MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2011, 63: 315 - 320

Waldemar Rastawicki, Natalia Rokosz, Marek Jagielski

Ocena przydatności komercyjnych testów immunoenzymatycznych Biotest EIA i Binax EIA do wykrywania antygenu *Legionella pneumophila* w próbkach moczu osób z legionelozą

Zakład Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego-
-Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. *M. Jagielski*

Porównano przydatność testu firmy Biotest i Binax do poszukiwania antygenu *Legionella pneumophila* w wybranych 67 próbkach moczu osób z legionelozą przysłanych w ramach zewnątrzlaboratoryjnej kontroli organizowanej przez The European Working Group for Legionella Infections (EWGLI). W przypadku badania 28 próbek moczu, określonych przez organizatora jako próbki z wynikiem ujemnym, w obydwu użytych testach wykazano 100% zgodność wyników w stosunku do wyników referencyjnych. Wśród 39 próbek moczu, określonych przez EWGLI jako próbki z wynikiem dodatnim, testem firmy Binax wykryto antygen *L. pneumophila* we wszystkich próbkach natomiast testem firmy Biotest w 33 (84,6%) próbkach moczu.

Legioneloza jest zakaźną chorobą wywoływaną przez Gram-ujemne pałeczki z rodzaju *Legionella*. Mimo, że do rodzaju *Legionella* zalicza się obecnie ponad 48 gatunków drobnoustrojów, w obrębie których wyróżniono 70 różnych grup serologicznych, większość obecnie dostępnych metod diagnostycznych ukierunkowana jest na wykrywanie zakażeń wywoływanych przez pałeczki *L. pneumophila* serotypu 1 (4,5,9,12).

W 1979 roku *Tilton* (13) po raz pierwszy opisał przydatność poszukiwania odczynami serologicznymi obecności antygenu pałeczek *L. pneumophila* w próbce moczu pobranej od osoby z legionelozą. Ponieważ wysoka czułość i swoistość tych metod została potwierdzona licznymi badaniami są one obecnie najczęściej stosowane w rutynowej, laboratoryjnej diagnostyce legionelozy (1,2,6,7,10,12). Przyjmuje się, że około 80-90% chorych z objawami zapalenia płuc już od pierwszego dnia wystąpienia objawów klinicznych wydala z moczem antygen *L. pneumophila* (12).

Aktualnie w diagnostyce legionelozy wykorzystywanych jest wiele testów immunoenzymatycznych oraz szybkich testów opartych na technice immunochromatografii (1,6,8,10,14). Celem prezentowanej pracy jest ocena przydatności dwóch komercyjnych testów immunoenzymatycznych, jednego firmy Biotest i drugiego firmy Binax, do wykrywania antygenu *Legionella pneumophila* w próbkach moczu osób z legionelozą.

MATERIAŁ I METODY

Próbki moczu. Głównym przedmiotem analizy były wyniki badania odczynem firmy Biotest 260 próbek moczu przysłanych w ramach zewnętrznej kontroli jakości (External Quality Assessment Scheme) do Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH z Instytutu Health Protection Agency (Colindale, Londyn) współpracującym z The European Working Group for Legionella Infections (EWGLI). Dodatkowo, spośród przysłanych 260 próbek moczu, wybrano 67 próbek, które poddano badaniom w odczynie immunoenzymatycznym firmy Binax. Próbki moczu do czasu badania były przetrzymywane w temp. – 70° C. Wynik badania referencyjnego dla każdej próbki moczu wraz z wynikami kolejnych serii sprawdzianu ze wszystkich laboratoriów biorących udział w zewnętrznej kontroli jakości podawany był przez EWGLI po zakończeniu każdej serii badań.

Odczyn immunoenzymatyczny firmy Biotest (Legionella Urin Antygen EIA, nr kat. 807600; obecnie sprzedawany jako produkt firmy Bio-Rad). Badania wykonano zgodnie z instrukcją podaną przez producenta testu. Wartość cut-off została wyznaczana, przy każdorazowo wykonywanej serii badania, jako średnia wartość OD_{450} uzyskana z badania dwóch kontrolnych surowic ujemnych, powiększona o wartość 0,2.

