immunoblot) technique employs antigens separated on a polyacrylamide gel, enabling comprehensive evaluation of the antibody profile. This

method determines whether antibody production is targeted toward immunodominant antigens or those with lower significance and specificity.

The early immunodominant antigens of *Borrelia* include outer surface protein C (OspC; 21–25 kDa), variable major protein-like expressed sequence (VlsE; 34–35 kDa), and the flagellar protein (p41/flagellin/FlaB; 41 kDa), all expressed on the pathogen's outer surface [6]. Additional proteins with high antigenicity that can elicit an immune response during early infection include the flagellar protein FlaA (37 kDa), decorin-binding proteins (DbpA and DbpB), RevA, p66, BBK07, BBK32, BBG33, LA7, BmpA, FliL, and several others. Microarray studies have identified antibodies in serum samples from individuals with Lyme arthritis in the United States that react with at least 89 predominantly surface antigens. Current diagnostic recommendations highlight the importance of using multiplex, immunodominant antigens to ensure reliable testing [6].

4.3 Performance Indicators of *Borrelia* Serological Tests Performed in Our Laboratory

Guerin and colleagues have reported performance indicators for some second-generation serological tests, highlighting variable sensitivity and specificity in early infection stages. For example, an ELISA containing the VlsE C6 epitope for erythema migrans and early Lyme borreliosis showed sensitivity of 29% and specificity of 96% in the USA, and sensitivity of 65–68% and specificity of 91–92% in Europe. The Enzygnost C6 ELISA® demonstrated 78% sensitivity and 96% specificity, while the VlsE pepC10 test showed 51% sensitivity and 94–95% specificity. Interestingly, the dot-blot method exhibited high sensitivity (96%) but poor specificity (35%). For late-stage manifestations such as neurological symptoms, carditis, and arthritis, all new-generation screening tests performed well, with sensitivities ranging from 88–100% and specificities exceeding 95% [21].

In an earlier study, an ELISA using a 26-mer synthetic peptide of the VlsE antigen achieved sensitivities of 74%, 85%, and 100% in acute, convalescent, and late infection stages, respectively, with specificities ranging from 62–99% [22]. However, a meta-analysis of 75 studies by Leeflang et al. revealed conflicting results: serological tests (ELISA and/or immunoblot) had a sensitivity of 50% for erythema migrans, 77% for neuroborreliosis, 97% for acrodermatitis chronica atrophicans, and 73% for generalized Lyme disease, with specificity ranging from

90–99%. The study also noted no significant performance advantage of tests using recombinant antigens over those using purified or whole-cell lysates. Furthermore, laboratory-prepared and commercially manufactured ELISA tests showed comparable performance to immunoblotting, and two-step diagnostics offered no significant benefit in diagnosis [23].

In contrast, Ang et al. reported lower sensitivity (34–59%) for eight ELISA and five blot assays using whole-cell lysates and recombinant antigens. Notably, among 89 tested samples, several yielded false-negative results across all ELISA methods [24]. Another meta-analysis of North American studies found that two-step serological diagnostics were more effective than other protocols, reinforcing recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention [25].

In our study, ELISA tests demonstrated acceptable sensitivity and specificity. Detection of IgG antibodies by ELISA was superior to IgM, with sensitivities of 83.3% versus 78.9% and specificities of 82.9% versus 90%, respectively. The negative predictive values (NPV) of ELISA tests were higher than their positive predictive values (PPV): 89.7% for IgM and 94.7% for IgG versus 68.2% and 71.4%, respectively. These results were obtained using tests from a single manufacturer employing immunodominant recombinant antigens.

It is important to note that all performance indicators were calculated across all forms of Lyme disease, rather than being stratified by specific clinical presentations. Sensitivity, specificity, and predictive values are critical criteria for evaluating diagnostic adequacy; however, clinicians should carefully consider the positive predictive value when interpreting immunoenzymatic test results. Our findings support the use of ELISA as a cost-effective and straightforward screening tool. The combined sensitivity and specificity of the immunoblot method, regarded as the reference standard, are excellent for diagnosing Lyme arthritis and neuroborreliosis, as reported by the manufacturer. Thus, immunoblot is recommended as a second-step diagnostic test.

However, our study did not evaluate key aspects such as the interval between the two tests in individual patients, the correlation of immunoblot results with specific clinical symptoms, or the proportion of post-treatment seroconversion. These factors would provide a more comprehensive understanding of the clinical utility and significance of two-step diagnostics.

Conclusions

Serological testing remains an essential tool for confirming *Borrelia* infection. Our findings reveal a predominance of negative results in both ELISA and immunoblot testing. ELISA tests for IgM and IgG antibodies demonstrated adequate performance, consistent with published data. The use of immunodominant, specific antigens is critical to minimizing false-positive and false-negative results. While ELISA offers acceptable sensitivity and immunoblot proves effective for detecting complex cases, our study's low positivity rates underscore the importance of appropriate test selection and timing.

List of Abbreviations

- ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay
- EMBASE – Excerpta Medica database
- IgG – immunoglobulin G
- IgM – immunoglobulin M
- OspC – outer surface protein C
- OspA – outer surface protein A
- p100 – *Borrelia burgdorferi* p100 protein
- p18 – p18 protein
- p39 – p39 protein
- p41 – p41 protein, flagellin
- p58 – p58 protein
- RST1 – ribosomal RNA intergenic spacer type 1, OspC A genotype
- RST2 – ribosomal RNA intergenic spacer type 2, OspC K genotype
- RST3 – ribosomal RNA intergenic spacer type 3, OspC I genotype
- VlsE – variable major protein-like sequence, expressed

References

1. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/healthtopics/vectors/world-health-day-2014/Documents/factsheet-lyme-borreliosis.pdf>
2. Burn, Leah, et al. "Incidence of Lyme Borreliosis in Europe: A Systematic Review (2005-2020)." *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 23, no. 4, 1 Apr. 2023, pp. 172-194, <https://doi.org/10.1089/vbz.2022.0070>.
3. <https://www.cnsct.ro/index.php/analiza-date-supraveghere/boala-lyme-1/2240-boala-lyme-2020-analiza/file>
4. O Connell, S. "European Concerted Action on Lyme Borreliosis (EUCALB)." *Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable*

