

Strategimøte 3. november 2011

Laboratediagnostikk ved borreliose

Redaktører:

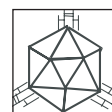
Nils Grude

Yngvar Tveten

Alexa Stutzer

Gunnar Hoddevik

Ingeborg S. Aaberge



STRATEGIMØTE

LABORATORIEDIAGNOSTIKK VED BORRELIOSE

3. NOVEMBER 2011

PROGRAM

OPPSUMMERING OG ANBEFALINGER

SAMMENDRAG AV FORELESNINGER

Redaktører

Nils Grude, Yngvar Tveten, Alexa Stutzer, Gunnar Hoddevik og
Ingeborg S. Aaberge

Referansegruppe for ekstern kvalitetssikring i virologi og serologi

ISBN trykt utgave: 978-82-8082-507-0
ISBN elektronisk utgave: 978-82-8082-508-7

INNHALDSFORTEGNELSE

Innholdsfortegnelse	3
Forord	4
Program	5
Oppsummeringer og anbefalinger	7
Innlegg i følge programmet	
ELISA-tester – styrke og svakheter ved diagnostikk av Lyme borreliose	20
Borrelia C6 peptid - nødvendig supplement?	24
Borreliablot, erfaringer i rutinediagnostikk	28
PCR-diagnostikk av borreliose	30
Borreliadiagnostikk – Kven gjer kva- og når?	31
STING-studien	34
Diagnostikk av nevroborreliose	36
Kontroversielle tester	42
Betydningen av cysteformer og spesifikke sirkulerende immunkomplekser	48
Borreliose på nett	51
Deltagerliste	52

Forord

I regi av ”Referansegruppe for ekstern kvalitetssikring i virologi og serologi” ble det holdt strategimøte om laboratoriediagnostikk ved borreliose den 3. november 2011 i Oslo. Programmet var satt sammen av en programkomité bestående av:

Nils Grude (leder), Yngvar Tveten og Alexa Stutzer.

Møteledere har vært Nils Grude (møteleder del 1) og Alexa Stutzer (møteleder del 2).

Rapporten inneholder oppsummering og anbefalinger for diagnostikk slik det kom fram på møtet, samt sammendrag av foredragene (manuskriptene) som er gjengitt i sin helhet.

Oslo, juni 2012

Nils Grude, Yngvar Tveten og Alexa Stutzer, Gunnar Hoddevik og Ingeborg S. Aaberge

**PROGRAM FOR STRATEGIMØTE OM
LABORATORIEDIAGNOSTIKK VED BORRELIOSE
3. NOVEMBER 2011**

1000-1005: Velkommen og innledning: Leder av referansegruppen Elisebet Haarr

Møteleder del 1: Nils Grude

- 1005-1030 ELISA-tester- styrke og svakheter ved diagnostikk av Lyme borreliose:
Tone Skarpaas, Sørlandet sykehus, Kristiansand
- 1030- 1045 C6: Et nødvendig supplement? Yngvar Tveten, STHF, Skien
- 1045- 1100 Diskusjon
- 1100-1115 Western blot: Sølvi Noraas, Sørlandet sykehus, Kristiansand
- 1115-1120 Diskusjon
- 1120-1135 Pause
- 1135-1155 PCR diagnostikk av borreliose: Andreas Christensen, St. Olavs Hospital,
Trondheim
- 1155-1205 Diskusjon
- 1205-1220 Borreliadiagnostikk- Kven gjer kva- og når? Reidar Hjetland, Helse Førde
- 1120-1235 Diskusjon
- 1235-1320 Lunsj

Møteleder del 2: Alexa Stutzer

- 1320-1350 STING-studien: Per-Eric Lindgren, Linkøping
- 1350-1400 Diskusjon
- 1400-1420 Diagnostikk av nevroborreliose: Einar Nielsen, UNN Tromsø
- 1420-1430 Diskusjon
- 1430-1445 Pause
- 1445-1505 Kontroversielle tester og tester med foreløpig ikke tilstrekkelig
dokumentasjonsgrunnlag: Andreas Emmert, SiV, Tønsberg
- 1505-1520 Betydningen av cysteformer og spesifikke sirkulerende immunkomplekser:
Tore Stenstad, SiV, Tønsberg
- 1520-1535 Diskusjon
- 1535-1545 Borreliose på nett: Yngvar Tveten, STHF, Skien
- 1545-1555 Diskusjon
- 1555-1615 Oppsummering og konklusjoner ved møtelederne

OPPSUMMERINGER OG ANBEFALINGER FOR DIAGNOSTIKK

Innledning: Lyme borreliose

Lyme borreliose er den vanligste flåttbårne sykdommen i Norge og resten av Europa. Sykdommen er en zoonose forårsaket av spiroketen *Borrelia burgdorferi* sensu lato som kan overføres gjennom flåttbitt.

Gnagere og andre pattedyr samt fugler er vertsdyr for borrelia. Vektor i Norge er skogflått (*Ixodes ricinus*) og fuglefjellflått (*Ixodes uriae*).

Borrelia burgdorferi sensu lato er en samlebetegnelse for minst 11 forskjellige typer av denne bakteriefamilien. I Europa er seks borrelia subtyper assosiert med sykdom hos mennesket; de tre vanligste er *Borrelia afzelli*, *Borrelia garinii* og *Borrelia burgdorferi* sensu stricto.

Lyme borreliose er et sykdomskompleks med ulike manifestasjoner, de kan deles inn i tre stadier:

- **Tidlig lokal sykdom:** Lokalt karakteristisk utslett kalt erytema migrans (EM) opptrer 3-30 dager etter bittet. Pasienten kan ha ledsagende influensalignende symptomer som uvelhet, slapphet, hodepine og lymfeknutesvulst uten tegn på systemisk infeksjon. Feber er ikke vanlig. For øvrig kan pasienten oppleve muskelsmerter eller nevralgiske smerter. Ved ledsagersymptomer er det viktig å være oppmerksom på tidlig nevroborreliose/disseminert sykdom. Det er beskrevet en disseminert form av EM (multiple EM) hvor det utover det opprinnelige bittstedet ses flere EM lesjoner andre steder på kroppen.
- **Tidlig systemisk sykdom:** Opptrer to uker til flere måneder etter bitt. Flere organer kan være involvert. Det vanligste sykdomsbildet i Norge og Europa er nevroborreliose med radikulære smerter, fulgt av lymfocytmeningitt og i blant ledsaget av kraniell eller perifer neuritt/parese. Mest vanlig er facialisparese. Nakkestivhet er sjeldent. Artritt og muskuloskeletal borreliosesamt karditt forekommer, men er mer sjelden.
- **Senmanifestasjoner:** Symptomer som har vedvart mer enn 6 måneder til ett år. Hudforandringer kalt acrodermatitis chronica atrophicans (ACA), kronisk artritt i store ledd, meningoradikulitt, encephalitt, myelitt og sjeldnere myositt.