Odczyn immunoenzymatyczny firmy Binax (Legionella Urinary Antygen EIA, nr kat. 851-000). W odczynie producent zastosował płytki polistyrenowe, w której dołki opłaszczono oczyszczonymi króliczymi przeciwciałami dla pałeczek *L. pneumophila* serotyp 1. Odczyn przeprowadzono według procedury podanej przez producenta.

WYNIKI

W tabeli I przedstawiono częstość wykrywania antygenu *L. pneumophila* serotypu 1 w 260 próbkach moczu, przysyłanych w seriach po 10 sztuk w ramach międzylaboratoryjnych badań porównawczych. Badania te wykonywano odczynem immunoenzymatycznym firmy Biotest w Zakładzie Bakteriologii NIZP-PZH sukcesywnie w miarę przysyłania próbek. Wśród przysłanych próbek moczu znalazło się ogółem 151 próbek, które organizator sprawdzianu określił jako dodatnie, oraz 109 próbek określonych w referencyjnych badaniach jako ujemne. Próbki dodatnie pochodziły od osób z zakażeniem wywołanym pałeczkami *L. pneumophila* serotypu 1 potwierdzonym izolacją zarazka i/lub badaniami genetycznymi. Analiza wyników przeprowadzonych badań wykazała, że w przypadku 253 (97,3%) próbek moczu uzyskano odczynem firmy Biotest wynik zgodny z referencyjnym wynikiem podanym przez EWGLI. Badając 7 próbek moczu uzyskano wyniki rozbieżne,

Tabela I. Częstość wykrywania antygenu *L. pneumophila* serotypu 1 odczynem immunoenzymatycznym firmy Biotest w 260 próbkach moczu przysłanych do Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH w ramach External Quality Assessment Scheme w porównaniu do referencyjnych wyników podanych przez The European Working Group for Legionella Infections (EWGLI).

Liczba próbek moczu	Liczba (odsetek) próbek z wynikiem:				Liczba (odsetek) z wynikiem zgodnym
	Biotest + EWGLI +	Biotest - EWGLI +	Biotest + EWGLI -	Biotest - EWGLI -	
260	145 (55,8)	6 (2,3)	1 (0,4)	108 (41,5)	253 (97,3%)

przy czym w 6 próbkach, określonych przez organizatora jako dodatnie, nie wykryto antygenu *L. pneumophila* na diagnostycznie znamiennym poziomie. W stosunku do wyników podanych przez EWGLI, odczyn firmy Biotest charakteryzował się w naszych badaniach 96,1% czułością i 99,1% swoistością.

Analizując przydatność odczynu firmy Binax do wykrywania w moczu swoistych antygenów pałeczek *L. pneumophila*, zbadano 67 próbek wybranych spośród 260 przysłanych próbek moczu. Wśród wybranych próbek znalazły się przede wszystkim takie, które sprawiały najwięcej problemów diagnostycznych w różnych laboratoriach biorących udział w badaniach porównawczych organizowanych przez EWGLI. Wyniki uzyskane w odczynie firmy Binax porównano z wynikami uzyskanymi uprzednio w naszym laboratorium odczynem firmy Biotest (Tabela II). W przypadku badania próbek moczu, określonych

Tabela II. Porównanie częstości wykrywania antygenu *L. pneumophila* serotypu 1 odczynem immunoenzymatycznym firmy Biotest oraz odczynem immunoenzymatycznym firmy Binax w wybranych 67 próbkach moczu przysłanych do Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH w ramach External Quality Assessment Scheme.

Referencyjny wynik wg EWGLI	Liczba próbek moczu	Liczba (odsetek) wyników w odczynie firmy Biotest:		Liczba (odsetek) wyników w odczynie firmy Binax:	
		Dodatni	Ujemny	Dodatni	Ujemny
Dodatni	39	33 (84,6)	6 (15,4)	39 (100,0)	-
Ujemny	28	28 (100,0)	-	-	28 (100,0)

przez organizatora jako ujemne, w obydwu użytych testach wykazano 100% zgodność wyników w stosunku do wyników referencyjnych. Wśród wybranych 39 próbek moczu, określonych przez organizatora jako dodatnie, odczynem firmy Binax wykryto antygen *L. pneumophila* we wszystkich próbkach, natomiast odczynem firmy Biotest tylko w 33 (84,6%) próbkach moczu.