- Disease Bulletin, vol. 1, no. 3, 1 Mar. 1996, pp. 23-24, pubmed. ncbi.nlm.nih.gov/12631850/.
5. Stanek, G., et al. "European Union Concerted Action on Risk Assessment in Lyme Borreliosis: Clinical Case Definitions for Lyme Borreliosis." *Wiener Klinische Wochenschrift*, vol. 108, no. 23, 13 Dec. 1996, pp. 741-747, pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8990511/. Accessed 2 June 2024.
 6. Branda, John A., and Allen C. Steere. "Laboratory Diagnosis of Lyme Borreliosis." *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 34, no. 2, 27 Jan. 2021, <https://doi.org/10.1128/cmr.00018-19>.
 7. Sertour, Natacha, et al. "Infection Kinetics and Tropism of Borrelia Burgdorferi Ssensu Lato in Mouse after Natural (via Ticks) or Artificial (Needle) Infection Depends on the Bacterial Strain." *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, 31 July 2018, www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01722/full, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01722>.
 8. Hanincova, Klara, et al. "Multilocus Sequence Typing of Borrelia Burgdorferi Suggests Existence of Lineages with Differential Pathogenic Properties in Humans." *PLoS ONE*, vol. 8, no. 9, 17 Sept. 2013, p. e73066, www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3775742/#pone.0073066.s002, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073066>.
 9. Shapiro, Eugene D. "Lyme Disease." *New England Journal of Medicine*, vol. 370, no. 18, May 2014, pp. 1724-1731, www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4487875/, <https://doi.org/10.1056/nejmcp1314325>.
 10. Wilske, Bettina. "Diagnosis of Lyme Borreliosis in Europe." *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 3, no. 4, Dec. 2003, pp. 215-227, <https://doi.org/10.1089/153036603322662200>.
 11. Wormser, Gary P., et al. "Effect Of Borrelia Burgdorferi Genotype on the Sensitivity of C6 and 2-Tier Testing in North American Patients with Culture-Confirmed Lyme Disease." *Clinical Infectious Diseases*, vol. 47, no. 7, Oct. 2008, pp. 910-914, <https://doi.org/10.1086/591529>. Accessed 5 Feb. 2020.
 12. Eldin, C., et al. "Review of European and American Guidelines for the Diagnosis of Lyme Borreliosis." *Médecine et Maladies Infectieuses*, vol. 49, no. 2, Mar. 2019, pp. 121-132, <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2018.11.011>.
 13. Mygland, Å., et al. "EFNS Guidelines on the Diagnosis and Management of European Lyme Neuroborreliosis." *European Journal of Neurology*, vol. 17, no. 1, 23 Nov. 2009, pp. 8-e4, <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2009.02862.x>. Accessed 3 July 2019.
 14. Moore, Andrew, et al. "Current Guidelines, Common Clinical Pitfalls, and Future Directions for Laboratory Diagnosis of Lyme Disease, United States." *Emerging Infectious Diseases*, vol. 22, no. 7, July 2016, www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4918152/, <https://doi.org/10.3201/eid2207.151694>.
 15. Hajam, Irshad A, et al. "Bacterial Flagellin-a Potent Immunomodulatory Agent." *Experimental & Molecular Medicine*, vol. 49, no. 9, Sept. 2017, pp. e373-e373, <https://doi.org/10.1038/emm.2017.172>.
 16. Nagy, Előd, et al. "Diagnostic Pitfalls in a Young Romanian Ranger with an Acute Psychotic Episode." *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, May 2016, p. 961, <https://doi.org/10.2147/ndt.s103300>.
 17. Hammers-Berggren, S, et al. "Serological Follow-up after Treatment of Patients with Erythema Migrans and Neuroborreliosis." *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 32, no. 6, 1994, pp. 1519-1525, <https://doi.org/10.1128/jcm.32.6.1519-1525.1994>. Accessed 24 Nov. 2020.
 18. Christova, Iva, et al. "Identification of Borrelia Burgdorferi Ssensu Lato, Anaplasma and Ehrlichia Species, and Spotted Fever Group Rickettsiae in Ticks from Southeastern Europe." *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 22, no. 9, 1 Sept. 2003, pp. 535-542, <https://doi.org/10.1007/s10096-003-0988-1>.
 19. Kannian, Priya, et al. "Antibody Responses toBorrelia Burgdorferiin Patients with Antibiotic-Refractory, Antibiotic-Responsive, or Non-Antibiotic-Treated Lyme Arthritis." *Arthritis & Rheumatism*, vol. 56, no. 12, Dec. 2007, pp. 4216-4225, <https://doi.org/10.1002/art.23135>.
 20. Moysa, Cozette, et al. "Potential Persistent Borrelia Infection and Response to Antibiotic Therapy; a Clinical Case Study and Review of Recent Literature." *Antibiotics*, vol. 8, no. 4, 14 Nov. 2019, p. 223, www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6963185/, <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040223>.
 21. Mickaël Guérin, et al. "Lyme Borreliosis Diagnosis: State of the Art of Improvements and Innovations." *BMC Microbiology*, vol. 23, no. 1, 1 Aug. 2023, <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02935-5>.
 22. Fang Ting Liang, et al. "Sensitive and Specific Serodiagnosis of Lyme Disease by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with a Peptide Based on an Immunodominant Conserved Region ofBorrelia BurgdorferiVlsE." *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 37, no. 12, 1 Dec. 1999, pp. 3990-3996, www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC85863/, <https://doi.org/10.1128/jcm.37.12.3990-3996.1999>.
 23. Leeflang, M. M. G., et al. "The Diagnostic Accuracy of Serological Tests for Lyme Borreliosis in Europe: A Systematic Review and Meta-Analysis." *BMC Infectious Diseases*, vol. 16, no. 1, 25 Mar. 2016, www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4807538/, <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1468-4>.
 24. Ang, C. W., et al. "Large Differences between Test Strategies for the Detection of Anti-Borrelia Antibodies Are Revealed by Comparing Eight ELISAs and Five Immunoblots." *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 30, no. 8, 27 Jan. 2011, pp. 1027-1032, <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1157-6>.
 25. Waddell, Lisa A., et al. "The Accuracy of Diagnostic Tests for Lyme Disease in Humans, a Systematic Review and Meta-Analysis of North American Research." *PLOS ONE*, vol. 11, no. 12, 21 Dec. 2016, p. e016861, www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5176185/, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168613>.

Kétlépcsős szerológiai vizsgálat tapasztalatai a *Borrelia*-fertőzés immunológiai hátterének és analitikai korlátainak kontextusában

Nagy Előd Ernő^{1,2}, Zaharia-Kézdi Iringó³, Székely Edit^{4,5}

¹MOGYTTE, Biokémia-Környezeti Kémia Tanszék, ²Maros Megyei Kórház, Fertőző Laboratórium, ³MOGYTTE, I. számú Fertőző Klinika, ⁴MOGYTTE, Mikrobiológiai Tanszék, ⁵Marosvásárhelyi Sürgősségi Klinikai Kórház, Klinikai Mikrobiológia Laboratórium

