

# Jämförelse av realtids-PCR som ett komplement till klinisk diagnostik av TBE i ÖKS-regionen

## Författare:

Malin Lager, Forskning och utveckning, Länssjukhuset Ryhov, Jönköping, Sverige

Anna J Henningsson, Klinisk mikrobiologi, Länssjukhuset Ryhov, Jönköping, Sverige

Åshild Andreassen, Avdelningen för virologi, Folkhälsoinstitutet, Oslo, Norge

Tomas Bergström, Kliniska mikrobiologi, Sahlgrenska universitetssjukhuset, Göteborg, Sverige

Anders Fomsgaard, Klinisk mikrobiologi och virologi, Statens seruminstitut, Köpenhamn, Danmark

Anette Roth, Klinisk mikrobiologi, Sahlgrenska universitetssjukhuset, Göteborg, Sverige

Maiken Worsøe Rosenstjerne, Klinisk mikrobiologi och virologi, Statens seruminstitut, Köpenhamn, Danmark

Mattias Waldeck, Smittskydd Skåne, Centralsjukhuset, Kristianstad, Sverige

Claus Bohn Christiansen, Avdelningen för klinisk mikrobiologi, Köpenhamn, Danmark

Per-Eric Lindgren, Institutionen för klinisk och experimentell medicin, Medicinsk mikrobiologi, Linköping, Sverige

Utgitt av Nasjonalt Folkehelseinstitutt og Interreg IV A-prosjektet ScandTick  
mars 2015

**Tittel:**

Jämförelse av realtids-PCR som ett komplement till klinisk diagnostik av TBE i ÖKS-regionen

**Forfattere:**

Malin Lager, Forskning och utveckning, Länssjukhuset Ryhov, Jönköping, Sverige  
Anna J Henningsson, Klinisk mikrobiologi, Länssjukhuset Ryhov, Jönköping, Sverige  
Åshild Andreassen, Avdelningen för virologi, Folkehelseinstituttet, Oslo, Norge  
Tomas Bergström, Kliniska mikrobiologi, Sahlgrenska universitetssjukhuset, Göteborg, Sverige  
Anders Fomsgaard, Klinisk mikrobiologi och virologi, Statens seruminstitut, Köpenhamn, Danmark  
Anette Roth, Klinisk mikrobiologi, Sahlgrenska universitetssjukhuset, Göteborg, Sverige  
Maiken Worsøe Rosenstjerne, Klinisk mikrobiologi og virologi, Statens seruminstitut, Köpenhamn, Danmark  
Mattias Waldeck, Smittskydd Skåne, Centralsjukhuset, Kristianstad, Sverige  
Claus Bohn Christiansen, Avdelningen för klinisk mikrobiologi, Köpenhamn, Danmark  
Per-Eric Lindgren, Institutionen för klinisk och experimentell medicin, Medicinsk mikrobiologi, Linköping, Sverige

**Bestilling:**

Rapporten kan lastes ned som pdf

på prosjektets hjemmeside:

[www.scandtick.com](http://www.scandtick.com)

[www.fhi.no](http://www.fhi.no)

ISBN elektronisk utgave ISBN:978-82-8082-667-1

## ScandTick

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 vil stå 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, mars 2015

## Innhold

ScandTick _____	Feil! Bokmerke er ikke definert.
<b>Jämförelse av realtids-PCR som ett komplement till klinisk diagnostik av TBE i ÖKS-regionen</b>	
TBE (tick-borne encephalitis)	5
Metod	5
Resultat	6-7
Konklusion	7
<b>Referenser _____</b>	<b>8</b>

## TBE (tick-borne encephalitis)

Fästingen *Ixodes ricinus*, som är vanligt förekommande i Europa, verkar som vektor vid överföring av flera humana patogener<sup>1</sup>. En av de medicinskt mest betydande patogenerna är tick-borne encephalitis viruset (TBEV) som orsakar TBE. Överföringen till människa sker via fästingbett och viruset sprids via blodbanan och det lymfatiska systemet till det centrala nervsystemet, där det kan orsaka mycket allvarliga och ibland dödliga infektioner<sup>1,2</sup>. Andelen fästingar i regionen som bär på viruset är låg och risken att utveckla TBE efter ett fästingbett är därmed liten<sup>3,4</sup>. Dock är tiden för överföringen av virus från fästing till människa kort och studier har visat att den kan ske inom en timme<sup>5</sup>.

Då det i dagsläget inte finns någon specifik medicinsk behandling av TBE är det viktigt att informera befolkningen om förebyggande åtgärder mot TBE. Det bästa skyddet mot TBE är vaccination, vilken har god skyddseffekt och ringa biverkningar.