Oppsummeringer/Anbefalinger for laboratoriediagnostikk

ELISA-tester – styrke og svakheter ved diagnostikk av Lyme borreliose

- **Indikasjoner for antistoffundersøkelse:** Klinisk mistanke om disseminert Lyme borreliose.
- **Ikke indikasjon for antistoffundersøkelse:** Flåttbitt, erythema migrans, uspesifikke symptomer og behandlingskontroll.
- **Sensitivitet:** Benyttet EIA test bør inneholde VlsE/C6. EIA tester har høy sensitivitet ved Lyme neuroborreliose, 95-100 % i serum, 97-98 % i CSF og ratio CSF/serum (AI) 100 % etter 6 uker. Ved Lyme artritt og acrodermatitis chronicum migrans er sensitivitet i serum tilnærmet 100 %, men ikke alle artrittpasienter har høyt antistoffnivå.
- **Spesifisitet:** EIA har god analytisk spesifisitet (mht. påvisning av tilstedeværende antistoff), men betydelig lavere diagnostisk spesifisitet, spesielt i endemisk område.
- **Spesielle problemer med IgM:** Falsk positiv IgM kan være naturlig forekommende IgM (hos 1,4 % av befolkningen), og kan sees ved immunologiske sykdommer og ved polyklonal immunstimulering. I en dansk studie (se referanse 10 under Skarpaas sitt innlegg) er andel positive IgM tatt ved indikasjonen utslett bare 17,2 %, mens 44,9 % av de samme pasientene ble behandlet ut fra en klinisk indikasjon. Dette indikerer at sensitiviteten er lav ved erythema migrans og dermed heller ikke bør benyttes. I den samme studien ble det ut fra flere vurderinger estimert at 5-6 % av IgM resultatene var falsk positive. Det bør vurderes om IgM analysen skal utgå som rutine og bare vurderes utført på spesielle indikasjoner (alder og klinikk).
- **Ny prøve eller behandlingskontroll:** Ny prøve kan være indisert i diagnostisk øyemed. Dette gjelder særlig ved mistanke om disseminert sykdom, spesielt neuroborreliose. Siden antistoffnivået (både IgM og IgG) kan holde seg høyt i både serum og spinalvæske i mange år etter adekvat behandlet infeksjonen, anbefales ikke antistoffundersøkelse som terapikontroll.
- **Flere tester:** Teoretisk vil bruk av to tester øke både sensitivitet og spesifisitet. Problemet er i dag hvilke tester som skal benyttes. Siden de fleste screeningstestene inneholder VlsE-antigenet er det usikkert om tilleggsundersøkelse med C6-peptid bidrar noe til økt sensitivitet. I screening av blodgivere fines det noen få C6 positive som er ELISA-IgG negative. Dette må evt. evalueres i en pasientpopulasjon. Blotundersøkelse har i de fleste studier vist å gi en økt spesifisitet på 1-2 %. Fra land som har benyttet to-trinns tester (EIA + WB) diskuteres det nå om tester med VlsE/C6 som antigen har så høy sensitivitet og spesifisitet at de kan benyttes alene.
- **Konklusjon:** Det viktigste tiltak for å forbedre den serologiske diagnostikk er innstramning av indikasjonsområdet. Høyere prevalens i den befolkning som testes vil gi betydelig gevinst i positiv prediktiv verdi. Dette forutsetter god kommunikasjon med rekvirent og utførende laboratorium. Siden prevalensen og risikoen for smitte etter flåttbitt er lav, er faren stor for overdiagnostisering i endemiske områder.

C6 peptid – et nødvendig supplement?

- **Metode:** ELISA-test basert på deler av antigenet VsIE: Innenfor variabelt område finnes ikke- variable regioner (IR₁₋₆) hvorav den mest konserverte, IR₆, er immundominant. Syntetisk C6 peptid anvendes i testen.
- **Sensitivitet:**

Kliniske symptomer	Sensitivitet C6 %	Sensitivitet to-trinn % (ELISA+WB)
Akutt EM	19-34	17
EM etter antibiotikabehandling	34-47	53
EM med allmennsymptomer, multiple EM	38	43
Som over, men etter antibiotikabehandling	63	75
Akutt neurologisk sykdom	95-100	100
Artritt, akrodermatitt	67-100	100
Post-Lyme symptomer	43-62	71

- **Spesifisitet:** Spesifisitet ved undersøkelse av blodgivere angis til 95 – 99 %, ved neuroborreliose 88-95 %. Spesifisitet ved totrinns analysene er stor sett angitt noe høyere (98 %).
- **Anvendelse:**
 - Ut fra angitte publikasjoner kan C6 benyttes til å vurdere behandlingsrespons ved lokalisert og tidlig disseminert sykdom. Hos pasienter med lang sykdomsvarighet og ved post-Lyme borreliose synes ikke C6 å kunne bidra til vurdering av terapeutisk suksess.
 - C6 kan benyttes til å avklare spesifisitet ved lave IgG nivåer påvist ved ordinær ELISA-metodikk.
 - Det bør avklares om C6 kan være positiv ved negativ tradisjonell ELISA. Hvis dette er tilfelle kan det være riktig å ha C6 tilgjengelig som en ”second opinion” test for utvalgte pasienter (se under ”Flere tester” i forrige hovedavsnitt).

Borrelia Immunoblot

1. Generelt om borrelia blot

- Ved smitte med borrelia får vertsorganismen kontakt med ulike antigener som er lokalisert på og/eller i borreliabakterien eller som presenteres først i vertsorganisme når immunsvaret blir utløst. I motsetning til en ELISA-test, hvor alle antigener er samlet i en brønn (”total –IgG” eller ”-IgM”), kan man med en immunoblot vurdere enkelt-bånd som representerer enkelte spesifikke antigen-antistoff-reaksjoner.
- Noen antigener gjelder som særlig immunogene (høy sensitivitet), men lite spesifikke (for eksempel p41). Kryssreaksjoner kan forekomme (lav spesifisitet).

- Noen antistoff gjelder som markør for tidlig smitte (f. eks. OspC), mens andre er markører for smitte en stund tilbake i tid (f. eks. p18, p83 og p100) og noen antigener (f. eks. VlsE) uttrykkes kun i vertsorganismen ved smitteoverføring.
 - Antistoffene kan vedvare lenge etter gjennomgått infeksjon og derfor er det generelt ikke mulig å tidfeste en infeksjon ved hjelp av blot ved en enkel prøve. Derimot kan forandring av båndmønster ved undersøkelse av parsera brukes som argument for aktuell eller nylig borreliasmitte.
- Det er per i dag ikke mulig å typebestemme borrelia ved hjelp av blot. Noen antigener som inngår i immunoblot skal være spesifikk for enkelte borreliatyper, men dette er nokså usikker.
- Nyere borrelia immunoblot bruker både native antigener høstet fra kultur og rekombinante antigener på samme nitrocellulosemembran (teststripe) for å optimalisere sensitiviteten (Western blot/ Line blot). Man kan ikke sammenligne de enkelte immunoblot med hverandre. Siden det mangler gullstandard i borreliadiagnostikken og internasjonale studier, er det viktig med en god validering av metoden når man skal ta i bruk en ny immunoblot.
- Med en borrelia blot kan man påvise og skille IgM- og/eller IgG- antistoffer mot enkelte antigener som er festet på teststripen. Noen av disse antigene tillegges mer vekt mtp. aktuell klinisk betydning enn andre (f.eks. OspC og VlsE). For tolkning av båndmønster og kriterier for positivt resultat bør man følge anbefalinger fra testprodusenten.
- Falskt positive borrelia blot kan forekomme (ELISA-negative). Man kan diskutere om kriteriene for bedømmelse av positivt resultat for blot fra testprodusenten eventuelt er for lave.
- Det finnes maskinelle avlesningssystemer og dataprogrammer for immunoblot, som hever kvaliteten og gir bedre mulighet for lagring av resultatene (båndmønster på teststripe taper fargeintensiteten med tiden).
- Antistoff mot borrelia kan opptre først 6-8 uker etter smitte. Det gjelder for blot på lik linje med ELISA-tester. Negativt resultat utelukker ikke borrelismitte i tidlig fase. Det er observert sensitivitetsforskjell mellom ulike blot i tidlig fase (se referanse 5 under Reidar Hjetland sitt innlegg).
- Immunoblot er ressurskrevende og mer kostbart enn andre serologiske tester (f.eks. ELISA).
- Nye muligheter for blot er underveis med bruk av Luminex-teknologi. Metoden kan påvise antistoff mot mange ulike antigener merket på kuler, i samme brønn. Avlesning gjøres maskinelt (unngår visuell og individuell tolkning av båndmønster). Metoden har et stort lineært avlesningsområde og programvare for automatisk produksjon av Reibergram leveres.

2. Borrelia immunoblots rolle i rutinediagnostikken

- Ingen klare anbefalinger for bruk av borrelia blot i rapporten om borreliadiagnostikk fra Helsedirektoratet i 2009.
- I Norge blir blot hovedsakelig brukt som konfirmasjonstest for ELISA-resultater ved noen laboratorier.
- I andre land med høy forekomst av borreliose som Tyskland og USA er blot en mer obligatorisk del av diagnostikken.
- Det finnes så langt ingen konsensus om hvilken type konfirmasjonstest ved borreliadiagnostikk (en annen ELISA-borrelia-antistofftest, C6 peptid eller immunoblot) som er å foretrekke.