Összefoglaló • A *Borrelia* fertőzés kimutatásában a kétlépcsős szerológiai diagnosztika nemzetközi irányelvekben ajánlott, széles körben elterjedt laboratóriumi módszer. Szűrő vizsgálatként indirekt immunfluoreszcencia, vagy immun-enzimátikus módszerek használatosak, a megerősítő diagnosztikában pedig a Western blot (immunoblot) technikát alkalmazzák. A borreliosis számos megjelenési formája közül ezek a szövődményes esetek, a Lyme arthritis és a neuroborreliosis kimutatásában eredményesek, a kezdeti fertőzésre vonatkozóan az érzékenyséjük és fajlagosságuk alacsonyabb. A szakirodalomban ezért a szerológiai tesztelés eredményeinek a klinikai korrelációira vonatkozó adatok meglehetősen heterogének. Tanulmányunkban megvizsgáltuk 878 beteg enzyme-linked immunoassay (ELISA) teszt-eredményeinek, 181 IgM, illetve 157 IgG immunoblot reakció eredményeinek eloszlását, valamint az ELISA teljesítmény mutatóit immunblotra vonatkoztatva. Áttekintettük továbbá az ELISA és a blot technikák eredményei közti eltérések néhány potenciális és gyakorlati okát. Az általunk használt anti-*Borrelia* IgM ELISA tesztek szenzitivitása 78.9%, specifitása 82.9% volt, míg az IgG tesztek esetében 83.3%, illetve 90%-os értéket mutatott. A pozitív prediktív érték szintje 68.2% (IgM), illetve 71.4% (IgG) volt. ELISA álpozitivitást okozhatnak olyan antigén-fehérjék, amelyek keresztreakálnak, például a p41 fehérje ellenes antitestek. Az immundomináns, fajlagos patogén-fehérjék elleni antitestek gyakran csoportosan jelennek meg. Érdekes megfigyelésünk, hogy néhány immunoblot mintában is többféle patogén-törzs (*Borrelia sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmannii*) OspC fehérjéje elleni antitest volt kimutatható. Tanulmányunkban az IgM és IgG ellentestek meghatározására végzett ELISA tesztek teljesítmény mutatói megfelelőnek, és más szakirodalmi adatokkal összehasonlíthatónak mutatkoztak. Az immundomináns antigénekre épülő tesztek kiválasztása, az álpozitív és álnegatív eredmények arányának csökkentése, valamint a kétlépcsős szerológiai diagnosztika helyes alkalmazása és időzítése fokozott szakmai jártasságot igényel.

Kulcsszavak • *Borrelia*, ELISA, immunoblot, kétlépcsős diagnosztika

DOI: 10.2478/orvtudert-2023-0008

Orvostudományi Értesítő 2023, 96(1): 89-106

Bevezetés

A Lyme-kór a *Borrelia burgdorferi sensu lato* *Spirochaeta* faj által okozott, az *Ixodes* kullancsfaj közvetítésével terjedő komplex, többszervi megbetegedés, amely a kültakarót, az izomszövetet, ízületeket és a központi idegrendszert egyaránt érintheti. A betegség incidenciája Európában növekvő, 1990 és 2010 között több, mint tízszeresére (2010-ben évi 35.000) emelkedett a bejelentett esetek száma [1]. Az országok közti előfordulási arány erősen különböző, Belgiumban, Finnországban, Hollandiában és Svájcban a legmagasabb, >100/100.000, míg számos ország-

ban, például Fehéroroszországban, Horvátországban, Dániában, Franciaországban, Írországban, Portugáliában, Oroszországban, Szlovákiában, Svédországban, és az Egyesült Királyságban jelentősen kevesebb, <20/100.000 lakos/év [2]. Romániában az incidencia változó, de hivatalos adatok szerint 2010–2020 között egyszer sem haladta meg az évi 4.5/100.000 lakos arányszámot [3]. A *Borrelia* fertőzés kimutatási nehézségei, a laboratóriumi eredmények heterogenitása és a potenciálisan súlyos szövődmények miatt 14 európai ország (12 az akkori Európai Unióból) 1996 márciusában elindította az EUCALB (European Concerted Action on Lyme Borreliosis) nevű

kezdeményezést [4], amely egyrészt a kórokozó ökológiai, taxonómiai és földrajzi eloszlását, valamint patológiai és epidemiológiai jelentőségét hivatott tanulmányozni és követni. 2011-ben Stanek és 11 európai központban dolgozó munkatársai egy összefoglaló véleménycikket közöltek a borreliosis klinikai megjelenési formáinak definíciójáról [5]. Ezt követően az European Centre for Disease Prevention and Control szakértői megjelentettek egy szisztematikus, áttekintő cikket a fertőzést kimutató szerológiai módszerek pontosságáról [1].

A Lyme-szerű borreliosisokat okozó típusok egy családba tartoznak, ezeket gyűjtőnéven *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*Bbsl*) csoport-komplexbe soroljuk [6], ide tartoznak az Észak-Amerikában domináns *Borrelia burgdorferi*, valamint az Európában gyakoribb *Borrelia afzelii* és *Borrelia garinii*, valamint néhány ritkább altípus [6.] Egér modellben kimutatták, hogy a különböző törzsek más-más tropizmusú és fertőzés dinamikával bírnak: a *Borrelia sensu lato* BRE-13 törzs az agyat, a *Borrelia bavariensis* ritka PBI törzse az agyat és a szívet fertőzi meg igen hamar, gyakran már a kullancs-harapás utáni első 12 órában [7]. Típusokon belül az Osp C gén, illetve a 16S–23S rRNS intergén spacer szekvenciák esetén lehet elkülöníteni polimorfizmusokat. Ezek több szempontból is diagnosztikai, illetve klinikai fontossággal rendelkeznek: a genotípusok közt nem mindig áll fenn kölcsönös védelem, tehát lehetséges két egymásutáni fertőzés is; a különböző genotípusok laboratóriumi kimutatása nem egyforma érzékenységű, ezért a szerológiai teszteket az aktuális epitópokra optimalizálni kellene, továbbá, egyes genotípusok virulensebbek, mint mások [8, 9, 10]. Az OspC genotípusok közül az A, B, H, I, K fontos virulencia faktornak számítanak [6]. Az Észak-Amerikában használt RST1 törzs izolátum antigén segítségével a vérben kisebb mértékben jelenlevő, enyhébb gyulladást és betegséget okozó RST2 és RST3 törzsek kevésbé kimutathatóak [11].

Stanek és munkatársai szerint a borreliosis klinikai megnyilvánulásai a következők:

- bőrre lokalizálódó formák: erythema migrans, *Borrelia* lymphocytosis, acrodermatitis chronica atrophicans,
- Lyme arthritis: egy vagy több nagyízületre, általában a térdre lokalizálódó synovitis, ízületi gyulladás,
- váz- és szívizomtünetek: ritkán myositis, endo-, myo-, és pericarditis, ritmuszavarok,
- szemtünetek: uveitis, conjunctivitis, episcleritis, keratitis,

- neuroborreliosis, változatos megjelenési formákkal [5].

A laboratóriumi diagnózis standardja ma is a *Borrelia burgdorferi* kitenyésztése, ám ez igen változó érzékenységű módszer (1–70% között Lyme arthritises, illetve bőrtünetekkel jelentkező betegeken), nehéz, és nem mindenhol elérhető eljárás. A negatív eredmény ily módon nem zárja ki a fertőzést.