Påvisande av sk IgM- och IgG-antikroppar i serum och i vissa fall cerebrospinalvätska utgör i dagsläget laboriediagnostiken vid påvisning av TBE. IgM-antikroppar kan påvisas hos 96 % av patienterna inom 3 dagar efter debut av encefalit och hos samtliga patienter inom 9 dagar<sup>7</sup>. Påvisning av TBE-specifik arvsmassa, ribonukleinsyra (RNA), i ett blodprov är endast möjligt i den tidiga fasen av sjukdomen då patienterna har feber och diffusa allmänsymtom. De flesta misstänker inte TBE och söker inte heller medicinsk vård i detta skede, vilket gör att rutindiagnostisk påvisning av TBE-RNA är begränsad till patienter med tidig misstanke om TBE<sup>6</sup>. I regel är det även svårt att påvisa TBE-RNA i cerebrospinalvätska vid encefalit, vilket begränsar metodens tillämpning. Dock har studier uppvisat lovande resultat gällande påvisning av TBE-RNA i urin<sup>8</sup>. Virusodling används inte heller vid rutindiagnostik av TBE då metoden är både tidskrävande och dyr. Inom ÖKS-regionen utförs i dagsläget påvisning av TBE-RNA vid fyra laboratorier, vilka använder metoder baserade på Polymerase Chain reaction (PCR)-teknik. Vid kliniska laboratorier diagnostiseras TBEV-RNA i serum, blod, cerebrospinalvätska och urin, medan forskningslaboratorier primärt diagnostiseras TBEV-RNA i fästingar. Samtliga laboratorier, både kliniska laboratorier och forskningslaboratorier, påvisar RNA med PCR-metod, men metoderna och protokollen skiljer sig åt (se Kartläggning av metoder för detektering av Skogflåttencefalit- TBE).

Syftet med denna vidare jämförelse är att försöka förbättra den molekylärbio-logiska diagnostiken så att den kan bli mer tillämpbar i klinisk diagnostik samt likrikta tolkningen och bedömningen av resultat mellan olika laboratorier i ÖKS-regionen.

## Metod

För att utvärdera och jämföra känsligheten bland metoderna som används inom ÖKS-regionen har nukleinsyra extraherad från fästingar skickats till fyra laboratorier (se Kartläggning av metoder för detektering av Skogflåttencefalit- TBE samt Tabell 1). De fyra laboratorierna har med sina molekylärbio-logiska metoder analyserat nukleinsyra och sedan rapporterat sina resultat samt diagnostiska protokoll.

## Resultat

Sammanställningen visade att samtliga laboratorier hade sina egna diagnostiska protokoll. Två av laboratorierna påvisade inga positiva resultat bland de 425 proverna, ett laboratorium påvisade fyra positiva prover utav 425 prover totalt och ett laboratorium påvisade 29 positiva prover. Det sistnämnda laboratoriet lyckades dock enbart bekräfta ett positivt fynd vid vidare analys av proverna (Tabell 1).

**Tabell 1.** TBE-diagnostik: Resultat och PCR\*\*-metoder som används för påvisning av TBE-specifikt RNA vid kliniska laboratorier samt forskningslaboratorier i ÖKS-regionen.

Laboratorium	PCR-metod	Referens	Antal positiva
Klinisk mikrobiologi Sahlgrenska universitetssjukhuset Göteborg (Kliniskt laboratorium)	<u>Serum, helblod, cerebrospinalvätska, urin:</u>  <i>Påvisning:</i> Region i 3'-non- coding region amplifieras med realtids-PCR  <i>Artbestämning:</i> Nested RT-PCR följt av sekvensering	Brinkley et al. <sup>9</sup>  Norberg et al. <sup>10</sup>	4
Klinisk mikrobiologi Länssjukhuset Ryhov Jönköping (Forskningslaboratorium)	<u>Fästingar:</u>  <i>Påvisning:</i> Region i 3'-non- coding region amplifieras med multiplex realtids- PCR  <i>Artbestämning:</i> Nested PCR av E- genen följt av sekvensering	Lindblom et al. <sup>4</sup>  Melik et al. <sup>11</sup>	0
Avdelningen för virologi Folkhälsoinstitutet Oslo (Referens-,diagnostisk- och forsknings- laboratorium)	<u>Fästingar:</u>  <i>Påvisning:</i> Region i E-genen amplifieras med realtids-PCR  <i>Artbestämning:</i> Nested PCR av E- genen följt av sekvensering utförs vid högt kopietal av virus	Andreassen et al. <sup>3</sup>  Skarpaas et al. <sup>12</sup>	29