3. Borrelia Immunoblot anbefales utført hovedsakelig ut fra følgende indikasjoner:

- Som konfirmasjonstest ved positiv primærttest (ELISA) IgM, IgG eller begge.
- Som screeningstest nr. 2 ved negativ primærttest, langvarig symptomatologi hvor det er stor klinisk mistanke om borreliose.

PCR-diagnostikk av borreliose

Forventningene til nytten av PCR ved borreliose er ikke innfridd.

PCR anbefales derfor ikke som førstelinjemetodikk, men kun som et supplement i spesielle tilfeller:

- Kan benyttes på leddvæske eller synovialbiopsi ved mistanke om borreliaartritt der serologiske resultater er vanskelige å tolke
- Kan benyttes på spinalvæske ved mistanke om neuroborreliose der serologisk diagnose er usikker (tidlig fase av sykdommen før intratekal antistoffproduksjon er kommet i gang)
- Kan benyttes på flere typer materiale ved mistanke om borreliose hos immunsupprimerte pasienter
- Kan benyttes på hudbiopsi ved mistanke om atypisk erythema migrans i tidlig fase før serokonversjon

I alle disse situasjonene vil det være viktig å understreke at et negativt resultat har liten diagnostisk verdi.

For bruk av PCR ved andre kliniske problemstillinger/andre prøvematerialer varierer tallene for sensitivitet og spesifisitet sterkt fra studie til studie. Det er ikke mulig å foreta en systematisk evaluering av de ulike metodene pga mangel på standardisering.

Videre forskning bør utføres på klinisk klart definerte tilfeller av pasienter med Lyme Borreliose. Man bør da mest sannsynlig benytte seg av en multipleks PCR som inneholder både kromosomale og plasmid primere. Videre er det noen ekstraksjonsmetoder som ser ut til å skille seg ut. Framtidige studier må konfirmere resultatene ved hjelp av hybridisering/sekvensering.

Basert på foreliggende dokumentasjonen er det et stykke å gå før man har etablert PCR i rutinediagnostikken av Lyme Borreliose.

Diagnostikk av nevroborreliose

Inndeling av nevroborreliose/ begrepsdefinisjon:

1. Perifer nevroborreliose

Akutt/ subakutt debut av en eller flere av følgende:

- Lammelser (hjernenenerver og/eller spinalnerver)
- Radikulerende smerter
- Hodepine
- Parestesier.

Ofte forutgående eller ledsagende allmennsymptomer.

Mulig asymptomatisk forløp eller kun milde symptomer.

Små barn kan ha utelukkende diffuse symptomer i form av nyoppstått slapphet, tretthet, uvelhet.

2. Sentralnervøs nevroborreliose

Borrelia-encefalitt og –myelitt er sjeldne tilstander.

Mangeartet klinisk bilde for begge tilstandene.

Mistanken bør forbeholdes tilfeller med objektive nevrologiske/ kognitive utfall.

Anbefalt laboratoriediagnostikk:

Perifer nevroborreliose

Sikker diagnose ved passende klinikk og mononukleær pleocytose i spinalvæske og minimum ett av følgende kriterier:

- Klassisk mønster for totalantistoff i serum og spinalvæske vurdert med Reibergrammer.
- Positiv antistoffindeks for IgM og IgG.

Dako nevroborrelioseindeks

Forholdet mellom påvist mengde antistoff i spinalvæske og serum vil gi svar på om påvist antistoff i spinalvæsken skyldes intrathekal antistoffproduksjon eller lekkasje pga. defekt blod/hjerne barriere. Fortynningene i serum og spinalvæske er tilpasset ulike antistoffnivåer i serum og spinalvæske

Reiber metode (Reibergram) og antistoffindeks:

Kombinasjon av kvantitativ måling av spesifikke borrelia-antistoff i spinalvæske og serum og en evaluering av funksjon av blod-hjerne-barrieren ved hjelp av en totalproteinanalyse i spinalvæske og serum (kvotientberegning). Beregning av spesifikk antistoffindeks gjøres med hensyn til proteinkvotientene.

Denne metoden inneholder tre trinn:

1. Måling av borrelia-spesifikke antistoff i serum og spinalvæske.

2. Måling av totalantistoff (albumin, total-IgG og -IgM) i serum og spinalvæske.
3. Beregning av proteinkvotienter (grafisk fremstilt = Reibergram) og antistoffindeks (bruk av ferdige regneark levert fra testprodusentene).

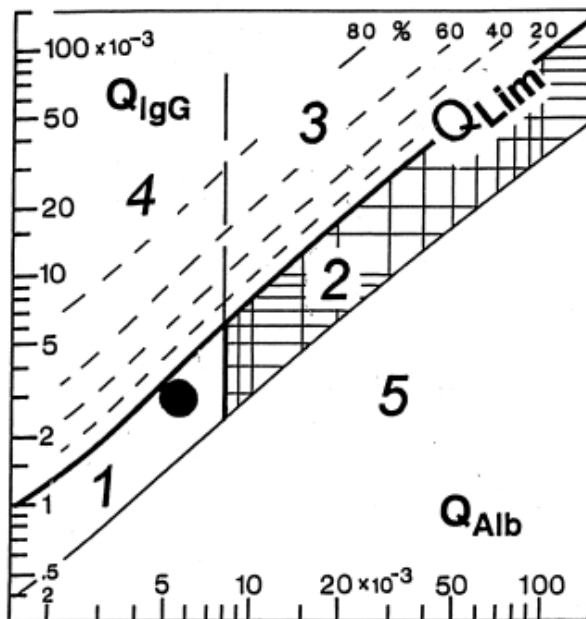
Ved hjelp av denne teknikken får man svar på følgende viktige spørsmål:

Har pasienten barrieresvikt?

Er den målte fraksjonen borrelia-antistoff i spinalvæske intratekalt produsert?

Antistoffkvotientene og albuminkvotienten legges inn i følgende diagram:

Slik kan resultatene tolkes på en illustrativ måte.



Reiber diagram.

- 1: Normal område. Intakt blod-hjernebarriere. Ingen økt intratekal antistoffproduksjon.
- 2: Dysfunksjon i blod-hjernebarrieren. Ingen økt intratekal antistoffproduksjon.
- 3: Dysfunksjon i blod hjernebarrieren, økt intratekal antistoffproduksjon.
- 4: Normal blod-hjernebarriere, økt intratekla antistoffproduksjon.
- 5: Feil ved prøvetakning eller ved analysen.

Typisk mønster for akutt perifer nevroborreliose:

- Uttalt barrieredysfunksjon og økt intratekal produksjon av antistoff (størst IgM, fulgt av IgA og IgG).
 - Ved diagnostetidspunkt for perifer nevroborreliose er sensitivitet og spesifisitet for dette mønsteret henholdsvis 70 % og 96 %.
 - Sensitiviteten øker de første dagene og ukene i akutfasen og synker deretter etter hvert når sykdommen går over.
 - Etter gjennomgått nevroborreliose kan antistoff være målbar i spinalvæske lenge (uker til mange mnd.), dvs antistoffundersøkelser er ikke egnet som forløps- eller behandlingskontroll.

Dako nevroborrelioseindeks eller Reibergram?

Det foreligger ingen publiserte studier med en slik sammenligning. Preliminære resultater fra enkelte laboratorier i Norge tyder på bedre sensitivitet ved bruk av Reibergram, men prospektive studier på klart definerte nevroborreliosepasienter bør gjennomføres.

Tid fra symptomdebut er en viktig faktor ved tolkning av analyseresultat:

- Manglende påvisbare intratekale borrelia-antistoff utelukker ikke nevroborreliose i tidlig fase (de første 6-8 uker etter smitte).
Klinikk og celletall i spinalvæske må være grunnlag for å vurdere behandlingsindikasjon.
- Negativ serologi og spinalvæskeundersøkelsen ved symptomer over 6-8 uker utelukker nevroborreliose.