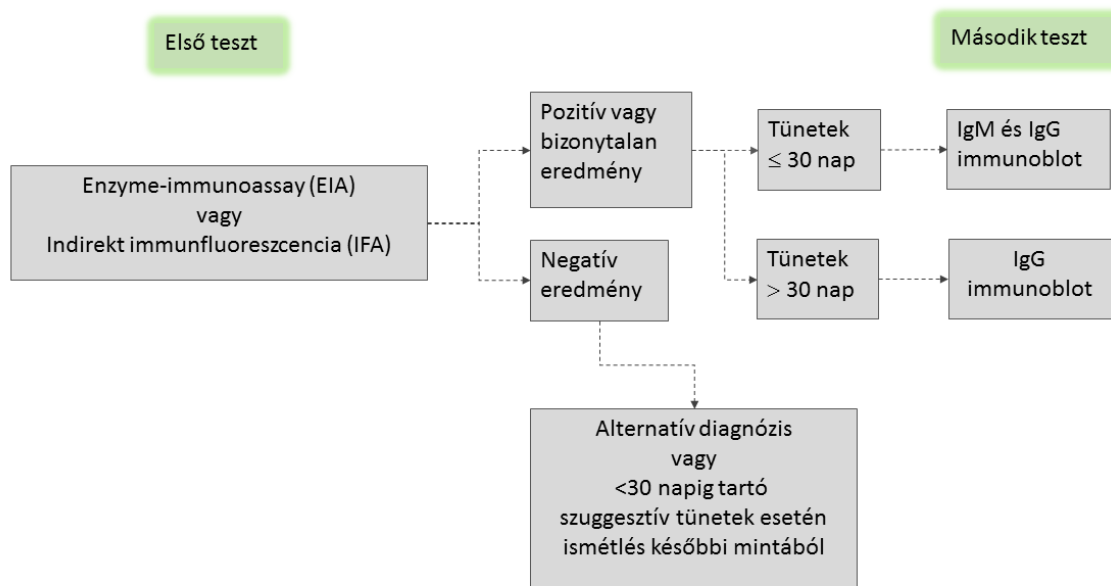
A szerológiai eljárások a mintavétel egyszerűsége, a növekvő szenzitivitás és specificitás és hozzáférhetőségük miatt a legelterjedtebb módszerré váltak [5]. Az erythema migrans és a korai neuroborreliosis nem minden esetben váltanak ki pozitív szerokonverziót. Előbbi esetében ennek a jelentősége korlátozott, mert a diagnózis elsősorban a klinikai tüneteken és a kórtörténeten alapul [12]. A neuroborreliosis diagnosztikájára vonatkozóan pedig Mygland és munkatársai dolgoztak ki ajánlásokat az EFNS (European Federation of Neurological Sciences) részéről [13].

A *Borrelia sensu lato* fertőzés szerológiai diagnózisa a nemzetközi ajánlások szerint kétlépcsős [14]: szűrőtesztnak immun-enzimátikus és immunfluoreszcens antitest kimutatási módszereket, megerősítő módszerként pedig komplex antitest mintázatokat kimutató Western blot (immunoblot) technikát használnak. A szűrőtesztek között az immun-enzimátikus tesztek egyszerűbbek, pontosabbak és kényelmesebben elvégezhetők, legtöbbször azonban csak kvalitatív eredményt szolgáltatnak, amely hozzávetőlegesen tükrözi a valódi antitest-titert [6]. A kétlépcsős diagnosztika ajánlásait több új közlemény foglalja össze tömören (1. ábra) [6,14]. Kéziratunk célja a *Borrelia* ellenes IgM és IgG antitestek konvencionális kétlépcsős meghatározása gyakori buktatóinak rövid áttekintése, a Marosvásárhelyi Megyei Kórház Fertőző betegségek Laboratóriumában szerzett *Borrelia* diagnosztikai tapasztalatok bemutatása, valamint a használt ELISA tesztek teljesítmény mutatóinak ismertetése. (1. ábra)

Anyag és módszer

2.1. A vizsgálat módszerei és célja

2015–2017 között a Marosvásárhelyi Megyei Kórház Fertőző Laboratóriumában 878 esetben végeztünk *Borrelia* szerológiai vizsgálatot, ELISA és Western blot (Immunoblot) módszerrel. A kétlépcsős diagnosztikai elvet csak részben tudtuk érvényesíteni, a járóbeteg



1. ábra. Konvencionális kétlépcsős *Borrelia*-szerológia ajánlásai (Moore és munkatársai, 2016 szerint)

nagy száma, a Western blot aránylag magas szolgáltatási ára, a javallatok részleges indokolatlansága, az ismételt tesztek, a vizsgálatot rendelő szakorvosok algoritmusához való alkalmazkodási hiánya miatt. 372 esetben Virotech ELISA kittel, 506 esetben Mikrogen ELISA kittel végeztünk szűrővizsgálatot, 181 esetben került sor IgM Western blot, és 157 esetben IgG blot analízisre, Mikrogen RecomLine reagens felhasználásával. Jelen vizsgálat célja a szérumból végzett ELISA módszerek teljesítményének (szenzitivitás, specificitás, pozitív és negatív prediktív érték) jellemzése a Western blothoz való viszonyítással, valamint a vizsgálati algoritmus néhány potenciális alkalmazási hibaforrásának áttekintése; a betegek demográfiai adatai, kórelőzménye, klinikai tünetei és kezelési adatai nem kerültek feldolgozásra.

2.2 ELISA módszerek

A használt ELISA reagens minősége az antigén-tartalmat illetően eltérő volt: a Virotech ELISA IgM Test Kit® és *Borrelia* + VlsE IgG Europe ELISA IgG Test Kit® antigén lizátumokat használ, *B. afzelii* PKo törzs, *B. garinii* PBr törzs és *B. burgdorferi* ZS7 törzs antigén keverékét tartalmazza. A Mikrogen ELISA RecomWell *Borrelia* IgM®, IgG® rekombináns, 3 *Borrelia* speciesből származó immundomináns antigén keveréket alkalmaz: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*. Az IgM kit antigének: Osp C, p41, VlsE, míg az IgG kit antigének:

p100, Osp C, VlsE, p18.

A Virotech ELISA *Borrelia* IgM és IgG módszert a gyártó utasításai szerint végeztük, a következőképpen: a reagenset előmelegítve, a mintákat és a kontroll-szérumokat (negatív, cut-off és pozitív) hígító pufferrel 1:100 arányban felhígítva ráértük a microtiter-lemezre, 30 percet inkubáltuk 37°C, majd 350 µL mosópufferrel négy alkalommal mostuk. Mosás után minden lyukba 100 µL anti-humán IgM, illetve anti-humán IgG konjugátumot mértünk, 30 perc inkubálás után négyszer mostuk, és további 30 percig 3,3',5,5'-tetrametil-benzidin (TMB) szubsztrát oldattal fedtük. A reakciókat 50 µL citrát stoppoló oldattal állítottuk le, az abszorbanciát 450 nm hullámhosszon olvastuk.

A Mikrogen RecomWell *Borrelia* IgM és IgG módszerek alkalmazásánál a reagens szobahőre való felmelegítése után a mintákat és a kontroll-szérumokat (negatív, cut-off és pozitív) hígító pufferrel ugyanúgy 1:100 arányban felhígítva kimértük a microtiter-lemezre, 60 percet 37°C-on inkubáltuk, majd 300 µL mosópufferrel négy alkalommal mostuk. Mosás után a lyukakba 100 µL anti-humán IgM, illetve anti-humán IgG torna-peroxidáz konjugátumot mértünk, 30 percet inkubáltuk, majd mosás után lyukanként 100 µL TMB szubsztrátumot mértünk ki, amelyet további 30 percig tartottunk a lemezen. A reakciókat 100 µL stoppoló oldattal állítottuk le és a fényelnyelést 450 nm-en mértük. Mindkét meg-

1. táblázat. Az Immunoblot reakciók értékelési skálája

Antigén	IgM pontszám	IgG pontszám
p100	5	5
VlsE	5	5
p58	4	4
p41	1	1
p39	4	5
OspA	5	5
OspC	8	5
p18	5	5
Összesítés		
≤5	Negatív	Negatív
6	Bizonytalan	Bizonytalan
≥7	Pozitív	Pozitív

határozást automatizált módszer segítségével végeztük, Personal Lab (Adaltis, Olaszország), illetve Virclia ThunderBolt (Virclia, Spanyolország) ELISA készüléken. A betegek antitest titerét a Virotech teszt esetében referencia-szérummal nyert 10 U/mL, a Mikrogen teszt esetében 20 MU/mL cut-off értékhez hasonlítottuk.

