

Kartläggning av metoder för klinisk diagnostik av borrelios i ÖKS-regionen

Författare:

Anna J Henningsson, Klinisk mikrobiologi, Region Jönköpings län, Sverige
Per-Eric Lindgren, Medicinsk mikrobiologi, Institutionen för klinisk och experimentell medicin, Linköping, och Klinisk mikrobiologi, Region Jönköpings län, Sverige
Vivian Kjelland, Institutet för naturvetenskap, Universitetet i Agder, Forskningsenheten, Sørlandets sjukhus, Kristiansand, Norge
Åshild Andreassen, Avdelningen för virologi, Folkhälsoinstitutet, Oslo, Norge
Tomas Bergström, Klinisk mikrobiologi, Sahlgrenska universitetssjukhuset, Göteborg, Sverige
Claus Bohn Christiansen, Avdelningen för klinisk mikrobiologi, Statens Serum Institut, Köpenhamn, Danmark
Ram Dessau, Klinisk mikrobiologisk avdelning, Slagelse sjukhus, Slagelse, Danmark
Sølvi Noraas, Medicinsk mikrobiologi, Sørlandet sjukhus HF, Kristiansand, Norge
Ann-Cathrine Petersson, Klinisk mikrobiologi, Laboratoriemedicin, Lund, Sverige
Rimtas Dargis, Klinisk mikrobiologisk avdelning, Slagelse sjukhus, Slagelse, Danmark
Maria Liljeheden, Klinisk mikrobiologi, Laboratoriemedicin, Lund, Sverige
Malin Lager, Forsknings- och utvecklingsenheten, Medicinsk diagnostik, Region Jönköpings län, Sverige
Hanne Quarsten, Medicinsk mikrobiologi, Sørlandet sjukhus HF, Kristiansand, Norge
Katharina Ornstein, VO Specialiserad medicin Infektion, Skånevård Kryh, Region Skåne, Sverige

Utgiven av Nasjonalt Folkehelse institutt og Interreg IV A-projektet ScandTick
mars 2015

Titel: Kartläggning av metoder för klinisk diagnostik av borrelios i ÖKS-regionen

Författare:

Anna J Henningsson, Klinisk mikrobiologi, Region Jönköpings län, Sverige
Per-Eric Lindgren, Medicinsk mikrobiologi, Institutionen för klinisk och experimentell medicin, Linköping, och Klinisk mikrobiologi, Region Jönköpings län, Sverige
Rimtas Dargis, Klinisk mikrobiologisk avdelning, Slagelse sjukhus, Slagelse, Danmark
Ram Dessau, Klinisk mikrobiologisk avdelning, Slagelse sjukhus, Slagelse, Danmark
Maria Liljeheden, Klinisk mikrobiologi, Laboratoriemedicin, Lund, Sverige
Malin Lager, Forskning och utveckning, Länssjukhuset Ryhov, Jönköping, Sverige
Sølvi Noraas, Medicinsk mikrobiologi, Sørlandet sjukhus HF, Kristiansand, Norge
Katarina Ornstein, VO Specialiserad medicin Infektion, Skånevård Kryh, Region Skåne, Sverige
Ann-Cathrine Petersson, Klinisk mikrobiologi, Laboratoriemedicin, Lund, Sverige
Hanne Quarsten, Medicinsk mikrobiologi, Sørlandet sjukhus HF, Kristiansand, Norge
Vivian Kjelland, Institutt for naturvitenskap, Universitetet i Agder, og Forskningsenheten, Sørlandet sykehus HF, Kristiansand, Norge

Beställning:

Rapporten kan laddas ned som pdf
på projektets hemsida:

www.scandtick.com

www.fhi.no

ISBN elektronisk utgåva ISBN:978-82-8082-668-8

Förord

ScandTick er et [Interreg IV A prosjekt i Øresund, Kattegat og Skagerrak \(ØKS\) regionen](#), og er et grenseoverskridende samarbeidsprosjekt mellom Norge, Sverige og Danmark. Bakgrunnen for prosjektet er det stadig økende problemet med flått og flåttbårne sykdommer i de skandinaviske landene, spesielt innen ØKS-regionen.

De vanligste flåttbårne sykdommene er borreliose og flåttbåren encefalitt (TBE). De siste årene har stadig flere personer blitt syke etter infeksjon med flåttbårne bakterier og virus. Et forsiktig estimat viser at over 40.000 mennesker i regionen ble smittet i 2011, de fleste av disse i Sverige. Trolig er antall tilfeller enda høyere, da meldingssystemene for flåttbårne sykdommer er ufullstendige. Meldingssystemene for flåttbåren sykdom i de tre landene er også forskjellige, noe som gjør at datagrunnlaget ikke blir direkte sammenlignbart.