Sentral nevroborreliose- encefalitt / myelitt

Det publiserte materialet er ikke stort nok for å kunne gi konkrete anbefalinger. Diagnosestilling må gjøres i samarbeid med kliniker, mikrobiolog og radiolog på skjønnsmessig grunnlag.

Mistanken bør forbeholdes tilfeller hvor det foreligger objektive nevrologiske og / eller kognitive symptomer som tilsier sentralnervøs patologi.

Mulig fremtidig diagnostikk/ aktuell forskningsaktivitet:

CXCL 13:

- B-celle kjemoattraktant som produseres av dendrittiske celler i CNS etter stimulering av TLR-2.
- Mulig sensitiv markør for perifer nevroborreliose og eventuell sykdomsaktivitet.
- Analysen utføres på spinalvæske.
- Positiv tidlig under infeksjonen før økning i celletall og intratekal antistoffproduksjon kan påvises
- Testing ikke tilgjengelig i Norge ennå.
- Sensitiviteten for CXCL13 ved akutt nevroborreliose er angitt til 96 – 100 %.
Testen synes foreløpig nyttig ved tidlig nevroborreliose før intratekalt produserte antistoff kan påvises og hvor det ikke er startet behandling. Foreløpige resultater kan tyde på raskt fall etter behandlingsstart eller når intratekal antistoffproduksjon er kommet i gang. Datagrunnlaget for andre pasienter med inflammasjon i CNS og for pasienter med kronisk nevroborreliose er foreløpig usikre. I disse tilfellene er det spesielt viktig å bli enige internasjonalt om hvilken cut off som skal benyttes.

Massespektrometri:

Ikke etablert for borreliadiagnostikk i Norge ennå.
Så langt kun forskningsprosjekter.

Kven gjer kva- og når?

- Forslag til matrise:

Metode	Laboratorium	Når	Kvifor
ELISA m/VlsE	Alle	Alltid	God sensitivitet
C6-ELISA	Til konfirmasjon Evt. alle	Svak pos ELISA IgG og suspekt klinikk Unntaksvis som ELISA nr. 2 ved suspekt klinikk og negativ primær- ELISA	Aukar spesifisitet
Blot	Til konfirmasjon Region Evt. alle?	Pos. ELISA og neg. C6 for utvalde Heilt unntaksvis for ELISA negative Isolert positiv ELISA IgM kombinert med sterk klinisk mistanke	Etter konferanse med klinikar?
PCR	Nasjonalt, evt. region	Leddvæsker, evt. biopsiar, spinalvæske	Dette kan raskt endre seg
Dyrking, evt med res.best., stamme- karakterisering mv.	Nasjonalt	Forsking	
Andre	Nasjonalt	Forsking	
CSF/serum	Alle i endemisk område		

- Vidaresending: Som hovudregel bør det praktiserast to alternativ; eige regionlaboratorium og det nasjonale referanselaboratoriet (Kristiansand)
- Spesielt for nevroborreliose: Sjå avsnitt foran.
- Utsvaring: Dei ulike laboratoria bør tilstrebe og bruke same nemning på same svar, og med liknande kommentarpraksis.

Kontroversielle tester og tester med foreløpig ikke tilstrekkelig dokumentasjonsgrunnlag.

- **Lymfocytt transformasjonstester og telling av CD57+/CD3- lymfocytter:** Begge tester utføres for norske pasienter i Tyskland. Det foreligger foreløpig ikke dokumentasjon som tilsier at disse testene har noen plass i diagnostikken av borreliose. Bruken frarådes også i nasjonale anbefalinger fra Tyskland, Frankrike, England, Nederland og USA.
- **CXCL13:** Se side 15 under avsnittet Mulig fremtidig diagnostikk

Betydningen av cysteformer og spesifikke sirkulerende immunkomplekser:

- Betydningen av cysteformer fortsatt uklar
- Kjent fra dyreeksperimentelle studier forekomst av viable og infektiose spiroket-former som er resistente overfor en rekke antibakterielle midler
- Hvilken betydning disse observasjonene har i en klinisk kontekst, og hvilken sammenheng som eksisterer mellom disse og cysteformer av *B burgdorferi* s.l. er imidlertid uviss.
- Deteksjon av immunkomplekser ved Lyme borreliose er godt dokumentert
- Usikker nytteeffekt av immunkompleksmålinger kontra frie antistoffer både hva gjelder terapieffekt og eventuelt persisterende infeksjon

På denne bakgrunn anbefales nevnte metoder kun i forskningsmessige og eksperimentelle studier. Det er behov for ytterligere dokumentasjon før slike analyser kan implementeres i diagnostisk prosedyre.

SAMMENDRAG AV FORELESNINGENE

ELISA tester - styrke og svakheter ved diagnostikk av Lyme borreliose

Tone Skarpaas, Mikrobiologisk avdeling, Sørlandet sykehus HF

Indikasjoner for antistoff undersøkelse: Klinisk mistanke om disseminert Lyme borreliose (LB). Innstramming av indikasjon vil gi bedre prediktive verdier for undersøkelsen.

Ikke indikasjon for antistoffundersøkelse: Flåttbitt, Erythema migrans (EM), uspesifikke symptomer, behandlingskontroll.

Borrelia spiroketen har en kompleks antigensammensetning. Mange strukturelle og immundominante antigener kodes av lineære og sirkulære plasmider. Elisa tester som benytter helcelle som antigen ansees som mindre spesifikke enn tester med rekombinante antigener. Tester med rekombinante antigener inneholder færre, men viktige antigener. VlsE/C6 er mer korrelert til aktiv infeksjon enn mange andre antigener.

ELISA (EIA) tester som benyttes i Norge til påvisning av spesifikke antistoff mot *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Produsent/ Forhandler	Navn	Antigen(er)	Antistoff klasse	Absorpsjon	Auto- matisering
Dade Behring/ Siemens	Enzygnost Lyme Link	Helcelle Ba* PKo + rekombinant VlsE	IgM, IgG	IgM: RF absorpsjon	Ja
Oxoid	IDEIA borrelia IgM,IgG	Bb flagellin (P41) fra Ba	IgM, IgG	IgM μ -capture	Ja
Immunetics	C6 B.burgdorferi ELISA kit	Rekombinant C6	IgG Hovedsakelig		Sannsynligvis mulig
Mikrogen/ Orion	RecomWell Borrelia	Rekombinante antigener IgM: Osp C (Ba,Bg*), P41/internal, Vlse IgG p100 (Ba), Osp C (Bbss*,Bg), VlsE, P 18(Ba)	IgM, IgG		Ja
Virion/Serion	Elisa Borrelia burgdorferi	OspC, P100, DbpA PKo, DbpA Pb, P41 og Ba PKo lysat	IgM, IgG	Treponema phagedensis absorpsjon, IgM: RF faktor absorpsjon	Ja
Liaison DiaSorin	Borrelia burgdorferi IgG, IgM	Rekombinante Ag IgM: OspC, VlsE IgG: VlsE	IgM, IgG		Ja
Euroimmun	Anti-Borrelia	Helcelle ekstrakt Bbss,Ba,Bg + rekombinant VlsE	IgM, IgG	IgM: IgG/RF absorbent	Ja

* *Borrelia afzelii* (Ba), *Borrelia garinii* (Bg), *Borrelia burgdorferi* sensu stricto(Bbss).

Viktige EIA momenter: Sensitivitet, spesifisitet (analytisk og diagnostisk), mulighet for kvantitering, inter assay variasjon, praktisk anvendbarhet og automatisering.

