EUR/ICD/OCD 010
0032A
ОРИГИНАЛ: АНГЛИЙСКИЙ

ЛАЙМ-БОРРЕЛИОЗ

Отчет о семинаре ВОЗ

Стокгольм
18 июня 1990 г.

1991 г.

ЗДВ/ЕРБ задача 4

Примечание

Настоящий отчет выпускается Европейским региональным бюро на английском, немецком, русском и французском языках. Он может быть перепечатан или переведен на любой другой язык при наличии соответствующего указания на источник.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение

Семинар по лайм-боррелиозу проходил 18 июня 1990 г. в Стокгольме в рамках четвертой международной конференции по лайм-боррелиозу.

Целью семинара было дальнейшее развитие достигнутого на двух предыдущих совещаниях (в Бадене, Австрия, в 1987 г. и в Праге в 1989 г.) и продолжение обсуждения методов стандартизации серологии лайм-боррелиоза.

Дискуссия

Ведущий исследователь д-р Jan Jirous представил данные, полученные в ходе европейского межлабораторного сравнительного исследования, начало которому положили решения, принятые на совещании 1989 г. в Праге.

"Двадцать шесть лабораторий в 14 странах выполнили" слепой анализ на предмет выявления антител IgG к Borrelia burgdorferi в пяти положительно характеризующихся образцах сыворотки. При этом был достигнут весьма высокий уровень согласия; результаты исследования лишь одного образца сыворотки значительно отличались. Рассматриваемый образец был низкопозитивным, полученным от пациента с хроническим нейроборрелиозом. Семь из 26 лабораторий сочли его негативным, шесть назвали пограничным и 13 сочли его позитивным. Пять лабораторий проанализировали также 96 случайно выбранных сывороток сдающих кровь доноров, полученных из Праги, на предмет выявления антител IgG к Borrelia. Это было сделано для того, чтобы оценить, сопоставим ли пороговый уровень, используемый в этих лабораториях, и зависит ли распространенность антител у людей от районов взятия пробы. Все пять лабораторий указали, что они использовали на 98% специфические тесты (что означает, что ожидаемая частота серопозитивности среди контрольных здоровых людей составляет 2%). В ходе исследования обнаружились значительные различия: три лаборатории нашли 4 позитивных случая из 96, а две других - 11 и 8 соответственно.

Участники семинара указали, что межлабораторные вариации связаны главным образом с незначительными различиями в используемых проверочных пороговых уровнях. Тот факт, что лаборатории разошлись во мнениях относительно лишь одного низкопозитивного образца, является хорошим признаком; тем не менее, он свидетельствует и о наличии значительной проблемы, поскольку при рутинных тестах уровни антител у многих положительных образцов близки к этой критической отметке. Совершенно различные количества серопозитивных значений, полученные различными лабораториями при исследовании пражских образцов, взятых у сдающих кровь доноров является также существенным фактором, что указывает на использование ими различных уровней порогового значения. Это важно, поскольку эта величина во многом повлияет на число возможных "ложноположительных" результатов. Однако исследование указывает на значительное улучшение согласованности результатов отдельных лабораторий со времени проведения первого семинара в Бадене (Австрия) в 1987 г. (см. отчет EUR/ICP/CDS 011, табл. 1).[a]

Что касается данных исследования сыворотки пражских доноров, сдающих кровь, то оказалось, что распространенность антител к B. burgdorferi примерно такая же, как и у произвольно отобранных здоровых контрольных людей из различных географических районов. Некоторые группы населения, отличающиеся высоким риском нападения клещей (например, работающие в лесу люди), могут характеризоваться более высокой концентрацией антител к B. burgdorferi. Это означает возможность использования одинакового диагностического порогового уровня для серологических испытаний в различных европейских странах. Для оценки общего превалирования антител необходимо исследовать большие контингенты сдающих кровь доноров (200-500 здоровых контрольных людей). Показатель общей распространенности антител должен использоваться для определения диагностического порога.

---

[a] "Workshop on Lyme borreliosis": report on an International Meeting, Copenhagen, WHO Regional Office for Europe, 1987 (unpublished document EUR/ICP/CDS 011).

Участники обсудили возможное значение антигенных различий у штаммов B. burgdorferi, используемых в качестве антигена при серологических исследованиях. По общему мнению, в случае индивидуальных исследований образцов сывороток, в особенности, сывороток с пограничными и низкими концентрациями антител, могут быть получены различные результаты при использовании разных штаммов. Однако когда изучаются многие образцы (что имеет место при рутинных лабораторных исследованиях), выбор штамма для подготовки тест-антигена не имеет важного значения. Может оказаться затруднительным создать такой же качественный тест-антиген на основе единственного штамма из-за меняющихся условий культивирования, различной эффективности ультразвуковой обработки и частичной экстракции грубого продукта ультразвуковой обработки спирохеты, поэтому выбор штамма, возможно, играет меньшую роль.