2.3. Immunoblot módszer

A megerősítő diagnózisban használt Mikrogen Immunoblot, RecomLine *Borrelia* IgM/IgG több genotípus kimutatására alkalmas: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii* és *B. bavariensis*. A kit rekombináns antigének keverékét használja: Osp C, p18 minden speciesből, p100, p39, p41, P58, VlsE, Osp A. Az immunoblot elektroforézissel szétválasztott antigének elegyét használja szilárd fázisú fóliára rögzítve, ezért az ellenanyagok jelenlétét komplex módon képes értékelni.

A gyártó utasításai szerint, a reagenseket szobahőre melegítettük, a tesztcsíkokat pedig 2 mL hígító pufferben előáztattuk kb. 3 percig, majd tesztcsíkonként minden vályúba felmértünk 40 µL mintát az IgM, illetve 20 µL mintát az IgG antitestek meghatározásához. Egy óras szobahőn való inkubálást, illetve enyhe rázatást követően a tesztcsíkokat 2 mL mosó pufferrel 3 alkalommal 5-5 percig mostuk. Ezután minden vályúba 2 mL hígított anti-humán IgM, illetve anti-humán IgG torma peroxidáz konjugátumot mértünk, 45 percig inkubáltuk, majd az előbbi feltételek szerint a csíkokat háromszor mostuk. Mosás után vályúnként 1.5 mL hígított TMB szubsztrát oldatot vittünk fel, amelyet 8 percig tartottunk a tesztcsíkokon, majd a reakciókat desztillált vízzel való öblítéssel leállítottuk.

Az immunoblot módszernél a kialakult antitest-pozitivitási mintázatra minden minta esetén egy score-t adtunk, amelynek a gyártó által ajánlott értékelése: 0–5 pont–negatív, 6 pont–határérték, ≥7pont–pozitív. A különböző antitestek jelenlétére adott pontszám változó, és a két típus esetén is súlyozott: például az Osp C antigén ellenes antitest pozitivitásra IgM esetén 8 pont jár (ami önmagában elégséges a pozitív blot értékeléshez), IgG esetén csak 5 pont, a VlsE ellenes antitest (általában akut fertőzést mutat) 5 pont, a p41 fehérje ellenes antitest csak egy pontot ér a skálán (**1. táblázat**). A festődő sávok intenzitását össze kell hasonlítani a kontroll sáv intenzitásával, ez vizuálisan vagy szkennelő szoftver segítségével is elvégezhető. Pontszámot csak a kontroll sáv festődésével egyenlő vagy annál intenzívebben jelölődő sávok megjelenésekor adunk.

A Mikrogen Diagnostik szerint a blotting módszerrel kimutatott IgM és IgG antitestek összesített szenzitivitása erythema migransra 79%, Lyme arthritisre 96%, neuroborreliosisra 100%, míg specificitása 100%.

Eredmények

3.1. ELISA eredmények

A *Borrelia* ellenes antitestek kimutatására szolgáló immunen-zimatis mérés nagyobb részét Mikrogen ELISA, illetve egy kisebb hányadát Virotech ELISA módszerrel végeztük. A két gyártó módszertana viszonylag különbözik, úgyszintén a referencia-tartományok is különböznek. Az átlagértékekre és szórásra, valamint a teljes mért tartományra vonatkozó adatokat az **2. táblázat**ban mutatjuk. Ezekből kiolvasható, hogy a Virotech módszer átlagai az enyhén pozitív tartományban (IgM esetén),

2. táblázat. Az immun-enzimatis meghatározások leíró statisztikája

	Átlagérték ± SE	Min–Max érték	Referencia- tartomány
Virotech			
IgM (n=372)	11,47 ±0,84	0,88–175,83	0–9
IgG (n=266)	10,40 ±0,86	0,40–77,96	0–9
Mikrogen			
IgM (n=506)	15,93 ± 1,45	0,76–296,65	0–20
IgG (n=370)	17,11 ±1,70	0,81–140,48	0–20

Az értékek VU/mL (Virotech), illetve MU/mL (Mikrogen) formában vannak feltüntetve

illetve a határérték-tartományban (IgG esetén) vannak, ezzel szemben a Mikrogen módszer átlagai mindkét antitest típus esetén negatív tartományban maradtak. A pozitivitási hányad a két módszer esetén összehasonlítható volt (33,3% vs. 27,9% IgM antitest esetében, illetve 21,8% vs. 20,8% IgG esetében). Az eredmények minőségi megoszlását és fontosabb mennyiségi jellemzőit a **3. A** és **3.B táblázatok** mutatják be.

3.2. Immunoblot eredmények

Ezt a meghatározást a teljes vizsgálati periódusban kizárólag a Mikrogen Recomblot IgM/IgG kit segítségével végeztük. A második vonalbeli diagnosztikában használt módszer az IgM antitestekre vonatkozóan az esetek 21,5%-nál, míg az IgG antitestekre vonatkozóan 22,9%-nál mutatott pozitivitást. A határérték pontszámú mintákat nem állt módunkban újra tesztelni. A legmagasabb összesített pontszám az IgM esetén 32, az IgG esetén 25 pont volt. A betegek mintegy háromnegyede negatív értékelést kapott, ami 0–5 összesített pontszám esetén jár (abban az esetben, ha reakció, vagy ha alacsony pontszámú, kevésbé fajlagos ellentestek mutathatók ki). Az eredményeket a **4. táblázat** összesíti.

3.B. táblázat. Az eredmények kvalitatív eloszlása

	Mikrogen IgM ELISA	Mikrogen IgG ELISA
Kategória	mintaszám	mintaszám
Negatív	334 (66,0)	283 (76,5)
Határérték	31 (6,1)	10 (2,7)
Pozitív	141 (27,9)	77 (20,8)
Összes	506 (100)	370 (100)

Az eredmények abszolút szám és százalék (zárójelben) formájában kerültek feltüntetésre

3.A. táblázat. Az eredmények kvalitatív eloszlása

	Virotech IgM ELISA	Virotech IgG ELISA
ELISA eredmény	mintaszám	mintaszám
Negatív	211 (56,7)	184 (69,2)
Határérték	37 (9,9)	24 (9,0)
Pozitív	124 (33,3)	58 (21,8)
Összes	372 (100)	266 (100)

Az eredmények abszolút szám és százalék (zárójelben) formájában kerültek feltüntetésre.