Tabela III. Porównanie wyników badania poziomu antygenu *L. pneumophila* serotypu 1 odczynem immunoenzymatycznym firmy Biotest oraz odczynem immunoenzymatycznym firmy Binax w wybranych 6 próbkach moczu przysłanych do Zakładu Bakteriologii NIZP-PZH w ramach External Quality Assessment Scheme.

Nr próbki	Referencyjny wynik EWGLI	Test firmy Biotest		Test firmy Binax	
		Cut off	OD próbki	Cut off	OD próbki
1	Dodatni	0,235	0,148 (wynik ujemny)	0,312	0,535 (wynik dodatni)
2	Dodatni	0,235	0,019 (wynik ujemny)	0,312	2,525 (wynik dodatni)
3	Dodatni	0,220	0,061 (wynik ujemny)	0,312	2,807 (wynik dodatni)
4	Dodatni	0,237	0,013 (wynik ujemny)	0,312	0,848 (wynik dodatni)
5	Dodatni	0,256	0,011 (wynik ujemny)	0,312	1,496 (wynik dodatni)
6	Dodatni	0,257	0,139 (wynik ujemny)	0,312	1,000 (wynik dodatni)

Rozbieżność wyników uzyskana w przypadku badania 6 próbek moczu skłoniła nas do zaprezentowania w oddzielnej tabeli wartości OD uzyskanych w badaniach tych próbek w obydwu testach wraz z wartościami przyjętymi za diagnostycznie znamienne – wartości cut- off (Tabela III). Analiza wyników wykazała we wszystkich próbkach moczu, ujemnych w odczynie firmy Biotest, bardzo niski poziom tych antygenów (niska wartość OD). Natomiast, w próbkach tych wykazano wysoki, bądź bardzo wysoki, poziom antygenu odczynem firmy Binax, znacznie przekraczający poziom cut-off określony przez producenta.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W zewnątrzlaboratoryjnym sprawdzianie jakości (External Quality Assessment Scheme) organizowanym od wielu lat przez EWGLI bierze udział kilkadziesiąt laboratoriów z różnych krajów europejskich. W laboratoriach tych poszukuje się antygenu pałeczek *L. pneumophila* różnymi testami immunoenzymatycznymi i immunochromatograficznymi, takimi jak: Bartels, Biotest, BinaxEIA, BinaxNow, X/pect Legionella, Diagnostic Automation, Automaten Instruments, DRG Legionella, Alere EIA, Ridascreen, SAS Legionella test, Istatest Cortem. Jednymi z najczęściej używanych odczynów przez te laboratoria są komercyjne testy immunoenzymatyczne firmy Biotest i Binax.