Det er få gode studier av EIA tester bla. pga. lite sensitiv gullstandard (påvisning av bakterien). I publiserte undersøkelser er basis en tilnærmet gullstandard, dvs. en kombinasjon

av klinisk bilde og laboratorieundersøkelser. Konklusjoner i undersøkelser utført i USA kan ikke alltid direkte overføres til europeiske forhold pga. at de i USA kun har Bbss, mens vi i Europa har flere forskjellige borrelia subtyper. På grunnlag av oversiktsartikler (1, 2, 3, 4) og erfaring kan følgende konklusjoner trekkes:

Sensitivitet: Benyttet EIA test bør inneholde VlsE/C6. EIA tester har høy sensitivitet ved Lyme nevroborreliose (LNB), 95-100 % i serum, 97-98 % i CSF og ratio CSF/serum (AI) 100 % etter 6 uker (5, 6, 7, 8). Ved Lyme artritt (LA) og Acrodermatitis chronicum migrans (ACA) er sensitivitet i serum tilnærmet 100 %, men ved LA har ikke alle høyt antistoffnivå

Spesifisitet: EIA har god *analytisk spesifisitet* (mht. påvisning av tilstedeværende antistoff). Man må imidlertid vite at det kan være kryssreaksjon med syfilis spiroketen og at ca. 1,5 % av befolkningen har naturlig forekommende P-41- IgM antistoff (9). IgM er ofte falsk positiv ved immunologiske lidelser. EIA har lavere *diagnostisk spesifisitet*, spesielt i endemisk område. Borrelia antistoff kan påvises ved polyklonal stimulering, for eksempel ved Epstein Barr virus infeksjon. Den viktigste årsak til lav diagnostisk spesifisitet i endemisk område er imidlertid høy seroprevalens i befolkningen etter tidligere møte med mikroben. For å kunne vurdere diagnostisk spesifisitet av den EIA test man benytter, må man kjenne testens seroprevalens i lokalområdet.

Kvantitering: Standard for kvantitering av borrelia antistoff i Internasjonale enheter finnes ikke. Så vidt vi har erfart, gir ”% av cut off” den mest stabile angivelse av antistoffnivå. Ved Sørlandet sykehus angis høyt antistoffnivå beregnet ut fra testens ”Mean OD + 3SD” blant blodgivere. I diagnostikk har høyt antistoffnivå kombinert med klassiske symptomer høy spesifisitet. Diagnostisk sensitivitet er ikke høy, idet personer med lavere antistoffnivå kan ha borrelia infeksjon.

Inter assay variasjonen er betydelig, dvs. resultatene varierer når samme prøve undersøkes med samme test flere ganger. Ved sammenlikning av antistoffnivåer, må derfor prøvene testes i samme oppsett. Det krever at rekvirenten oppgir at prøven skal undersøkes sammen med tidligere prøve.

Tolkning av IgM. Det forekommer både falske negative- og falske positive IgM sett i forhold til diagnostikk av aktuell LB. Hos barn er IgM en bedre sykdomsmarkør enn hos voksne. I en nylig publisert undersøkelse om bruk av serologi i allmennpraksis i Danmark konkluderes det med at 0-15 år og suspekt EM var de eneste signifikante prediktorer for påvist IgM (10). Falske negative er ikke uvanlig fordi IgM ikke kan påvises hos alle pasienter med disseminert LB. Grunnen er at bakterien påvirker immunapparatet slik at immunresponsen ved borreliose er langsom og individuell. Falsk positiv IgM sees ikke sjelden ved immunologiske sykdommer og ved polyklonal stimulering. Ved påvist IgM hos en pasient med symptomer som kan være forenlig med LB, praktiserer vi ved Sørlandet sykehus å be om ny prøve etter 4-6 uker. Dersom IgG ikke detekteres i kontrollprøven, er IgM høyst sannsynlig falsk positiv. Isolert IgM uten IgG respons etter få ukers sykehistorie må tolkes med stor forsiktighet, spesielt i kombinasjon med ikke-distinkt sykdomsbilde. I daglig rutine legges hovedvekten på IgG vurdering. Kan separat IgM påvisning sløyfes hos voksne pasienter?

Ny prøve? Ny prøve er kun indisert i diagnostisk øyemed. Dersom det er klinisk mistanke om disseminert LB, prøven er tatt tidlig i sykdomsforløp og antistoff ikke påvises med EIA, kan det være aktuelt å ta ny prøve etter 2-4 uker, spesielt hvis pasienten ikke behandles (husk parallelt oppsett). Dersom pasienten får behandling, vil immunresponsen bremses eller stanses. Ny prøve vil da som oftest ikke gi mer informasjon.

Er det nødvendig å benytte flere tester? Hensikten må være å øke sensitivitet og/eller spesifisitet. Sensitivitet: Kan sensitiviteten økes ved å benytte to tester hos en pasient med klinisk sannsynlig LB og antistoff ikke påvist? Teoretisk vil man ved bruk av to tester alltid øke sensitiviteten. Hvilke tester skal man i så fall benytte? Resultatet i en nylig publisert undersøkelse fra USA viste at C6 EIA alene og 2 EIA (helcelle+C6) var mer sensitiv enn EIA+WB (6).

Spesifisitet: For å øke spesifisiteten er det i USA og store deler av Europa fremdeles anbefalt å benytte to trinns testing med EIA+WB. I Skandinavia gjennomføres ikke dette rutinemessig (11). Branda et. al. viste at 2 EIA og EIA+WB hadde en spesifisitet på 99,5 % og C6 EIA alene 98,4 %. Betydningen av forskjell i spesifisitet er avhengig av antall undersøkelser laboratoriet utfører (6).

Det diskuteres nå om tester med VlsE/C6 som antigen har så høy sensitivitet og spesifisitet at de kan erstatte to-trinns testing. (1, 5, 6, 12).

Behandlingskontroll. Antistoffnivået holder seg høyt både i serum og spinalvæske i måneder og år etter infeksjon. I retningslinjer er det pr. i dag ikke anbefalt antistoff undersøkelse som terapikontroll.

Diagnostiske utfordringer: Påvisning av mikrobe gir diagnosen i noen tilfeller av LB. Annen helt sikker aktivitetsmarkør finnes ikke i dag. Likevel gir antistoff undersøkelse sammenholdt med det kliniske bildet tilfredsstillende diagnostikk ved disseminert LB. Det viktigste for å forbedre både sensitivitet og spesifisitet, i forhold til å stille diagnosen LB, er sannsynligvis innstramming av indikasjon og kommunikasjon med rekvirent (13). Toveis kommunikasjon mellom rekvirent og det mikrobiologiske laboratorium er svært viktig. Prøvene må sees på som henvisning til spesialist, og rekvirentene må gi de nødvendige opplysninger. På den annen side er laboratoriets tolkningskommentarer avgjørende for å bidra til at det stilles riktig diagnose.

Diagnostikk av EM, LNB, LA og ACA er tilfredsstillende når klinisk bilde og antistoff undersøkelse sammenholdes. I og med at alle sider av LB ikke er klarlagt, kan det imidlertid ikke utelukkes at uvanlige sykdomsbilder kan være forårsaket av spiroketen. Det største problemet er likevel ikke underdiagnostisering, men snarere faren for overdiagnostisering av LB på grunn av høy seroprevalens i befolkningen i endemiske områder.

Referanser

1. Agüero-Rosenfeld M. Lyme Disease: Laboratory Issues. *Infect Dis Clin N Am* 2008; 22: 301-13.
2. Stanek G, Fingerle V, Hunfeld KP et al. Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:69-79.
3. WWW.EUCALB.com
4. Rapport til Helsedirektoratet fra arbeidsgruppe: Diagnostikk og behandling av Lyme borreliose. 2009. www.helsedirektoratet.no.
5. Steere AC, McHugh G, Damle N, Sikand VK et. Prospective Study of serologic Tests for Lyme Diseases. *CID* 2008; 47:188-95.
6. Branda JA, Linskey K, Kim YA et al. Two-tiered antibody testing for Lyme disease with use of 2 enzyme immunoassays, a whole cell sonicate enzyme immunoassay followed by a VlsE C6 peptide enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis* 2011;53:541-7.