4. táblázat. Az immunoblot eredmények minőségi eloszlása

	IgM Recomblot	IgG Recomblot
Kategória	mintaszám	mintaszám
Negatív	135 (74,6)	118 (75,2)
Határérték	7 (3,9)	3 (1,9)
Pozitív	39 (21,5)	36 (22,9)
Összes	181 (100)	157 (100)

3.3. ELISA performancia vizsgálat

Mivel a szakirodalomban az ELISA és egyéb immunoenzimátikus, fluoreszcens vagy kemilumineszcens módszerek szűrőtesztként ajánlottak, de a diagnosztikai értéket mutató adatok jelentős heterogenitást mutatnak, megvizsgáltuk a Mikrogen ELISA tesztek performancia jellemzőit, referencia-módszerként használva az immunoblot tesztek eredményeit, 60, illetve 52 olyan betegnél, akik esetében előbb ELISA, majd a diagnózis pontosítása érdekében blot meghatározást végeztünk. A szenzitivitás, specificitás, pozitív és negatív prediktív értékek a **5.A** és **5.B. táblázatokban** láthatók.

3.4. Példák komplex immunoblot antitest mintázatokból

A **2. ábrán** néhány jellegzetes immunoblot mintázatot mutatunk be. A pozitív immunoblot eredményeknél gyakori volt a többszörös, immundomináns antigénekkel szembeni antitestek jelenléte (2. B, C, D, E sávok). A p100, VlsE, OSpC és p18 fehérje ellenes antitestek gyakran együttesen jelentkeztek. Az IgG esetében ezekre 5-5 pont jár az értékelésben, tehát önmagukban nem elegendőek a 7 pontos pozitivitási küszöb eléréséhez, de halmazott festődés esetén ezek az ellentestek magas

5. A. táblázat. Az ELISA eredmények érzékenysége, fajlagossága és prediktív értéke

IgM (n=60)	Immunoblot	
ELISA	Negatív	Pozitív
Negatív	34	4
Pozitív	7	15
Szenzitivitás (%)	78,95	54,43–93,95
Specificitás (%)	82,93	67,94–92,85
PPÉ (%)	68,18	51,22–81,39
NPÉ (%)	89,47	77,87–95,36

Az értékek abszolút számban, illetve százalékarányban vannak kifejezve. PPÉ – pozitív prediktív érték, NPÉ – negatív prediktív érték

5. B. táblázat. Az ELISA eredmények érzékenysége, fajlagossága és prediktív értéke

IgG (n=52)	Immunoblot	
	Negatív	Pozitív
ELISA		
Negatív	36	2
Pozitív	4	10
Szenzitivitás (%)	83,33	51,59-97,91
Specifititás (%)	90,00	76,34-97,21
PPÉ (%)	71,43	48,82-86,76
NPÉ (%)	94,74	83,49-98,46

Az értékek abszolút számban, illetve százalékarányban vannak kifejezve. PPÉ – pozitív prediktív érték, NPÉ – negatív prediktív érték

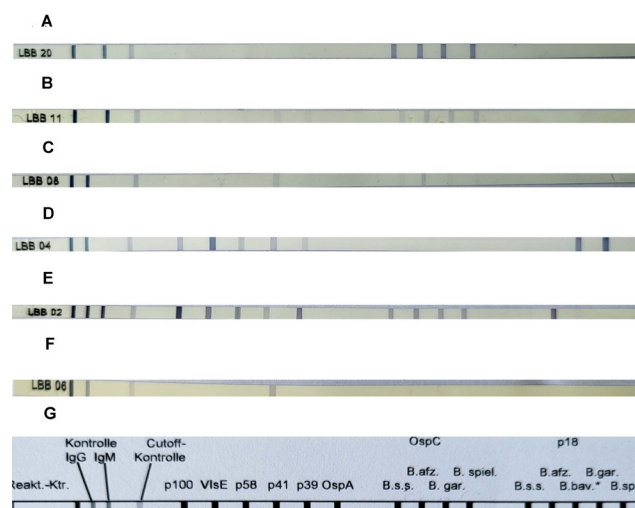
pontszámot kölcsönöznek a mintának. Az IgM esetében egyszerű pozitívítást általában az OspC reaktivitás okozott (erre 8 pont jár az értékelésben). Érdekeséggéppen, számos pozitív mintánál találtunk többszörös, *Borrelia sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmannii* ellenes anti-OspC pozitívítást (például az A és B mintáknál). A gyártó a törzsekkel kapcsolatos keresztreaktivásról nem közölt adatokat, ezek hiányát feltételezve felmerül, hogy a jelzett esetekben többféle patogén törzsszel való fertőzés történt (egyidejűleg vagy egymás után). A p41 fehérje, vagy flagellin nemcsak a Spirochaetákra, hanem más csillós baktériumokra jellemző, újabb adatok szerint immunmoduláló hatása [15]. Szoliter p41 fehérje-reaktivitás a Virotech és a Mikrogen IgM kitek esetén ELISA pozitívítással is szövődhethet, ez az álpozitív ELISA reakciók egyik gyakori oka. Osp A reaktivitást egyetlen mintánál sem találtunk (2. ábra).

Megbeszélés

4.1. Diagnosztikai buktatók – A szerológiai vizsgálat időzítése és az antitest-titer változásai és azok értékelése

A *Borrelia* fertőzés igazolásában, a kórokozó közvetlen kimutatásának nehézségei miatt a szerológia első vonalbeli lehetőség marad. A laboratóriumi vizsgálatok helyes időzítése elsődlegesen fontos: a fertőzés első egy-két hetében az ellenanyagok kimutatása többnyire eredménytelen, a közvetlenül ezután következő periódusban viszont a kétlépcsős szerológiai diagnosztika jó érzékenységgű és fajlagosságú. Az IgM-IgG izotípusváltás aránylag gyorsan bekövetkezik, miáltal az IgG antitestek is hamar megjelennek.

A neuroborreliosis igazolására a szérumvizsgálat mel-



2. ábra. Példák a *Borrelia* immunoblot eredményekből. A – többszörös Osp C IgM pozitívítás, B – többszörös Osp C és p41 IgM pozitívítás, C – Osp C (*Borrelia afzelii*) és p41 pozitívítás, D – komplex kettős IgM+IgG pozitívítás, Osp C reaktivitás nélkül; E – komplex IgG pozitívítás, Osp C reaktivitással; F – izolált p41 IgG jelenléte, G – azonosító kontroll sáv. Az immunoblot módszer molekulatömegük és egyéb fiziko-kémiai tulajdonságaik szerint szétválasztott fehérje-antigének elleni reakciót minden esetben lebontva mutatja, lehetővé téve a szeropozitivitás súlyozását.

lett a liquor antitest-vizsgálat elvégzése is indokolt, bár előrehaladott betegség esetén a szérumban is magas az antitest titer, amely mindkét módszer segítségével kimutatható [16]. Ez akár az első hat hétben is álnegatív lehet [13]. Korai vizsgálatokban kimutatták, hogy eredményes kezelés után hónapokig, sőt akár évekig fennállhat az antitest pozitívítás [17]. Hammers-Berggren és munkatársai 30 erythema migransban, illetve 91 neuroborreliosisban szenvedő beteget vizsgáltak, 9 évig terjedő utánkövetéssel. A *Borrelia* ellenes IgM és IgG kimutatásához ELISA tesztet és csilló-antigént használva, 30 erythema migransban a fertőzés elején magas IgM és alacsonyabb IgG titeret találtak, az IgM antitestek az esetek 70%-ban voltak pozitívak. Az erythema migrans csoportban 9-9 betegnek volt izolált IgM, illetve IgG pozitív antitestje. Az átlagosan három éves követés során 17 esetben az IgM negatívra váltott, de 4 esetenél még 17 hónap után is pozitív titeret mértek. Az IgG esetén a 21 szeropozitív eset 57%-a (12 eset) maradt pozitív 5 év után is. A neuroborreliosisos esetek közül 10 csak IgM pozitívítást, 53 IgM+IgG kettős pozitívítást mutatott, míg 28 betegnek csak IgG antitestjei voltak, általában alacsonyabb IgM, illetve magasabb IgG

koncentrációval a fertőzés elején. Az összesen 9 évig terjedő követés során az IgM titer a betegek 75%-nál, az IgG pedig 67%-nál csökkent negatív tartományba. 23 szövődményes, illetve maradványtüneteket mutató beteg közül csak egynek volt perszisztáló magas IgM, míg 9 betegnek perszisztáló magas IgG értéke [17].