Wyniki przeprowadzonych przez nas badań potwierdziły generalnie przydatność obydwu testów w serodiagnostyce legionelozy. Obydwa odczyny charakteryzują się bardzo wysoką swoistością w wykrywaniu antygenu pałeczek *L. pneumophila* serotypu 1. Zaobserwowano jednakże dość istotne różnice w poziomie czułości wykazywanej w tych odczynach. W badaniach własnych, nie stwierdzono odczynem firmy Binax żadnych nieswoistych wyników podczas badania wybranych 67 próbek moczu. Analiza wyników wszystkich 26 serii badań międzylaboratoryjnych wykazała jedynie sporadyczne niezgodności pomiędzy wynikami referencyjnymi a uzyskanymi w niektórych laboratoriach przy wykonywaniu tego testu. Nie mając wglądu w rzetelność przeprowadzania badań w tych laboratoriach trudno jednak wyciągać z tych danych ogólne wnioski. W badaniach własnych, przeprowadzonych odczynem immunoenzymatycznym firmy Biotest, nie wykryto antygenu *L. pneumophila* w 6 próbkach moczu, spośród 260 przysłanych do naszego laboratorium. Przeprowadzona analiza wyników uzyskanych w pozostałych laboratoriach biorących udział w sprawdzianie, a wykonujących badania testem firmy Biotest, wykazała podobne problemy z prawidłowym oznaczeniem poziomu antygenu w tych próbkach. W przypadku jednej próbki błędne wyniki zostały uzyskane w 2 na 4 laboratoria biorących udział w badaniach w danej serii sprawdzianu, w przypadku drugiej próbki w 9 na 10 laboratoriów, a w przypadku czterech pozostałych próbek moczu we wszystkich laboratoriach (odpowiednio w 7, 10 i 11). Co więcej, uzyskane przez nas wyniki odczynem firmy Binax wykazały w tych próbkach moczu wysoki poziom antygenu dla pałeczek *L. pneumophila.* Tak więc, uzyskanie ujemnego wyniku badania w odczynie firmy Biotest w tak znaczącej liczbie laboratoriów nie było przypadkowe i nie wynikało z ewentualnych błędów technicznych, które mogłyby być popełnione przy wykonywaniu badania. Z drugiej strony, przeprowadzona analiza wyników badania wszystkich próbek wykazała, że uzyskiwano wyniki dodatnie odczynem firmy Biotest badając próbki moczu o dużo niższym poziomie antygenu wykrytego odczynem firmy Binax niż w opisywanych powyżej 6 próbkach. Tak więc, uzyskiwanie fałszywie ujemnych wyników w odczynie

Biotest nie wynika ze źle dobranego (zbyt wysokiego) przez producenta poziomu cut-off lecz raczej różnic w poziomie reaktywności pomiędzy poszukiwanym antygenem *L. pneumophila* a użytymi w tych testach króliczymi surowicami odpornościowymi.

Przydatność testów immunoenzymatycznych firmy Biotest i Binax do diagnostyki legionelozy badana była również przez innych autorów. *Olsen* i wsp. (11) w swoich badaniach wykazali znacznie wyższą czułość diagnostyczną testu firmy Binax (69,4 %) w porównaniu do testu Biotest (38,7%) podczas badania próbek moczu pozyskanego od osób z zakażeniem wywołanym pałeczkami *L. pneumophila* serotypu 1. Co więcej, test firmy Binax znacznie częściej niż odczyn Biotest umożliwiał również wykrycie antygenu pałeczek *L. pneumophila* należących do innych serotypów odpowiedzialnych za wywoływanie legionelozy (odpowiednio 51,4% i 28,6%). Z kolei w badaniach przeprowadzonych przez *Yzerman* i wsp. (14) wykazano podobną czułość obydwu testów komercyjnych (odpowiednio 71% w przypadku użycia testu Biotest i 69% w przypadku testu Binax). Dodatkowo, autorzy stwierdzili, że w przypadku oznaczania obecności antygenu w moczu pacjentów z łagodnym przebiegiem legionelozy czułość obydwu testów wahała się między 40-53% natomiast w przypadku badania próbek moczu pacjentów z ostrym przebiegiem choroby czułość wynosiła od 88-100%. Nieco odmienne wyniki uzyskali w swoich badaniach *Dirven* i wsp. (3), w których test ELISA firmy Biotest charakteryzował się 66% czułością, a test firmy Binax nieco niższą, bo 50% czułością. W przypadku uzyskania od tych samych pacjentów kolejnych próbek moczu czułość obydwu testów wzrosła, odpowiednio do 71,9% i do 59,4%. Wyższą czułość testu firmy Biotest, w porównaniu do testu firmy Binax, przy badaniu próbek moczu osób zakażonych pałeczkami *L. pneumophila* należącymi do serotypów 1-14 wykazali również *Horn* i wsp (8).

Przeprowadzone przez nas badania wykazały przydatność zarówno testu firmy Biotest jak i testu Binax w poszukiwaniu antygenu pałeczek *L. pneumophila* w próbkach moczu osób z legionelozą. Aczkolwiek uzyskanie w teście firmy Biotest wyników ujemnych w przypadku badania 6 próbek moczu osób z legionelozą nie dyskwalifikuje przydatności tego testu w laboratoryjnej diagnostyce legionelozy, to nieco wyższa czułość testu Binax czyni go bardziej użytecznym w rutynowo przeprowadzanej serodiagnostyce zakażeń wywoływanych przez pałeczki *L. pneumophila* serotypu 1.