De problemene flåttbårne infeksjoner medfører er forholdsvis like i våre tre skandinaviske land, og et sterkere samarbeid over grensene vil føre til økt samlet kunnskap om flått og flåttbårne sykdommer. ScandTick ønsker å styrke kapasiteten på forskning om flått og flåttbårne sykdommer, samt å forbedre tilhørende helsetjenester.

Erfaringsutveksling over landegrensene, som står sentralt i prosjektet, skal blant annet forbedre diagnostikk og risikovurderinger i de tre landene. Problemene med flåttbårne infeksjoner er relativt like i de tre landene, og ved å slå sammen datamateriale fra et større område vil dette gi et større datagrunnlag som kan gi sikrere konklusjoner. ScandTicks satsningsområde er derfor økt samarbeid, for å legge til rette for at de stadig økende utfordringene knyttet til flått håndteres på best mulig måte.

Oslo, februar 2015

Prosjektgruppen for ScandTick

Innehåll

Förord	3
Bakgrund	5
Metod och Resultat	6
Tabell 1: antikroppstester	7
Tabell 2: PCR-metoder	10
Konklusion	11
Referenser	12

Bakgrund

Lyme borrelios (LB) är den vanligaste vektorburna infektionen på norra halvklotet, men incidensen varierar kraftigt mellan olika regioner¹. Infektionen orsakas av bakterier tillhörande *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.)-komplexet, och överförs till människor via fästingbett. Hud, nervsystem och leder drabbas oftast, och sjukdomsförloppet uppvisar tämligen stor variation mellan olika individer²⁻³.

Diagnosen Lyme borrelios baseras på sjukhistoria, symtom, kliniska undersökningsfynd och laboratoriefynd⁴. Den kliniska laboratediagnostiken utgörs i dagsläget framförallt av antikroppspåvisning i serum eller spinalvätska, men kan i vissa fall kompletteras med påvisning av *Borrelia*-specifik nukleinsyra (DNA), odling och histologi. Odlingsanses på grund av sin höga specificitet vara "gold standard", men då sensitiviteten i kliniska prover är otillfredsställande och varierande (1-70 procent)⁴ tillämpas inte odling inom rutindiagnostiken i de skandinaviska länderna. Sensitiviteten för PCR anges vara 10-70 procent beroende på provtagningsmaterial, och används av några laboratorier som komplement till antikroppspåvisning vid vissa indikationer.

För antikropsdiagnostik finns ett stort antal kommersiella tester tillgängliga, baserade på olika antigensammansättningar. Sensitivitet och specificitet hos dessa varierar. Vanligast förekommande är ELISA-baserade tester, och en del laboratorier använder immunoblot för konfirmering av positiva ELISA-fynd⁵. Generellt är antikropsdiagnostiken behäftad med vissa välkända begränsningar, såsom svårighet att skilja mellan aktuell och genomgången borrelios och att tidig borreliainfektion kan vara antikropsnegativ. Olika kliniska laboratorier använder olika antikropptester, och standardisering saknas⁶.

Smittskyddsinstitutet (numera Folkhälsomyndigheten) i Sverige gjorde 2013 en översyn av europeiska rekommendationer och aktuell metodik för laboratediagnostik av borreliainfektioner (Bilaga 1). Nasjonalt folkehelseinstitutt genomförde i Norge 2012 ett serologiskt ringtest där 19 kliniska mikrobiologilaboratorier deltog (Bilaga 2). Resultatet visade att laboratorierna använde relevant diagnostik, men att standardisering av rapportering och tolkning saknades. I ett gemensamt skandinaviskt projekt⁶ (Bilaga 3) gjordes en sammanställning av vilka diagnostiska metoder som användes av 43 tillfrågade nordiska laboratorier. Tretton olika diagnostiska kit användes för primär ELISA och seropositiviteten varierade mellan 5-60 procent. Konfirmering av ELISA-resultat med immunoblot gjordes av 16 laboratorier, medan 27 enbart gjorde primärscreening med ELISA. PCR för påvisning av *Borrelia*-specifikt DNA utfördes av 6 laboratorier, och i genomsnitt var 2 procent av PCR-undersökningarna positiva på prov från spinalvätska, mot 13 procent för prov från hud eller leder.

Metod och Resultat

Inom ramen för ScandTick-samarbetet gjordes hösten 2013 en kartläggning av vilka metoder för borreliadiagnostik som används vid ett antal kliniska laboratorier i ÖKS-regionen och av samarbetspartners på Åland (Tabell 1 och 2). Målsättningen är att på lite längre sikt gemensamt definiera och sätta samman välkaraktäriserade provpaneler för utvärdering och jämförelse av *Borrelia*-specifik antikroppsdiagnostik och PCR i klinisk diagnostik, och att använda kliniska laboratorier i ÖKS-regionen och på Åland för validering av dessa provpaneler.

Tabell 1. Borreliadiagnostik: antikroppstester som används av kliniska laboratorier i ÖKS-regionen och på Åland.

Laboratorium	Antikroppstest	Antigen	Ackreditering
Klinisk mikrobiologi Sahlgrenska universitetssjukhuset Göteborg	<u>Serum:</u> LIAISON Borrelia IgG LIAISON Borrelia IgM (DiaSorin) Cut-off IgG: gränsvärde 10-15, pos >15 Cut-off IgM: gränsvärde 18-22, pos >22 <u>Csv*/serum:</u> 1. Screening av csv med LIAISON Borrelia IgG och IgM 2. Positiv csv analyseras med IDEIA Lyme Neuroborreliosis (Oxoid) Cut-off: pos $\geq 0,3$ index	<u>Serum:</u> IgG: rekombinant VlsE IgM: rekombinant OspC och VlsE <u>Csv/serum:</u> 1. Se ovan 2. Renad nativ flagell från <i>B. afzelii</i> DK1	Swedac Swedac Swedac
Klinisk mikrobiologi Länssjukhuset Ryhov Jönköping	<u>Serum:</u> Enzygnost Lyme link VlsE/IgG Cut-off: pos ≥ 10 U/mL Enzygnost Borreliosis/IgM Cut-off: pos ≥ 2 s/co (Siemens) <u>Csv/serum:</u> IDEIA Lyme Neuroborreliosis (Oxoid) Cut-off: pos $\geq 0,3$ index	<u>Serum:</u> IgG: rekombinant VlsE och nativa <i>Borrelia</i> - antigen IgM: inaktiverat <i>Borrelia</i> -antigen och detergentextrakt från <i>B. afzelii</i> PKo <u>Csv/serum:</u> Renad nativ flagell från <i>B. afzelii</i> DK1	Swedac Swedac
Klinisk mikrobiologi Skånes universitetssjukhus Lund/Malmö	<u>Serum:</u> 1. LIAISON Borrelia IgG LIAISON Borrelia IgM (DiaSorin) Cut-off IgG: gränsvärde 10-15, pos >15 Cut-off IgM: gränsvärde 18-22, pos >22 2. Konfirmering av oklara fall med EUROLINE-WB: Anti- Borrelia IgM och IgG (Euroimmun)	<u>Serum:</u> 1. IgG: rekombinant VlsE IgM: rekombinant OspC och VlsE 2. Elektrofores- separerade proteiner från en <i>B.</i> <i>afzelii</i> -stam (p83, p41/flagellin, p39/BmpA, p31/OspA, p30, p25/OspC, p21, p19, p17) samt rekombinant VlsE	Swedac Nej

	pos $\geq 1,1$ 2. recomWell IgG (Mikrogen) gränsvärde 20-24 pos >24 3. recomBead IgG (Mikrogen) Används för verifiering av gränsvärden och positiva i recomWell Cut-off: gränsvärde 5-7, pos ≥ 8 <u>Csv/serum:</u> recomBead Borrelia IgG (Mikrogen) Indexberäkning enligt Reiber⁷	3. Rekombinant p100, VlsE, p58, p39, OspA, OspC från <i>B. afzelii</i>, <i>B. garinii</i>, <i>B. burgdorferi</i> ss, p18 från <i>B. afzelii</i>, <i>B. garinii</i>, <i>B. burgdorferi</i> ss, <i>B. spielmanii</i>, <i>B. bavariensis</i> <u>Csv/serum:</u> Rekombinant p100, VlsE, p58, p39, OspA, OspC från <i>B. afzelii</i>, <i>B. garinii</i>, <i>B. burgdorferi</i> ss, p18 från <i>B. afzelii</i>, <i>B. garinii</i>, <i>B. burgdorferi</i> ss, <i>B. spielmanii</i>, <i>B. bavariensis</i>	FINAS FINAS
--	--	--	---------------------------

Csv: cerebrospinalvätska.

Tabell 2. Borreliadiagnostik: PCR** -metoder som används för påvisning av *Borrelia*-specifikt DNA vid kliniska laboratorier i ÖKS-regionen.

Laboratorium	PCR-metod	Referens	Ackreditering
Klinisk mikrobiologi Sahlgrenska universitetssjukhuset Göteborg	-	-	-
Klinisk mikrobiologi Länssjukhuset Ryhov Jönköping	-	-	-
Klinisk mikrobiologi Skånes universitetssjukhus Lund/Malmö	Csv*, hud, ledvätska: Påvisning: regioner i 16S rRNA-genen amplifieras i realtids-PCR Artbestämning: nested PCR av <i>ospA</i> -genen följt av cykelsekvensering	Tsao JI et al. ⁸ Ornstein K et al. ⁹	-
Medisinsk mikrobiologi Sørlandet sykehus HF Kristiansand	Csv, hud, ledvätska: Påvisning: regioner i 16S rRNA-genen amplifieras i realtids-PCR Artbestämning: nested PCR av <i>ospA</i> -genen följt av cykelsekvensering	Tsao JI et al. ⁸ Gooskens J et al. ¹⁰	-
Klinisk mikrobiologisk avdelning Slagelse sykehus Slagelse	Csv, hud, ledvätska: Påvisning: regioner i 16S rRNA-genen amplifieras i realtids-PCR Artbestämning: nested PCR av <i>ospA</i> -genen följt av cykelsekvensering	Tsao JI et al. ⁸ Ornstein K et al. ⁹	-
biMELix AB Biomedical laboratory Mariehamn	-	-	-

*Csv: cerebrospinalvätska. **PCR: polymerase chain reaction.

Konklusion

Vid kartläggning av vilka antikroppstester som används vid kliniska laboratorier i ÖKS-regionen och på Åland, finner vi att det framförallt för serumanalyser varierar mycket. Standardisering saknas och de kommersiella testerna ger erfarenhetsmässigt ofta olika testresultat och medför inte sällan tolkningssvårigheter¹¹. Det föreligger således ett tydligt behov av att bättre kunna utvärdera och jämföra olika tester för påvisning av *Borrelia*-specifika antikroppar, och för detta behövs definierade och väl karakteriserade provpaneler. Det finns även behov av att kunna utvärdera olika PCR-metoder för påvisning av *Borrelia*-specifikt DNA i kliniska prover. De kliniska laboratorierna i ÖKS-regionen använder alla samma PCR-metod för DNA-påvisning, men sensitiviteten kan ändå tänkas variera. Vidare finns ett antal andra PCR-metoder som används inom forskningen i regionen, och det vore av intresse att jämföra dessa metoders prestanda med de kliniskt mer etablerade metodernas.

Referenser

1. Stanek G, Strle F. Lyme borreliosis. Lancet 2003; 362: 1639-1647.
2. Berglund J, Stjernberg L, Ornstein K, Tykesson-Joelsson K, Walter H. 5-y Follow-up study of patients with neuroborreliosis. Scand J Infect Dis 2002;34: 421-425.
3. Vrethem M, Hellblom L, Widlund M, Ahl M, Danielsson O, Ernerudh J, Forsberg P. Chronic symptoms are common in patients with neuroborreliosis – a questionnaire follow-up study. Acta Neurol Scand 2002;106:205-208.
4. Stanek G, Fingerle V, Hunfeld K-P, Jaulhac B, Kaiser R, Krause A, Kristoferitsch W, O'Connell S, Ornstein K, Strle F, Gray J. Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. Clin Microbiol Infect 2011;17:69-79.
5. Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. FEMS Immunol Med Microbiol 2007;49:13-21.
6. Dessau R, Eliasson I, Skarpaas T, Nyman D. Testing for Lyme borreliosis in the Nordic countries – variations in strategies and rate of seropositivity. Available at: <http://www.dskm.dk/publikationer-2/index.html>
7. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related patterns and evaluation programs. J Neurol Sci 2001;184:101-22.
8. Tsao JI, Wootton JT, Bunikis J, Luna GL, Fish D, Barbour AG. An ecological approach to preventing human infection: Vaccinating wild mouse reservoirs intervenes in the Lyme disease cycle. PNAS 2004;101:18159-64.
9. Ornstein K, Barbour AG. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for *Borrelia burgdorferi* 16S rRNA for highly sensitive quantification of pathogen load in a vector. Vector Borne Zoonotic Dis 2006;6:103-12.
10. Gooskens J, Templeton KE, Claas EC, van Dam AP. Evaluation of an internally controlled real-time PCR targeting the *ospA* gene for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in cerebrospinal fluid. Clin Microbiol Infect 2006;12(9):894-900.
11. Ang CW, Notermans DW, Hommes M. Large differences between test strategies for the detection of anti-*Borrelia* antibodies are revealed by comparing eight ELISAs and five immunoblots. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011;30:1027-32.