A szerológiai vizsgálatoknak ilyen módon fontos szerepe lehet a diagnózis felállításában, de a kezelés eredményességének értékelésében zavaró tényező a változó tartamú immunmemória, mely miatt nehezen azonosítható a perszisztáló és a potenciális újrafertőződés. A konvencionális módszerek mellett felmerült az IgG aviditás teszt szükségessége, amely elméletileg különbséget tehetne az alacsony aviditású IgG termelődésével járó, friss fertőzések, valamint a magas aviditású, érett IgG antitesttel jellemezhető késői stádiumok között. Az újrafertőzésekben tapasztalt értékelési nehézségek, valamint az ilyen reagenst gyártó cégek hiánya miatt a módszer egyelőre nem terjedt el. Egyes adatok szerint az aktivált T-limfociták által termelt γ -interferon felszabadulás mérése is hasznos lehet az aktív és a volt, de eredményesen kezelt fertőzéssel társuló szeropozitív elkülönítésében. A CXCL13 chemokin meghatározása az aktív idegrendszeri gyulladás meghatározásában segíthet [6].

Egy bulgáriai tanulmány 219 erythema migranssal jelentkező esetről, a betegség kezdete után két hónapig dinamikájában vizsgálta az IgM és az IgG antitestek szintjét, és jelentős hányadban szeronegativitást írt le (63% az első tíz napban, 24% két hónap után). Az első tíz napban végzett vizsgálatok 28%-ban mutattak ki IgM, 6%-ban IgM+IgG, 3%-ban csak IgG pozitivitást, míg két hónapnál ez az arány 55%, 5%, illetve 16% volt. Egy évvel az antibiotikum terápia után a betegek 10%-nál írtak le IgM, valamint 38%-nál IgG reaktivitást, az előbbiekből 4 esetről semmiféle társult klinikai tünet nem volt [18].

Kannian és munkatársai antibiotikum-refrakter és reszponzív, valamint a nem kezelt Lyme-arthritis betegek csoportok IgG ellenanyag-mintázatait hasonlították össze, antigénként *Borrelia burgdorferi* ultrahangos kezeléssel nyert lizátumot, valamint sejtfelszíni lipoproteineket (DbpA, VlsE C6 peptide, OspA, and Arp) és ELISA technikát használva. A kezelt csoport ellenanyag koncentrációja 2–5 évig magas maradt, a refrakter csoportnál a medián titer a hosszú antibiotikus kezelés ellenére az első három hónapban enyhén növekedett, míg az eredményesen kezelt csoportnál egy-három hónapig stagnált, vagy csökkent [19].

Egyes esetekben az antibiotikum terápiát szokatlanul

hosszú ideig szükséges folytatni a tünetek enyhüléséig vagy megszűnéséig. Moysa és munkatársai leírtak egy nehezen diagnosztizált, többféle immun-enzimatis tesztrel különböző eredményeket mutató, nagyon változatos tünetekkel jelentkező betegnél tapasztalt antibiotikum-rezisztenciát. Az írországi beteg amerikai utazás után, eredetileg erythema migrans-sal, progresszív izomfájdalmakkal, vándorló arthritissel, koncentrációs zavarokkal jelentkező családorvosánál. Az első, hét hétig tartó, napi 2x100mg doxycyclin kezelés eredménytelen volt, a beteg tünetei igen változatossá váltak: intenzív fáradtság, hasi fájdalom, ízületi fájdalmak, nyomasztó izomfájdalmak, görcsök, erős fejfájás, zavarodottság és gondolkodási nehézségek, koncentrációs és olvasási nehézségek, alvászavarok jelentkeztek. További két hónap pos clarithromycin, rifampicin, és lymecycline kezelésre a tünetek jelentős része megszűnt [20].

Saját eredményeink eloszlási mintázata aránylag alacsony pozitívítási arányt mutat: 28–33%-os az IgM, 22–23%-os az IgG típusú antitestek ELISA típusú kimutatása esetén. Az alcsoporthoz, akik esetében blot meghatározást is végeztünk, a pozitív tesztek aránya 21–23% volt, hasonló az IgM és IgG antitestek esetében. Az alacsony pozitívítási arány felveti a vizsgálat helyes időzítésének problémáját. Nem végeztünk elemzést a tünetek megjelenésének, a fertőzés feltételezett diagnózisának, valamint a vérminta vételének időpontjai közötti összefüggésekről, amelyek hiányában további következtetéseket lehetetlen levonni.

4.2. Diagnosztikai buktatók – antigén variabilitás és a diagnosztikai tesztek változó karakterisztikái

A korai, úgynevezett első generációs ELISA tesztek ultrahangos kezeléssel előállított sejt-lizátumot használtak antigén egyveleg gyanánt. Ezek a tesztek nem tartalmaztak stabil koncentrációban a fertőzés különböző stádiumaira jellemző immundomináns, multiplex antigéneket, mint például a VlsE fehérjét. A ma használatos második generációs tesztek közt is heterogenitás van, egyesekben extrahált, másokban rekombináns antigéneket használnak, mint például az Osp C, Osp A, VlsE, illetve az Osp C és a VlsE domináns epitópjai, a C10 és a C6 peptid [21]. Második lépésben, a Western blot (immunoblot) technikában poliakrilamid gélen szétválasztott antigén elegyet használnak, amelynek az az előnye van, hogy egyszerre értékelhető a teljes antitest profil, amelyen látszik, hogy a fennálló antitest termelés immundomináns, vagy kevésbé jelentős, és csökkent fajlagosságú antigének ellen irányul.

A *Borrelia* korai, immundomináns antigénjei közé tartozik a kórokozó külső sejt felszínén exponált külső felszíni fehérje C (OspC; molekuláris tömege 21–25 kDa) és a változó fő fehérje (VMP) -szerű expresszált szekven-
cia (VlsE; molekulatömege 34–35 kDa), valamint a 41 kDa nagyságú flagelláris fehérje (p41/flagellin/FlaB) [6]. Egyéb magas antigenitású kórokozó-fehérjék, amelyek a korai fertőzés során immunválaszt válthatnak ki: a 37 kDa nagyságú flagelláris fehérje (FlaA), a dekorinkötő fehérje (Dbp) A és B, RevA, p66, BBK07, BBK32, BBG33, LA7, BmpA, FliL és több más fehérje is. Microarray vizsgálatokkal kimutatták, hogy az Amerikai Egyesült Államokban Lyme arthritisben szenvedő egyének szérumban levő antitestek legalább 89, elsősorban felszíni antigénnel reagálnak. A jelen diagnosztikai ajánlások az eredményes tesztelés érdekében kiemelten hangsúlyozzák a multiplex, immundomináns antigének alkalmazásának fontosságát [6].

4.3. A laboratóriumunkban végzett *Borrelia* szerológiai tesztek teljesítmény-mutatói

Guerin és munkatársai leírták néhány második generációs szűrőteszt teljesítmény mutatóit. Ezek a fertőzés kezdeti fázisaiban általában alacsonyabb érzékenységet és fajlagosságot mutatnak, például a VlsE C6-epitópot tartalmazó ELISA erythema migrans és korai Lyme-borreliosis kimutatására az Amerikai Egyesült Államokban 29%-os szenzitivitást és 96%-os specificitást, Európában 65–68%-os szenzitivitást és 91–92%-s specificitást ért el. Az Enzygnost C6® ELISA teszt érzékenysége 78%, fajlagossága 96%, míg a VlsE pepC10 teszt szenzitivitása 51%, specificitása 94–95%. Ebben a felmérésben a dot-blot módszer érdekes módon magas szenzitivitású (96%), de a fajlagossága gyenge (35%). Ugyanakkor a késői neurológiai tünetek, carditis, arthritis kimutatásában mindegyik új generációs szűrőteszt jó teljesített, 88–100% közötti érzékenységgel, és 95% feletti fajlagossággal [21].

Egy másik, korai vizsgálatban antigénként a VlsE antigén 26-mer szintetikus peptidjét használó ELISA a fertőzés akut, felépülési és késői stádiumában 74%, 85%, illetve 100% szenzitivitást, és 62–99% közti specificitást ért el [22]. Leeflang és munkatársai egy, az EMBASE és Medline adatbázisokban fellelhető, referencia-standardot használó 75 publikáción végzett metaanalízisben érdekes, az eddigieknek általában ellentmondó eredményekre jutottak. A különböző borreliosis formákra vonatkozóan a szerológiai (ELISA és/vagy blot) tesztelés érzékenysége erythema migransra vonatkozóan 50%, neuroborrelio-

sisra 77%, acrodermatitis chronica atrophicansra 97 %, míg nem pontosított formájú Lyme-kórra vonatkoztatva 73% volt, a fajlagosság az erythema migransra, neuroborreliosisra és általában a Lyme-kórra vonatkoztatva 90–99% között mozgott. A rekombináns antigéneket használó tesztek mutatói nem voltak jobbakk a tisztított, vagy teljes sejt-lizátumot alkalmazó tesztekénél. Ezen tanulmány szerint a laboratóriumokban és a kereskedelmi gyártóknál készített ELISA tesztek teljesítmény mutatói összehasonlíthatók az immunoblot teljesítményével, és a kétlépcsős diagnosztika nem nyújtott gyakorlati előnyt a diagnózis felállításában [23]. Ellentmond ennek, hogy Ang és munkatársai nyolc különböző ELISA tesztet és ötféle, teljes sejt-lizátumot és rekombináns antigéneket alkalmazó blot vizsgálatban mindössze 34–59%-os érzékenységet találtak, és 89 mintából több olyat is találtak, amelyekre mindegyik ELISA módszer álnegatív tesztet eredményezett [24]. Egy másik, Észak-Amerikai tanulmányokat összefoglaló meta-analízis a kétlépcsős szerológiai diagnosztikát eredményesebbnek mutatta egyéb protokolloknál, és a Centre of Disease and Prevention ajánlása is ez maradt [25].

Saját eredményeinket tekintve, az ELISA tesztek szenzitivitása és specificitása elfogadható tartományba esett. Az IgG antitestek ELISA-val való kimutatásának érzékenysége és annak fajlagossága felülmúlta az IgM ellenanyagokét: 83,3% vs. 78,9%, illetve 82,9% vs. 90%. Az ELISA tesztek negatív prediktív értéke jobb volt, mint a pozitív prediktív érték: 89,7% az IgM, illetve 94,7% az IgG esetében, illetve 68,2% és 71,4%. Ezeket az eredményeket ugyanazon gyártótól származó tesztekkel értük el, amelyek immundomináns, rekombináns antigénekre épültek. Megjegyzendő, hogy ezeket a teljesítmény-jelzőket a borreliosis összesített kórformáira számítottuk ki, viszont nem vizsgáltuk külön a már említett megjelenési formákat. A fenti mutatók a diagnosztikai alkalmasság kritériumait teljesítik, a pozitív prediktív érték-viszonyokat viszont mindenkor szem előtt kell tartania az immunenzimatis tesztet megrendelő szakorvosnak. Eredményeink azt mutatják, hogy az ELISA módszer egyszerűbb és olcsóbb szűrőtesztként indokolt. A referencia módszerként használt immunoblot módszer kombinált diagnosztikai érzékenysége és fajlagossága a gyártó szerint Lyme arthritisre és neuroborreliosisra vonatkozóan kiváló, ezért második lépcsőben javasolt elvégezni. Megjegyezzük, hogy tanulmányunkban nem vizsgáltuk az egyes betegeknek a két tesztelés között eltelt időt, az immunoblot eredmények különböző klinikai tünetek-

kel való korrelációit, sem a kezelés utáni szerokonverzió hányadát, amelyek segítségével jobban megítélhető volna a kétlépcsős diagnosztika valódi klinikai jelentősége.

Következtetések

A szerológiai vizsgálatok a *Borrelia* fertőzés igazolásában fontos diagnosztikai eszközök. Aránylag nagy számú eredmény eloszlás-mintázatán a negatív tesztek túlsúlyát tapasztaltuk, az ELISA és az immunoblot tesztelésben egyaránt. Tanulmányunkban az IgM és IgG ellentestek meghatározására végzett ELISA tesztek teljesítmény mutatói megfelelőnek, és más szakirodalmi adatokkal összehasonlíthatónak bizonyultak. Az álpozitív, illetve álnegatív ELISA eredmények hányadának csökkentésében mindkét reakció típusban fontos az immundomináns, fajlagos antigének használata. Mivel az ELISA szenzitivitása elfogadható, az immunoblot pedig a szakirodalmi adatok tükrében a szövődményes esetek kimutatásában eredményes, a tanulmányunkban kimutatott alacsony pozitivitási arány miatt felmerül a tesztelés helyes javallatának, illetve időzítésének szükségessége.

Rövidítések jegyzéke

- ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay
- EMBASE – Excerpta Medica dataBASE
- IgG – immunglobulin G
- IgM – immunglobulin M
- Osp C – outer surface protein C
- Osp A – outer surface protein
- p100 – *Borrelia burgdorferi* p100 protein
- p18 – p18 protein
- p39 – p39 protein
- p41 – p41 protein, flagellin
- p58 – p58 protein
- RST1 – ribosomal RNA intergenic spacer type 1, Osp C A genotípus
- RST2 – ribosomal RNA intergenic spacer type 2, Osp C K genotípus
- RST3 – ribosomal RNA intergenic spacer type, Osp C I genotípus
- VlsE – variable major protein-like sequence, expressed

Irodalom

(lásd az angol nyelvű cikk végén)