W. Rastawicki, N. Rokosz, M. Jagielski

Comparison and evaluation of the Binax EIA and Biotest EIA urinary antigen kits for detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples

SUMMARY

The Binax and the Biotest urinary antigen kits for detection of *L. pneumophila* antigen were compared by testing of selected 67 urine samples obtained from EWGLI as reference samples in External Quality Assessment Scheme. Thirty nine were positive with the Binax kit (100% of sensitivity), and 33 were positive with the Biotest (84,6% of sensitivity). The test specificities were 100% for the both kits. It was concluded that the Binax kit was more suitable for the routine diagnosis of *Legionella* infections than the Biotest kit.

PIŚMIENNICTWO

1. *Baczewska-Rej M, Zasada AA, Rokosz N, Rastawicki W.* Comparison of Sensitivity and Specificity of Three Commercial Assays (Biotest EIA, BinaxNOW and Uni-Gold) for Detection of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Antigen in Urine. Adv Clin Exp Med 2010, 19:323–7.
2. *Benson J, Tang P, Fields B*. Evaluation of the Binax and Biotest urinary antigen kits for detection of Legionnaires' disease due to multiple serogroups and species of *Legionella.* J Clin Microbiol 2000; 38:2763-5.
3. *Dirven K, Ieven M, Peeters M* i inni. Comparison of three *Legionella* urinary antigen assays during an outbreak of legionellosis in Belgium. J Med Microbiol 2005; 54:1213-6.
4. *Dominguez J, Manterola J, Blavia R* i inni. Detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in nonconcentrated urine and urine concentrated by selective ultrafiltration. J Clin Microbiol 1996;34:2334-6.
5. *Dominguez J, Gali N, Pedroso P* i inni. Comparison of the Binax *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassay (EIA) with the Biotest *Legionella* urine antigen EIA for detection of *Legionella* antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples. J Clin Microbiol 1998; 36:2718-22.
6. *Fields B, Benson R, Besser R*. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev 2002; 15:506-26.
7. *Guerrero C, Toldos C, Yagüe G* i inni. Comparison of diagnostic sensitivities of three assays (Bartels enzyme immunoassay [EIA], Biotest EIA, and Binax NOW immunochromatographic test) for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. J Clin Microbiol 2004; 42:467-8.
8. *Horn J*. Comparison of non-serogroup 1 detection by Biotest and Binax *Legionella* urinary antigen enzyme immunoassays. Red. Reinhard Marre i inni., ASM Press, Washington, D.C., 2002, 207- 9.
9. *Malan A, Martins T, Jaskowski T* i inni. Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays with an immunofluorescence assay for detection of *Legionella pneumophila* types 1 to 6. J Clin Microbiol 2003, 41:3060-3.
10. *Murdoch D*. Diagnosis of *Legionella* infection. Med Microbiol 2003; 36:64-9.
11. *Olsen C, Elverdal P, Jørgensen C* i inni. Comparison of the sensitivity of the *Legionella* urinary antigen EIA kits from Binax and Biotest with urine from patients with infections caused by less common serogroups and subgroups of *Legionella*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009; 28:817-20.
12. *Rokosz N, Rastawicki W, Zasada AA, Baczewska-Rej M.* Mikrobiologiczna diagnostyka zakażeń układu oddechowego wywoływanych przez pałeczki *Legionella pneumophila.* Pneumonol Alergol Pol 2010; 78:54-9.
13. *Tilton R*. Legionnaires' disease antigen detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Ann Intern Med 1979; 90:697-8.
14. *Yzerman E, den Boer J, Lettinga K* i inni. Sensitivity of three urinary antigen tests associated with clinical severity in a large outbreak of Legionnaires' disease in the Netherlands. J Clin Microbiol 2002; 40:3232-6.

Otrzymano : 14 IX 2011 r.

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24,
Zakład Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny.