

Specyfika badania EliSpot

Materiały informacyjne

Autor: dr hab. n. med. Tomasz Wielkoszyński, profesor nadzw. WSPS

- *Test EliSpot 2 w diagnostyce boreliozy*
- *Testy EliSpot w diagnostyce innych zakażeń przenoszonych przez kleszcze*

Zasada testu ELISpot (Enzyme-linked Immunosorbent Spot Assay) polega na pomiarze ilości zaktywowanych przez antygen limfocytów T efektorowych.

Badanie wykonywane jest w hodowli limfocytów, które po aktywacji swoistym antygenem (np. antygenami krętkowymi) wydzielają cytokiny. W przypadku diagnostyki chorób zakaźnych, w teście ELISpot badamy najczęściej wydzielanie interferonu gamma. Bardziej rozbudowane testy ELISpot oceniają wydzielanie dwóch (np. interferonu gamma + interleukiny 2) lub nawet trzech cytokin jednocześnie, co pozwala na bardziej precyzyjną ocenę etapu zakażenia lub jego aktywności.

Etapy badania metodą ELISpot obejmują:

- ✓ Izolację limfocytów z krwi obwodowej pacjenta, ich płukanie, określenie ich liczby, czystości i żywotności oraz kolejno zawieszenie ich w odpowiedniej pożywce, która zapewni im dobre warunki życia w trakcie badania.
- ✓ Założenie hodowli limfocytów w specjalnej płytce, której dno pokryte jest błoną z unieruchomionymi przeciwciałami dla oznaczanej cytokiny (np. interferonu gamma). Hodowlę prowadzi się w kilku dołkach płytki, przy czym do każdego dołka dodawany jest inny antygen (np. lizat krętków *Borrelia burgdorferi*, oczyszczone białka tej bakterii lub antygeny innych bakterii, wirusów lub grzybów). Jednocześnie prowadzona jest hodowla w czystej pożywce (bez dodatku antygenów, czyli tzw. kontrola negatywna) oraz hodowla w obecności substancji nieswoiście aktywujących limfocyty T (np. lektyny ze szkarłatki lub fasoli) – jest to tzw. kontrola dodatnia, w której oceniamy żywotność i zdolność limfocytów do aktywacji. W trakcie prowadzenia hodowli (zazwyczaj przez 24 godziny) limfocyty T, jeśli wcześniej (tzn. w organizmie pacjenta) miały kontakt z danym antygenem, ulegają aktywacji i wydzielają cytokiny. Związki te od razu (w miejscu powstawania) reagują z przeciwciałem unieruchomionym na membranie i łączą się z nim (następuje to lokalnie w miejscu, gdzie „leży” dana komórka).
- ✓ Po zakończeniu hodowli, limfocyty są usuwane, a do płytki dodaje się przeciwciało połączone ze znacznikiem (w zależności od wersji testu ELISpot może to być enzym lub substancja fluoryzująca). W miejscu, gdzie leżała zaktywowana komórka, przeciwciało to łączy się z cząsteczką cytokiny unieruchomionej już na membranie z użyciem pierwszego przeciwciała. Ostatecznie dowodem obecności zaktywowanej komórki jest plamka barwna lub fluoryzująca.

- ✓ Ostatnim etapem testu jest odczyt – pomiar ilości plamek. Ich ilość świadczy o ilości zaktywowanych przez dany antygen limfocytów T. Wynikiem badania jest tzw. indeks stymulacji (SI), czyli stosunek ilości plamek w dołku z antygenem do ilości plamek w dołku kontrolnym (limfocyty niestymulowane antygenem, czyli kontrola negatywna).

Wybór antygenów

Poza wyborem właściwej cytokiny do badania (np. interferon gamma) bardzo ważnym czynnikiem wpływającym na użyteczność kliniczną (wiarygodność) testów EliSpot jest wybór antygenów stosowanych do stymulacji limfocytów. Stosowanie pełnych lizatów bakteryjnych (uzyskanych z ultrasonatów krętków *Borrelia burgdorferi*) może powodować nieswoistą aktywację limfocytów i dostarczać przez to fałszywie dodatnich wyników badania. Stosowane lizaty zawierają bowiem nie tylko antygeny swoiste dla krętka (np. białka OspA, OspC, p100, p39, p18), ale również białka (antygeny) nieswoiste (np. białka szoku cieplnego - HSP).