	Pyrosekvensering av E-genen utförs vid korta PCR-produkter och lågt kopietal av virus	Andreassen et al. <sup>3</sup>	1 verifierad som positiv med pyrosekvensering
Klinisk mikrobiologi och virologi Statens seruminstitut Köpenhamn (Kliniskt laboratorium)	<u>Serum, helblod, cerebrospinalvätska, fästingar:</u>  <i>Påvisning:</i> Region i 3'-non-coding region amplifieras med realtids-PCR  <i>Artbestämning:</i> Utförs inte	Schwaiger and Cassionetti et al. <sup>13</sup>	0

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

## Konklusion

Jämförelsen mellan de olika laboratorierna i ÖKS-regionen visar att samtliga laboratorier, både kliniska laboratorier och forskningslaboratorier, använder PCR-baserad diagnostik för TBEV-specifik RNA-påvisning. Dock varierar protokollen samt dess sensitivitet och specificitet. Eventuella skillnader avser vi fortsättningsvis att systematiskt analysera genom att jämföra de olika testprotokollen samt försöka att optimera de olika stegen i analysen. Förhoppningsvis kan resultaten utgöra ett stöd för kliniska laboratorier i valet av analysmetod så att den molekylärbiologiska diagnostiken i regionen kan förbättras. Detta är till stor nytta för befolkningen, då rätt diagnos givetvis är högsta prioritet för alla som drabbas av en TBE-infektion.

## Referenser

- 1 Belova, O. A., Burenkova, L. A. & Karganova, G. G. Different tick-borne encephalitis virus (TBEV) prevalences in unfed versus partially engorged ixodid ticks--evidence of virus replication and changes in tick behavior. *Ticks and tick-borne diseases* **3**, 240-246, doi:10.1016/j.ttbdis.2012.05.005 (2012).
- 2 Ruzek, D. *et al.* Mutations in the NS2B and NS3 genes affect mouse neuroinvasiveness of a Western European field strain of tick-borne encephalitis virus. *Virology* **374**, 249-255, doi:10.1016/j.virol.2008.01.010 (2008).
- 3 Andreassen, A. *et al.* Prevalence of tick borne encephalitis virus in tick nymphs in relation to climatic factors on the southern coast of Norway. *Parasites & vectors* **5**, 177, doi:10.1186/1756-3305-5-177 (2012).
- 4 Lindblom, P. *et al.* Tick-borne encephalitis virus in ticks detached from humans and follow-up of serological and clinical response. *Ticks and tick-borne diseases* **5**, 21-28, doi:10.1016/j.ttbdis.2013.07.009 (2014).
- 5 Alekseev, A. N. & Chunikhin, S. P. [The experimental transmission of the tick-borne encephalitis virus by ixodid ticks (the mechanisms, time periods, species and sex differences)]. *Parazitologiya* **24**, 177-185 (1990).
- 6 Studahl, M. *et al.* Acute viral infections of the central nervous system in immunocompetent adults: diagnosis and management. *Drugs* **73**, 131-158, doi:10.1007/s40265-013-0007-5 (2013).
- 7 Gunther, G., Haglund, M., Lindquist, L., Skoldenberg, B. & Forsgren, M. Intrathecal IgM, IgA and IgG antibody response in tick-borne encephalitis. Long-term follow-up related to clinical course and outcome. *Clinical and diagnostic virology* **8**, 17-29 (1997).
- 8 Veje, M. *et al.* Detection of tick-borne encephalitis virus RNA in urine. *Journal of clinical microbiology* **52**, 4111-4112, doi:10.1128/JCM.02428-14 (2014).
- 9 Brinkley, C., Nolskog, P., Golovljova, I., Lundkvist, Å. & Bergström, T. Tick-borne encephalitis virus natural foci emerge in western Sweden. *International Journal of Medical Microbiology* **298**, Supplement 1, 73-80, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.12.005> (2008).
- 10 Norberg, P., Roth, A. & Bergstrom, T. Genetic recombination of tick-borne flaviviruses among wild-type strains. *Virology* **440**, 105-116, doi:10.1016/j.virol.2013.02.017 (2013).
- 11 Melik, W., Nilsson, A. S. & Johansson, M. Detection strategies of tick-borne encephalitis virus in Swedish Ixodes ricinus reveal evolutionary characteristics of emerging tick-borne flaviviruses. *Archives of virology* **152**, 1027-1034, doi:10.1007/s00705-006-0922-9 (2007).
- 12 Skarpaas, T. *et al.* Tickborne encephalitis virus, Norway and Denmark. *Emerging infectious diseases* **12**, 1136-1138, doi:10.3201/eid1207.051567 (2006).
- 13 Schwaiger, M. & Cassinotti, P. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **27**, 136-145 (2003).