Обсуждалась необходимость использования в качестве тестовых антигенов штаммов, взятых из разных районов. Однако учитывая вышеупомянутые аргументы относительно подготовки антигенов и тот факт, что в одном и том же районе можно найти большое разнообразие различных штаммов, было выражено общее мнение о том, что в этом нет необходимости.

Участники обсудили вопрос об использовании очищенных антигенов спирохеты или белковых фракций в качестве тестовых антигенов. Пока что единственными кандидатами на эту роль являются флагелларный белок p41, белок pC с молекулярным весом 23 kD и так называемая фракция B (экстракт спирохетальных клеток, из которых удален p41 и которые обогащены белками osp A-B). Имеющийся опыт ограничен испытанием флагелларного белка p41, который показал себя с положительной стороны по сравнению с обычными экстрактами, полученными из целых клеток. Мнение ученых в отношении p41 разделились, и не все согласны, что следует полагаться лишь на один белок как тестовый антиген. Однако один из участников (д-р Bettina Wilske, Мюнхен) дополнила новыми аргументами теорию о том, что использование одного антигена может улучшить лайм-серологию. Она кратко охарактеризовала самые последние данные, сравнивающие пробы сывороток, полученные от 75 пациентов с мигрирующей эритемой. Пробы были проверены

с помощью различных тестов ELISA, используя либо традиционный экстракт, обработанный ультразвуком, либо коммерческий набор с использованием очищенного нативного флагелларного белка p41, рекомбинантного белка osp A, рекомбинантного белка pC, рекомбинантного белка p41 и комбинации рекомбинантного белка pC и рекомбинантного белка p41. Результаты были следующими (серопозитивность равна диагностической чувствительности):

Обработанный ультразвуком экстракт	25,5%
Очищенный нативный p41	38,7%
Рекомбинантный osp A	9,3%
Рекомбинантный pC	24,7%
Рекомбинантный p41	29,3%
Рекомбинантные pC и p41	45,3%

В связи с нехваткой времени остальные вопросы повестки дня не обсуждались.

Выводы

1. Европейское межлабораторное исследование показало, что наблюдаются незначительные, однако важные различия, главным образом, из-за неодинаковых значений пороговых уровней антител.

2. Уровень антител к B. burgdorferi среди населения в целом представляется одинаковым в различных европейских странах. Это позволяет исследователям использовать одинаковый сопоставимый пороговый уровень.

3. При выборе штамма B. burgdorferi для подготовки тест-антигена профиль белка или район отбора не оказывают большого влияния на результаты широкомасштабной рутинной серологии.

4. В будущем лайм-серологию можно будет улучшить, используя очищенные нативные или рекомбинантные антигены к Borrelia либо порознь, либо в комбинации.

Приложение 1

ЕВРОПЕЙСКОЕ МЕЖЛАБОРАТОРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Д-р Jan Jirus
Институт гигиены и эпидемиологии, Прага
(ведущий исследователь)

Целью данного исследования было сопоставление серологических результатов, полученных различными европейскими лабораториями, исследовавшими стандартные пробы сыворотки. Исследование было разделено на две части.

- В первой части были взяты три пробы сыворотки у больных лайм-боррелиозом и две у лиц из контрольной группы (таблица 1). Пробы сыворотки были лиофилизированы по 0,5 мл и в начале 1990 г. разосланы 30 европейским лабораториям в 14 странах для проверки на предмет наличия специфических IgG антител к Borrelia.

Таблица 1. Межлабораторное исследование: антитела IgG (пять стандартных проб сыворотки)

1. Нейроборрелиоз (краниальный неврит), в ходе лечения
2. Нейроборрелиоз (демиелинизация, подобная MS), после лечения
3. Контрольная группа
4. Атрофический хронический акродерматит, после лечения
5. Контрольная группа

- Во второй части исследования пять лабораторий провели серологический анализ 96 проб сыворотки пражских доноров, сдающих кровь. В ней приняли участие лаборатории д-ра Wilske (Мюнхен), д-ра Wright (Лондон), д-ра Hansen (Копенгаген), д-ра Stiernstedt (Стокгольм) и д-ра Jirous (Прага). Вторая цель состояла в том, чтобы сопоставить полученные позитивные серологические результаты исследования проб сыворотки сдающих кровь доноров из Чехословакии и из других стран.

Двадцать шесть лабораторий в 14 европейских странах исследовали пять стандартных проб сыворотки. Большинство лабораторий применяли методы ELISA и IFA, некоторые - IHA. Результаты (показанные в таблице 2) были получены на основе применения оригинальных методов участвующих лабораторий, которые использовали различные штаммы B. burgdorferi для подготовки антигенов. Некоторые из лабораторий использовали коммерческие тесты. Совпадение результатов на 100% наблюдалось по пробам сыворотки 1, 3, 4 и 5. Несовпадение серологических результатов имело место лишь по одному пациенту (№ 2), болеющему хроническим нейроборрелиозом. В 13 лабораториях результат по этому пациенту был положительным, в 6 - слабоположительным (пороговый титр), а еще в 6 других лабораториях величина титра соответствовала уровню ниже слабо положительного (подпороговый уровень).

Результаты второй части исследования, в ходе которой изучались пробы сыворотки, полученные от сдающих кровь чехословацких доноров, показаны в таблице 3. Из 96 проб сыворотки 17 оказались IgG-позитивными по результатам по крайней мере одной лаборатории. Самое большое число позитивных результатов (17) было в чехословацкой лаборатории. В 14 случаях этих позитивных сывороток специфические IgG-антитела были также обнаружены одной из остальных лабораторий. Полное совпадение (100%) результатов всех пяти лабораторий по IgG-позитивности наблюдалось лишь в отношении трех проб сыворотки (№№ 4, 60 и 94). Сопоставление данных о наличии IgG-антител в сыворотке чехословацких доноров и доноров из Дании и Германии позволяет предположить сходную частоту распространенности IgG-антител к Borrelia среди здорового населения в Чехословакии и Германии. В Дании частота распространенности представляется чуть меньшей.

Я хотел бы добавить к результатам исследования несколько личных замечаний. Достигнут весьма высокий уровень совпадения результатов исследования пяти проб сыворотки. Несовпадение результатов по сыворотке № 2 вызвано, главным образом, различиями в пороговых уровнях. Такие же результаты были представлены на нашем предыдущем совещании в Праге по Межлабораторному исследованию 1. Имело место полное совпадение результатов исследования наличия IgG-антител в 8 из 10 проб сыворотки, полученных от больных лайм-боррелиозом, которые изучались пятью лабораториями.

Таблица 2. Межлабораторное исследование: антитела IgG (пять стандартных проб сыворотки)

Лаборатория	Сыворотка					Метод
	1	2	3	4	5	
Бельгия (Д-р Bigaignon)	+	–	–	+	–	ELISA, IFA
Бельгия (Д-р Goubau)	+	–	–	+	–	ELISA, IFA(Ig conjugate)
Чехословакия (Д-р Jirous)	+	+	–	+	–	ELISA (B. recurrentis) ELISA (B. burgdorferi)
Дания (Д-р Hansen)	+	+	–	+	–	ELISA (Flagellum)
Франция (Д-р Postic)	+	–	–	+	–	ELISA, IFA
Германия (Д-р Ackermann)	+	+	–	+	–	ELISA, IFA
Германия (Д-р Peters)	+	+	–	+	–	ELISA
Германия (Д-р Wilske)	+	(+)	–	+	–	ELISA, IFA
Венгрия (Д-р Bozsik)	+	(+)	–	+	–	ELISA (Detecta-Dot), IHA (Diagast)
Венгрия (Д-р Lakos)	+	(+)	–	+	–	IFA
Италия (Д-р Cinco)	+	+	–	+	–	ELISA
Нидерланды (Д-р Nohlmans)	+	+	–	+	–	ELISA, IFA
Нидерланды (Д-р Rijpkema)	+	–	–	+	–	ELISA
Нидерланды (Д-р Spanjard)	+	–	–	+	–	IFA (Ig conjugate)

Таблица 2. (продолжение)

Лаборатория	Сыворотка					Метод
	1	2	3	4	5	
Норвегия (Д-р Jenum)	+	+	-	+	-	ELISA
Норвегия (Д-р Melby)	+	+	-	+	-	IHA (Diagast)
Швеция (Д-р Granstrom)	+	0	-	+	-	ELISA
Швеция (Д-р Hederstedt)	+	+	-	+	-	ELISA (Whole-cell) ELISA (Flagellum)
Швеция (Д-р Kaijser)	0	+	-	+	0	IFA
Швеция (Д-р Stedingk)	+	+	-	+	-	ELISA
Швеция (Д-р Stiernstedt)	+	(+)	-	+	-	ELISA
Швейцария (Д-р Gern)	+	+	-	+	-	ELISA, IFA
СССР (Д-р Коренберг)	+	(+)	-	+	-	IFA
Соединенное Королевство (Д-р Cutler)	+	(+)	-	+	-	ELISA (Ig conjugate)
Соединенное Королевство (Д-р Zochovski)	+	+	-	+	-	ELISA (Dakopatts, flagellum), IFA
Югославия (Д-р Lako)	(+)	-	-	(+)	-	IFA (Virion)

Таблица 3. Межлабораторное исследование: антитела IgG, 96 проб сыворотки доноров, сдающих кровь (Врага)

Позитивная проба сыворотки	Чехословакия (д-р Jirous)		Соединенное Королевство (д-р Wright)	Германия (д-р Wilske)	Дания (д-р Hansen)	Швеция (д-р Stirnsedt)
	ЕЕЛСА - с использованием указанных тест-антигенов					
(год-но)	B. recurrentis обработка ультразвуком	B. burgdorferi (Pko)обработка ультразвуком	B. burgdorferi обработка ультразвуком	B. burgdorferi обработка ультразвуком	B. burgdorferi очищенный флагеллум	B.burgdorferi обработка ультразвуком
2	-*	(+)*	-	-	-	-
4	+*	+	+	(+)	+	+
45	(+)	+	+	-	-	-
50	-	(+)	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-	(+)
56	-	+	(+)	-	+	(+)
59	(+)	+	+	+	-	-
60	+	+	+	(+)	+	+
62	-	+	-	-	-	-
83	-	+	+	(+)	-	+
85	-	(+)	(+)	-	-	(+)
94	+	+	+	+	+	+
98	-	(+)	+	-	-	-
112	(+)	(+)	(+)	-	-	-
114	-	-	(+)	-	-	-
153	-	+	-	(+)	-	-
154	-	+	-	+	-	-
155	-	+	-	+	-	-
156	-	(+)	+	-	-	-
	3(3)	11(6)	8(4)	4(4)	4(0)	4(3)

* Негативный результат.

* Пограничный результат, рассматриваемый как позитивный, используя в качестве порогового уровня 95% перцентиль.

* Позитивный результат, используя в качестве порогового уровня 98% перцентиль.

Более значительные различия в результатах исследования сывороток сдающих кровь доноров могут быть также вызваны использованием различных антигенов в серологических методах. Подобные результаты проведенного четырьмя лабораториями Соединенных Штатов исследования 132 проб сыворотки, взятых у лиц, работающих вне помещений, были опубликованы в работе Schwartz и др. в 1989 г.[a]

Межлабораторное исследование было организовано в 1989 г., осуществлено в 1990 г. и в настоящее время оцениваются его результаты. Однако остается один крупный вопрос: могут ли некоторые данные помочь нам в наших попытках прийти к стандартизации? Я считаю, что да. Подготовка антигена из стандартного штамма B. burgdorferi и согласованный пороговый уровень - это необходимые условия для начала эффективного международного сотрудничества многих лабораторий.

---

[a] Schwartz, B.S. et al. Anitbody testing in Lyme disease. A comparison of results in four laboratories. Journal of the American Medical Association, 262: 3431-3434 (1989).

Приложение 2

СПИСОК УЧАСТНИКОВ

Временные консультанты

Dr Guy Barantou
Laboratoire des Leptospires, Institut Pasteur, Paris, France

Dr Marina Cinco
Institute of Microbiology, University of Trieste, Italy

Dr Brian Crowe
Immuno AG, Biomedical Research Centre, Orth/Donau, Austria

Dr Raymond J. Dattwyler
Division of Allergy, Rheumatology & Clinical Immunology, SUNY at Stony Brook, NY, USA

Dr Edward Guy
Public Health Laboratory Service, Southampton General Hospital, United Kingdom

Dr Klaus Hansen
Statens Seruminstitut, Copenhagen, Denmark
(Co-Chairperson and Rapporteur)

Dr Jan Jirous
Institute of Hygiene and Epidemiology, Prague, Czechoslovakia

Dr Mats Karlson
Department of Infectious Diseases, Danderyd Hospital, Sweden

Д-р Эдуард Коренберг
Лаборатория по изучению переносчиков заболеваний, Институт им. Гамалеи, Москва, СССР

Dr Andras Lakos
Central Hospital for Infectious Diseases, Budapest, Hungary

Dr Anne-Mette Lebech
Borrelia Laboratory, Statens Seruminstitut, Copenhagen, Denmark (Secretary)

Dr Ingegerd Olson
Department of Dermatology, Södersjukhuset, Stockholm, Sweden

Dr Gerald Stanek
University of Vienna, Hygiene Institute, Vienna, Austria

Dr Göran Stiernstedt
Department of Infectious Diseases, Danderyd Hospital, Sweden (Co-Chairperson)

Dr Lars-Victor von Stedingk
The Microbiological Laboratory, Stockholm, Sweden

Dr Bettina Wilske
Max von Pettenkoferinstitut, Munich

Dr David Wright
Charing Cross Hospital, London, United Kingdom