Uzyskując więc dodatnią reakcję z takim antygenem nie będziemy wiedzieć, który z antygenów wchodzących w skład mieszaniny antygenowej w rzeczywistości zaktywował komórki (swoisty czy nieswoisty). Dlatego konieczne wydaje się stosowanie do stymulacji limfocytów tylko antygenów swoistych, czyli wysokoczystyszczonych antygenów natywnych lub antygenów rekombinowanych (otrzymanych metodami inżynierii genetycznej).

Zastosowanie znajdują tu również antygeny peptydowe (krótkie, kilkunastoaminokwasowe fragmenty antygenów reprezentujące ich immunodominujące epitopy). Zastosowanie takich antygenów zapewnia pożądaną, wysoką swoistość testu i zapobiega uzyskiwaniu fałszywie dodatnich wyników badania.

Zalety diagnostyczne testu EliSpot

Test EliSpot oceniający wydzielanie interferonu gamma służy do wykrywania zakażeń krętkiem *Borrelia burgdorferi* i innych zakażeń przenoszonych przez kleszcze (ale również pozostałych zakażeń) na poziomie komórkowym. Jest to generacja testów EliSpot, która dostarcza cennych informacji nt. aktywności infekcji, podczas gdy tradycyjne testy laboratoryjne w boreliozie i koinfekcjach opierają się na wykrywaniu przeciwciał (oceniają tzw. odporność humoralną) i tylko pośrednio informują o aktywności zakażenia.

Tradycyjnie testy EliSpot i LTT uważane są za jedne z najlepszych badań laboratoryjnych przydatnych do oceny aktywności zakażeń bakteryjnych (np. gruźlicy), wirusowych, grzybiczych i pasożytniczych. Test EliSpot stosowany w diagnostyce gruźlicy (np. test TB-spot) zalecany jest jako nieinwazyjna metoda oceniająca kontakt z prątkami gruźlicy typu ludzkiego i jego wykonanie ujęte jest w oficjalnych rekomendacjach WHO dotyczących diagnostyki gruźlicy.

Poza rutynową diagnostyką boreliozy, zastosowanie testów oceniających odpowiedź typu komórkowego (testy EliSpot i LTT) w boreliozie i innych zakażeniach przenoszonych przez kleszcze, może mieć szczególne znaczenie w przypadkach trudnych diagnostycznie, np. w przypadkach boreliozy seronegatywnej (pacjenci z negatywnymi wynikami badań serologicznych lub z defektami odpowiedzi humoralnej, np. z niedoborem immunoglobulin). Po leczeniu antybiotykowym wyniki testów EliSpot normalizują się znacznie szybciej niż wyniki testów serologicznych, co powoduje, że metoda EliSpot zalecana jest jako metoda z wyboru do kontroli skuteczności leczenia.

Istnieją również doniesienia naukowe sugerujące, że pozytywne wyniki testów EliSpot w boreliozie pojawiają się nieco szybciej po pierwotnym zakażeniu niż swoiste przeciwciała. Okres ten wynosi ok 3-4 tygodnie (w porównaniu do 4-6 tygodni okna serologicznego).

Wskazania do wykonania testu EliSpot

Wskazania do wykonania testu EliSpot obejmują:

- ✓ Rutynową diagnostykę choroby z Lyme (lub koinfekcji). Badanie metodą EliSpot powinno być wykonane równoległe z badaniami serologicznymi, a wyniki obu testów interpretowane łącznie z obrazem klinicznym.
- ✓ Diagnostykę boreliozy u pacjentów seronegatywnych (tj. u takich, u których wyniki testów serologicznych nie pozwalają na rozpoznanie zakażenia i pozostają ujemne).
- ✓ Diagnostykę boreliozy u pacjentów z nierozstrzygającymi wynikami badań serologicznych (np. powtarzalnie granicznymi wynikami testów immunoblot lub IgG-pozytywnymi i IgM-negatywnymi), u których na podstawie obrazu klinicznego podejrzewane jest aktywne zakażenie o etiologii *Borrelia burgdorferi* s.l.

- ✓ Diagnostykę boreliozy u pacjentów z niedoborami immunoglobulin (niedoborem IgG lub podklas IgG).
- ✓ Diagnostykę boreliozy u pacjentów leczonych preparatami immunoglobulin ludzkich (preparaty IVIG mogą prowadzić do uzyskiwania fałszywie pozytywnych wyników testów serologicznych).
- ✓ Kontrolę skuteczności leczenia antybiotykowego lub naturalnego (badanie EliSpot można wykonać po ok. 6 tygodniach od zakończenia antybiotykoterapii).

Różnice w diagnostyce i zalety testów EliSpot

Testy oceniające odpowiedź komórkową, poprzez wykrywanie specyficznych limfocytów T efektorowych, oceniają aktywność zakażenia. W przeciwieństwie do badań serologicznych, których wyniki mogą pozostawać dodatnie przez wiele miesięcy, a nawet lat po wygaszeniu aktywności zakażenia (np. zjawisko przetrwałej produkcji specyficznych przeciwciał IgM lub wieloletnie, dodatnie wyniki w klasie IgG), testy EliSpot oceniają aktualną sytuację immunologiczną organizmu.

W przypadkach defektów odpowiedzi humoralnej (np. niedoborów immunoglobulin) testy komórkowe, w tym testy EliSpot, mogą dostarczać nieocenionych informacji diagnostycznych, pozwalając na postawienie właściwego rozpoznania i podjęcie leczenia przyczynowego.

Reasumując więc, metoda EliSpot pozwala na ocenę aktualnego statusu zakażenia (aktywne czy nieaktywne) i pozwala na planowanie dalszych etapów leczenia.

Czym różni się **EliSpot 2** od tradycyjnego testu EliSpot?

Jak wspomniano wyżej kluczową sprawą w diagnostyce boreliozy z Lyme jest zapewnienie wysokiej specyficzności wyniku testu EliSpot. W tym celu zmodyfikowaliśmy dotychczas wykonywany test EliSpot wprowadzając do niego dodatkowe i specyficzne antygeny krętkowe.

Obecnie oferowany test EliSpot 2 Borrelia ocenia reakcje dla następujących antygenów krętka Borrelia burgdorferi:

- ✔ lizat natywnych krętków Borrelia burgdorferi sensu stricto (szczep B31),
- ✔ OspC mix (mieszanina rekombinowanych białek OspC z 3 genogatunków krętka: B. burgdorferi ss, B. afzelii i B. garinii),
- ✔ VlsE mix (mieszanina rekombinowanych białek VlsE z 3 genogatunków krętka: B. burgdorferi ss, B. afzelii i B. garinii),
- ✔ antygen OspA (rekombinowany),
- ✔ antygen p41i (wewnętrzny fragment flageliny – w przeciwieństwie do pełnej cząsteczki białka p41, specyficzny dla krętka Borrelia burgdorferi s.l.),
- ✔ peptyd LFA-1.

Tak dobrane spektrum antygenów krętkowych pozwala na dokładniejszą ocenę specyficznej odpowiedzi komórkowej w boreliozie. Ze względu na wykorzystanie rekombinowanych antygenów krętka (poza lizatem szczepu B31), uzyskane wyniki cechują się wyjątkowo wysoką specyficnością.

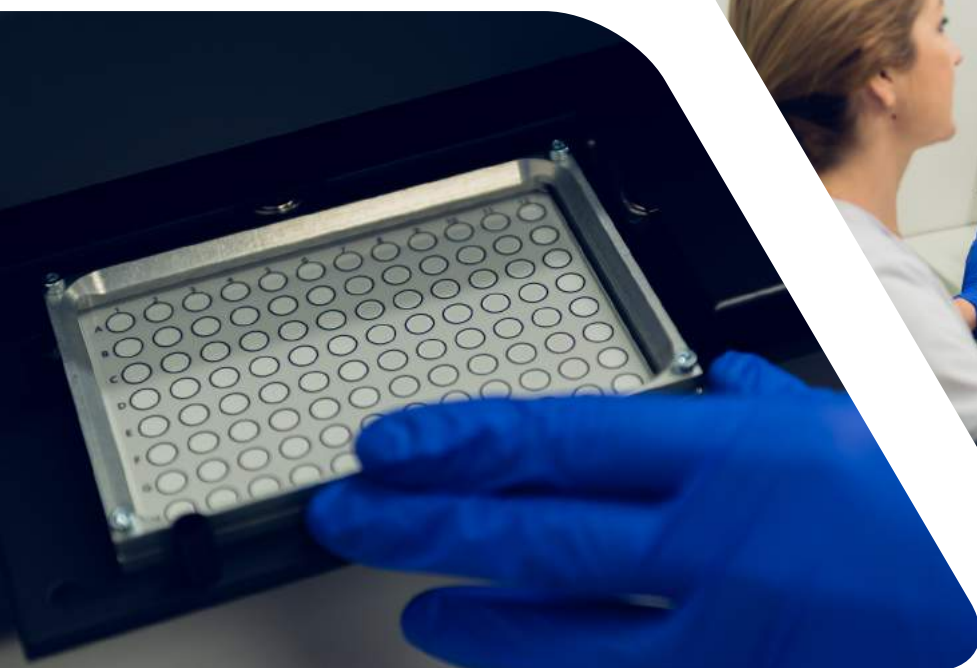
Dodatkowymi zaletami testu są:

- ✔ przy uzyskaniu dodatniej reakcji z antygenem OspA – prognozowanie przewlekłej, lekoopornej postaci stawowej boreliozy,
- ✔ przy uzyskaniu dodatniej reakcji z antygenem LFA-1 – podejrzenie wystąpienia reakcji autoimmunologicznej zapoczątkowanej zakażeniem krętkami Borrelia burgdorferi s.l. (w tym przypadku wskazane jest poszerzenie diagnostyki o badania z zakresu autoimmunologii – ANA, ANCA, RF, anty-CCP, anty-TPO, itp.).

Mechanizm zabezpieczenia przed ryzykiem wyników fałszywie ujemnych i fałszywie dodatnich w **EliSpot 2**

W teście EliSpot 2 Borrelia wprowadzono dodatkową kontrolę prawidłowości wykonania badania – mitogen szkarłatki (PWM). Jest to lektyna, która w sposób niespecyficzny aktywuje limfocyty T do produkcji interferonu gamma. Poprzez wykonanie tej kontroli oceniamy stan funkcjonalny limfocytów T użytych do badania. Ujemny wynik uzyskany dla kontroli dodatniej wskazuje na osłabione lub martwe limfocyty użyte w badaniu (np. nieprawidłowe warunki transportu), jest więc dodatkową kontrolą prawidłowości wykonania badania i interpretacji wyniku. Do jego interpretacji indeks stymulacji dla mitogenu (kontroli pozytywnej) powinien wynosić powyżej 8. Wartości niższe wskazują na zły stan funkcjonalny limfocytów i nakazują daleko posuniętą ostrożność w interpretacji zwłaszcza wyników ujemnych (dla antygenów krętkowych).

Natomiast zabezpieczeniem przed ryzykiem wyników fałszywie dodatnich jest stosowanie do stymulacji limfocytów głównie antygenów rekombinowanych i peptydowych. Zabezpiecza to wynik przed wystąpieniem reakcji z antygenami niespecyficznymi krętka. Dlatego też z dużą ostrożnością należy interpretować wyniki uzyskane dla lizatu krętków Borrelia s.s. B31, zwłaszcza przy ujemnych wynikach dla pozostałych, rekombinowanych antygenów krętka.



Możliwość jednoczesnego badania koinfekcji i innych zakażeń

Równoległe z wykonaniem badania EliSpot 2 Borrelia (z tej samej próbki krwi) możliwe jest wykonanie dodatkowych badań techniką EliSpot w kierunku zakażeń powodowanych przez:

- ✓ *Borrelia miyamotoi* (antygen rekombinowany),
- ✓ *Bartonella henselae* (antygeny rekombinowane),
- ✓ *Babesia microti* (antygeny rekombinowane),
- ✓ *Chlamydia pneumoniae* (wysokooczyszczone antygeny natywne),
- ✓ *Chlamydia trachomatis* (wysokooczyszczone antygeny natywne),
- ✓ *Mycoplasma pneumoniae* (wysokooczyszczone antygeny natywne),
- ✓ *Yersinia* spp. (natywne białka YOP),
- ✓ *Anaplasma/Ehrlichia* (antygeny rekombinowane),
- ✓ *Aspergillus* spp. (antygeny peptydowe),
- ✓ *Candida* (natywne antygeny *C. albicans* i natywne antygeny innych gatunków *Candida*),
- ✓ CMV (antygeny peptydowe i rekombinowane),
- ✓ EBV (antygeny peptydowe i rekombinowane),
- ✓ HSV-1 i HSV-2 (antygeny rekombinowane),
- ✓ VZV (antygeny rekombinowane),
- ✓ *Streptococcus pyogenes* (antygen rekombinowany).



Materiały informacyjne przygotował:

dr hab. n. med. Tomasz Wielkoszyński
profesor nadzw. WSPS



Informacje dot. testów EliSpot 2 i Elispot na koinfekcje:

Marcin Furmański
współwłaściciel Centrum Medycznego Wielkoszyński



Centrum Medyczne Wielkoszyński
Aleja Marszałka Piłsudskiego 10
41-300 Dąbrowa Górnicza

+48 503 633 141
biuro(@)wielkoszynski.pl
wielkoszynski.pl