7. Skarpaas T, Ljøstad U, Søbye M, Mygland Å. Sensitivity and specificity of a commercial C6 peptide enzyme immuno assay in diagnosis of acute Lyme neuroborreliosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007;26:675-7.
8. Ljøstad U, Skarpaas T, Mygland Å. Clinical usefulness of intrathecal antibody testing in acute Lyme neuroborreliosis. *Eur J Neurol* 2007;14:873-6.
9. Ulvestad E, Kristoffersen EK. Falskt positivt serologisk prøvesvar ved mistenkt borreliose. *Tidsskr Nor Lægeforen* 2002;122:88-90.
10. Dessau RB, Bangsborg JM, Ejlertsen T et al. Utilization of serology for the diagnosis of suspected Lyme borreliosis in Denmark: Survey of patients seen in general practice. *BMC Infect Dis* 2010; 10:317.
11. Dessau R, Eliasson I, Skarpaas T, Nyman D. Testing for Lyme borreliosis in the Nordic countries – variations in strategies and rate of seropositivity. Report from a survey of laboratory methods used in Scandinavia. 2011 Ikke publisert.
12. Nymann D, Willen L, Jansson C et al. VlsE C6 peptide and IgG ELISA antibody analysis for clinical diagnosis of Lyme borreliosis in an endemic area. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:496-7.
13. Kristiansen BE, Grude N, Tveten Y, Emmert A. Laboratoriediagnostikk ved Lyme borreliose. *Tidsskr nor Lægeforen* 2009; 129:2132-4.

Borrelia C6 peptid – nødvendig supplement?

Yngvar Tveten, Seksjon for laboratoriemedisin, Sykehuset Telemark HF, Skien

Borrelia C6 peptid er et syntetisk antigen som kan benyttes i antistoffdiagnostikken av borreliainfeksjon. Det har vært hevdet at analysen er den mest dynamiske vi har og at den kan benyttes som en aktivitetsparameter.

Antigenet

Antigenvariasjon er en effektiv strategi som mikrobene benytter seg av for å unngå immunapparatet. Dette er kjent bl.a. fra *Borrelia hermsii* (lipoprotein på overflaten - Vmp), afrikansk sovesyke (glykoprotein på overflaten – VSG) og *Neisseria gonorrhoeae* (aktivisering av sovende pili gener). *Borrelia burgdorferi* uttrykker på samme måte et lipoprotein på overflaten, VlsE (variable major protein-like sequence, expressed), som også gjennomgår antigen variasjon. VlsE inneholder både variable og ikke-variable regioner. Innenfor det variable området finnes det i tillegg seks ikke-variable regioner (IR₁₋₆). Disse IR er konserverte mellom ulike Borrelia-arter. De fleste ikke-variable regioner er ikke immunogene, men hos Borrelia har det vist seg at den mest konserverte IR, IR₆, er immundominant (1). Dette er bakgrunnen for at syntetisk framstilt C6 kan benyttes i borreliadiagnostikken.

Sensitivitet

Sensitivitet i ulike stadier (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8):

Kliniske symptomer	Sensitivitet C6 %	Sensitivitet to-trinn % (ELISA+WB)
Akutt EM	19-34	17
EM etter antibiotikabehandling	34-47	53
EM med allmennsymptomer, multiple EM	38	43
Som over, men etter antibiotikabehandling	63	75
Akutt neurologisk sykdom	95-100	100
Artritt, akrodermatitt	67-100	100
Post-Lyme symptomer	43-62	71

Spesifisitet

Spesifisitet ved undersøkelse av blodgivere angis til 95 – 99 %, ved neuroborreliose 88-95 % (5, 6). Spesifisitet ved totrinns analysene er stor sett angitt noe høyere (98 %). En artikkel (4) angir problemer med spesifisitet hos pasienter med EBV-infeksjon og hos syfilispasienter med positiv RPR.

Aktivitetsmarkør

Enkelte (også i Norge) har hevdet at C6 kan benyttes som aktivitetsmarkør og at testen er den mest dynamiske parameter vi har til å monitorere behandlingseffekt.

En av grunnene til at C6 initialt ble betraktet som en aktivitetsmarkør var at man påviste færre seropositive blodgivere ("friske personer") med positiv C6 enn med andre ELISA-tester (4).

En høyere spesifisitet ble oppfattet som et bedre mål for å avklare de som ikke er syke og indirekte som en bedre parameter for aktiv sykdom.

Det er senere publisert flere artikler som har fulgt pasienter med borreliose i ulike stadier. Under gjennomgås noen av disse.

Phillip (9): Det vises her at i eksperimentelle studier får man en mye sterkere reduksjon i titer av C6 enn tradisjonelle ELISA-tester målt hos aper infisert med borrelia og som har fått behandling med doksycyklin. De angir at pasienter med tidlig sykdom og pasienter med sen sykdom som responderer klinisk, har alle signifikante fall i C6 titer. Hos 3 pasienter med vedvarende symptomer fikk man ikke tilsvarende reduksjon i titer. Konklusjon: Endring av C6 etter behandling må undersøkes nærmere for å kunne vise sammenheng med serologi eliminasjon av spiroketen.

Phillip (10): Reduksjon i C6 titer etter 6 mnd hos alle med EM og hos 25 av 34 med disseminert sykdom (ikke nærmere angitt). Konklusjon: C6 kan benyttes til kontroll hos pasienter med tidlig borrelia-sykdom.

Marangoni (11): Alle 15 pasienter med tidlig sykdom hadde signifikant reduksjon VIsE titer. Konklusjon: C6 kan benyttes til kontroll hos pasienter med tidlig borrelia-sykdom.

Phillip (12): Av 105 pasienter (93 EM og 27 multiple EM) hadde 96 en signifikant reduksjon i C6 titer 6-12 mnd etter behandling. Det var færre i gruppen med multiple EM som ble seronegative 42,3 vs. 64,5 %). Konklusjon: C6 kan benyttes til kontroll hos pasienter med tidlig borrelia-sykdom.

Peltomaa (13): 8 av 24 pasienter med tidlig sykdom og 18 av 21 pasienter med sen sykdom hadde ikke signifikant reduksjon i C6 titer etter behandling. Av 32 pasienter med tidlig eller sen sykdom som var symptomfrie etter behandling hadde henholdsvis 50 og 83 % fortsatt C6 titer 8-15 år etter behandling. Konklusjon: Persisterende C6 antistoff kan ikke tas til inntekt for tilstedeværelse av borrelia spiroketer.

Fleming (14): Pasienter med kronisk Lyme borreliose. Ingen korrelasjon mellom C6 nivå og behandling eller klinisk respons. Konklusjon: C6 kan ikke benyttes for å si noe om aktiv infeksjon i en slik pasientpopulasjon.

Immunrespons

Stor VIsE-antigen variasjon vil medføre kortvarig B-celle stimulering og en immunrespons uten T-hjelper celler (T-celle uavhengig, B-celle respons). Dette i motsetning til produksjon av antistoff mot andre mer stabile borrelia-antigen. Hvis pasientene behandles tidlig vil det ikke produseres hukommelsesceller og antistoffresponsen vil avta forholdsvis raskt.

Vedvarende antigenstimulering vil medføre utvikling av både B- og T- hukommelsesceller. Jo lengre infeksjonen får gå ubehandlet, jo sterkere blir antistoffresponsen og jo mindre sannsynlig er det at man oppnår reduksjon i C6-nivå etter behandling(10).

Phillip (9) hevder at C6-antigenet sjelden eller aldri forekommer i døde spiroketer.

Vedvarende høyt antistoffnivå mot C6 skulle derfor tale for tilstedeværelse av levende bakterier.

Konklusjon

Ut fra angitte publikasjoner kan C6 benyttes til å vurdere behandlingsrespons ved lokalisert og tidlig disseminert sykdom. Hos pasienter med lang sykdomsvarighet og ved post-Lyme borreliose synes ikke C6 å kunne bidra til vurdering av terapeutisk suksess.

I tillegg kan C6-benyttes til å avklare spesifisitet ved lave IgG nivåer påvist ved ordinær ELISA-metodikk.

I tillegg bør det avklares om C6 kan være positiv ved negativ tradisjonell ELISA. Hvis dette er tilfelle kan det være riktig å ha C6 tilgjengelig som en "second opinion" test for utvalgte pasienter.

Referanser

1. Liang FT, Alvarez AL, Gu Y, Nowling JM, Ramamoorthy R, Phillip MT. An immunodominant conserved region with the variable domain of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi*. J Immunol 1999;163:5566-73.
2. Steere, AC, McHugh G, Damle n, Sikand VK. Prospective study of serologic tests for Lyme disease. Clin Infect Dis 2008;47:188-95.
3. Wormser GP, Liveris D, Hanicova K, Brisson D, Ludin S, Stracuzzi VJ, Embers ME, Phillip MT, Levin A, Aguero-Rosenfeld, M, Schwartz I. Effect of *Borrelia burgdorferi* genotype on the sensitivity of C6 and two-tier testing in North American patients with culture-confirmed Lyme disease. Clin Infect Dis 2008;47:910-4.
4. Tjernberg I, Krüger g, Eliasson I. C6 peptid ELISA test in the serodiagnosis of Lyme borreliosis in Sweden. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2007;26:37-42.
5. Skapaas T, Ljøstad U, Søybye M, Mygland Å. Sensitivity and specificity of a commercial C6 peptid enzyme immuno assay in diagnosis of acute Lyme neuroborreliosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2007;26:675-7.
6. Peltomaa M, McHugh G, Steere AC. The VlsE (IR₆) peptide ELISA in the serodiagnosis of Lyme facial paralysis. Otolaryngol and Neurol 2004;25:838-41.
7. Mogilyansky E, Loa CC, Adelson ME, Mordechai E, Tilton RC. Comparison of Western immunoblotting and the C6 Lyme antibody test for laboratory detection of Lyme disease. Clin Diagn Lab Immunol 2004;11:924-9.
8. Liang FT, Steere AC, Marques AR, Johnson BJB, Miller JN, Phillip MT. Sensitive and specific serodiagnosis of Lyme disease by enzyme-linked immunosorbent assay with a peptide based on an immunodominant conserved region of *Borrelia burgdorferi* VlsE. J Clin Microbiol 1999;37:3990-6.
9. Phillip MT, Bowers LC, Fawcett PT, Jacobs MB, Liang FT, Marques AR, Mitchell PD, Purdcell JE, Ratterree MS, Straubinger RK. Antibody response to IR₆, a conserved immunodominant region of the VlsE lipoprotein, wanes rapidly after antibiotic treatment of *Borrelia burgdorferi* infections in experimental animals and in humans. J Infect Dis 2001;184:870-8.
10. Phillip MT, Marques AR, Fawcett PT, Dally LG, Martin DS. C₆ test as an indicator of therapy outcome for patients with localized or disseminated Lyme borreliosis. J Clin Microbiol 2003; 41, 4955-60.
11. Marangoni A, Sambir V, Accardo S, Cavrine, F, Mondardini, V, Moroni A, Storni E, Cevenini R. A decrease in the immunoglobulin G antibody response against the VlsE protein of *Borrelia burgdorferi* sensu lato correlates with the resolution of clinical signs in antibiotic-treated patients with early Lyme disease. Clin Vaccine Immunol 2006;13:525-9.
12. Phillip MT, Wormser GP, Marques AR, Bittker S, Martin DS, Nowakowski J, Dally LG. A decline in C₆ antibody titer occurs in successfully treated patients with culture-confirmed early localized or early disseminated Lyme borreliosis. Clin Diagn Lab Immunol 2005;12:1069-74.
13. Peltomaa M, McHugh G, Steere AC. Persistence of the antibody response to the VlsE sixth invariant region (IR₆) peptide of *Borrelia burgdorferi* after successful antibiotic treatment of Lyme disease. J Infect Dis 2003;187:1178-86.
14. Fleming RV, Marques AR, Klempner MS, Schmid CH, Dally LG, Martin DS, Phillip MT. Pre-treatment and post-treatment assessment of the C₆ test in patients with persistent symptoms and a history of Lyme borreliosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23: 615-8.

15. Marques Ar, Martin DS, Phillip MT. Evaluation of the C6 peptid enzyme-linked immunosorbent assay for individuals vaccinated with the recombinant OspA vaccine. *J Clin Microbiol* 2001;40:2591-3.

Borreliablot, erfaringer i rutinediagnostikk.

Sølvi Noraas, Avdeling for medisinsk mikrobiologi, Sørlandet sykehus HF

I rapporten om borreliadiagnostikk utgitt av Helsedirektoratet høsten 2009 tok vi ikke stilling til om blot skulle inngå i rutinediagnostikk i Norge. Det ble sagt at blot burde være tilgjengelig undersøkelse i alle helseregioner alternativt skulle referanselaboratoriet lokalisert til avdeling for medisinsk mikrobiologi i SSHF kunne ta i mot prøver fra utvalgte pasienter.

I andre land med mye borreliose er blot en obligatorisk del av diagnostikken. Her nevnes Tyskland og USA.

Oppslag i pressen om at den norske diagnostikken er for dårlig gjorde at vi i den samme rapporten sa at en ved mistanke om borreliainfeksjon og negativ primærttest så burde det tilbys undersøkelse med en test nr 2. Det ble ikke sagt hva denne test nr to skulle være. En ny ELISA eller et blot.

Vi har i tiden etter dette hatt en relativt liberal holdning til å utføre blot.

Vi har gjort det ut fra to ulike problemstillinger.

- 1) Er antistoffet spesifikt? Positiv primærttest IgG eller IgM eller begge.
- 2) Er testen falsk negativ? Negativ primærttest hos pasienter med langvarig symptomatologi hvor borreliose mistenkes.

Det er punkt 2 som har gitt oss størst utfordring i forhold til å konkludere/ gi råd.

Et aktuelt spørsmål er om vi kan begrense blot til IgG. Men så lenge vi gjør både IgG og IgM i primærttester mener vi det vil være nyttig å utføre blot også for begge parametre.

Det har også vært sagt at det ved bruk av blot kan si noe om hvilken art pasienten er eller har vært infisert med og noe om infeksjonen er fersk eller gammel. Foreløpig har vi ikke nok erfaring verken til å type og eller tidfeste infeksjonen.

Ved gjennomgang av 495 blot(Euroline-RN-AT blot) utført i perioden 1.7.2010 til 25.10.2011 fant vi samsvar mellom primærttest (Siemens Enzygnost Lyme link VlsE/IgG og Siemens Enzygnost Borreliosis IgM) i 290 (57 %) prøver. Bedømmelsen av blot er utført i samsvar med pakningsvedlegg.

Til 1)

277 av prøvene var positive i primærttest, IgG og/ eller IgM. 196 (71 %) av prøvene var positive i både primærttest og blot.

I de resterende 81 (29 %) prøvene var det funn i primærttest, men negativt blot. Av disse var det 58 prøver hvor IgM alene var positiv i primærttest. Ingen prøver med IgG > 600 % av cut off kom ut negative i blot. Blot synes således å være nyttig på prøver med lave IgG-nivåer og IgM alene.

Til 2)

Vi har undersøkt 218 prøver hvor primærttesten var negativ. 168 (77 %) av disse var også negative i blot. I disse tilfellene konkluderer vi med å si at det ikke er serologisk holdepunkt for borreliainfeksjon.

I 50 (23 %) prøver fant vi positivitet i blot. I 28 av disse er det IgM alene som er positiv. Om det er kriteriene for bedømmelse av positivt blot som er for lave, kan diskuteres. Det vi bruker

har kun krav til et positivt bånd for IgM. Også kravet til antall bånd for positiv IgG er lavere enn angitt i litteratur(3).

Dette er noe som krever mer oppmerksomhet.

Referanser

1. Rapport til Helsedirektoratet fra arbeidsgruppe: Diagnostikk og behandling av Lyme borreliose. 2009. www.helsedirektoratet.no
2. The Clinical Assessment, Treatment, and Prevention of Lyme Disease, Human Granulocytic Anaplasmosis and Babesiosis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. Wormser G P, Dattwyler R J, Shapiro E D, et al. Clin Infect Dis 2006; 43: 1089-34. Available free at <http://www.journals.uchicago.edu/doi/pdf/10.1086/508667>
3. Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of lyme borreliosis. Clin Microbiol Rev. 2005 Jul;18(3):484-509. Available free at <http://cmr.asm.org/cgi/reprint/18/3/484>
4. MiQ 12: Quality Standards for the Microbiological Diagnosis of Infectious Diseases. Established on behalf of the German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM). Lyme Borreliosis. B. Wilske, L. Zöller, V. Brade, H. eiffert, U.B. Göbel, G. Stanek in cooperation with H.-W. Pfister

PCR-diagnostikk av borreliose

Andreas Christensen, Avdeling for medisinsk mikrobiologi, St. Olavs Hospital, Trondheim

Da PCR-teknologien fikk gjennomslag på 1990-tallet var det store forventninger til at også borreliadiagnostikken ville gjennomgå en revolusjon. Disse forventningene har så langt ikke blitt innfridd. Borreliabakterien forekommer i lave antall i det intercellulære rom i flere typer vev og beveger seg kun i liten grad inn i kroppsvæsker. PCR benyttet på spinalvæske, serum eller urin har derfor svært lav sensitivitet (<20%) (1-3). Leddvæske er her et unntak der sensitiviteten kan komme opp i ca 80% ved borreliaartritt (4). Sensitiviteten for PCR benyttet på biopsier fra erythema migrans eller acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) er moderat til høy (25-70%) (5, 6). Ettersom den kliniske diagnosen erythema migrans vanligvis er sikker vil PCR-diagnostikk sjeldent være indisert ved denne tilstanden. Den kliniske diagnosen ACA kan være vanskeligere, men slike pasienter har vanligvis svært høye borrelia-IgG-titre og PCR er derfor også her sjeldent indisert.

PCR anbefales derfor ikke som førstelinjemetodikk, men kun som et supplement i spesielle tilfeller:

- Kan benyttes på leddvæske eller synovialbiopsi ved mistanke om borreliaartritt der serologiske resultater er vanskelig tolkbare
- Kan benyttes på spinalvæske ved mistanke om nevroborreliose der serologisk diagnose er usikker
- Kan benyttes på flere typer materiale ved mistanke om borreliose hos immunosupprimerte pasienter
- Kan benyttes på hudbiopsi ved mistanke om atypisk erythema migrans i tidlig fase før serokonversjon

I alle disse situasjonene vil det være viktig å understreke at et negativt resultat har liten diagnostisk verdi.

Referanser

1. Cerar T, Ogrinc K, Cimperman J, Lotric-Furlan S, Strle F, Ruzic-Sabljić E. Validation of cultivation and PCR methods for diagnosis of Lyme neuroborreliosis. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3375-9.
2. Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:484-509.
3. Mygland A, Ljostad U, Fingerle V, Rupprecht T, Schmutzhard E, Steiner I. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *Eur J Neurol.* 2010;17:8-16, e1-4.
4. Nocton JJ, Dressler F, Rutledge BJ, Rys PN, Persing DH, Steere AC. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. *N Engl J Med.* 1994;330:229-34.
5. Picken MM, Picken RN, Han D, Cheng Y, Ruzic-Sabljić E, Cimperman J, et al. A two year prospective study to compare culture and polymerase chain reaction amplification for the detection and diagnosis of Lyme borreliosis. *Mol Pathol.* 1997;50:186-93.
6. Lebech AM, Hansen K, Brandrup F, Clemmensen O, Halkier-Sorensen L. Diagnostic value of PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in clinical specimens from patients with erythema migrans and Lyme neuroborreliosis. *Mol Diagn.* 2000;5:139-50.

Borreliadiagnostikk - Kven gjer kva – og når?

Reidar Hjetland, Mikrobiologisk avdeling, Helse Førde.

Generelle forhold

Dette innlegget legg til grunn ein teststrategi om lag slik det går fram av rapporten frå den norske arbeidsgruppa om Borreliainfeksjonar i 2009 (1), dvs. ei primær screening med ELISA IgG og IgM, evt. supplert med C6-ELISA og evt. blot.

Mellom dei ulike testprinsippa og variantane av desse må ein sikre at

1. Kvert laboratorium som utfører Borrelia-diagnostikk gjer det på ein adekvat måte for dei fleste pasientane.
2. For unntakspasientane må det vere mogleg å vidareseende serum og/eller anna prøvemateriale til andre laboratorium, fortrinnsvis regionlaboratorium og referanselaboratorium.
3. På nasjonal basis bør Noreg ha fullverdig referansefunksjon som inkluderer dei fleste anerkjente diagnostiske modalitetar for å løyse kliniske problemstillingar, i tillegg til forskning på internasjonalt nivå og epidemiologiske oppgåver.

Det er ulik førekomst av infeksjon med *B. burgdorferi* i Noreg. Det er naturleg at område av landet med høg førekomst (Sørlandskysten, Vestlandet) har ein meir utbygd diagnostikk ved dei enkelte laboratoria enn i område med låg førekomst (Nord-Noreg).

Det er rimeleg at laboratorium med spesiell interesse for Borrelia har ein noko meir utbygd diagnostikk.

Pga ulik epidemiologi og ulike eigenskapar ved dei ulike serologiske test-kits er det viktig at det enkelte laboratorium kartlegg førekomsten av positive prøvar i den friske befolkninga (t.d. blodgivarar) i sitt nedslagsfelt, dette som grunnlag for å kunne vurdere prediktiv verdi av testresultata.

Dei ulike laboratoria bør tilstrebe å bruke same nemning på same svar, og med liknande kommentarpraksis.

Retningslinjer for serologisk Borrelia-diagnostikk kan ein til dels finne i den norske rapporten frå 2009 (1), den danske (2), den europeiske (3) og den amerikanske (4). Dette forslaget legg til grunn at ein ikkje utfører C6-ELISA på alle screening-ELISA positive prøvar, men at det for et signifikant tal ELISA-positive prøvar er aktuelt å teste i C6-ELISA og/eller blot.

Val av test-kits innan serologi (både ELISA og blot) og test-algoritmar påverkar i stor grad den endeleg konklusjonen av testane (5).

Når skal ulike supplerande testar nyttast?

Ei nøktern og ressursmessig forsvarleg tilnærming tilseier at supplerande testing i form av C6-ELISA (rel. billig), blot (dyr) ikkje refleksmessig bør gjerast i alle situasjonar med positiv primær-ELISA. Slik tilleggtesting føreset ei reell klinisk problemstilling der resultatet vil kunne ha diagnostiske og/eller terapeutiske konsekvensar. For ein del av våre prøvar manglar det slike opplysningar. Erfaring tilseier også at visse resultat av primær-ELISA ikkje treng ytterlegare testing.

Situasjonar der supplerande testing (C6-ELISA, blot) kan utgå.

- Manglande kliniske opplysningar eller inadekvat indikasjonsstilling (flåttbitt, erytema migrans, ”vil vite status”, kontroll etter behandling, etc.)
- Sterk positiv IgG i primær ELISA. Eigen erfaring frå eit blodgivarmateriale tilseier til dømes at Enzygnost Lyme link VlsE/IgG > 300 % av cut off (tilsv. 50 U/ml) nesten alltid vil vere positiv i C6.
- Typisk klinikk med passande mønster i primær ELISA (t.d. serumprøvar ved nevroborreliose med positiv spesifikk spinalvæske-/serum indeks, positiv IgG og IgM hos eit barn med borrelialymfocytom, og liknande)
- Isolert IgM i primær ELISA hos vaksne, unntatt ved sterk klinisk mistanke (her vil blot venteleg gi meir enn C6).

Nevroborreliose

For val av metode (kit) til påvising av spesifikke Borrelia-antistoff i spinalvæske synast til annan litteratur. Uansett bør ein i tvilstilfelle kunne sende spinalvæske-/serum til analyse ved alternativ metodikk ved regionlaboratorium eller referanselaboratorium. Laboratorium i ikkje-endemiske område kan velje å ikkje ha denne diagnostikken, men sende til andre laboratorium i landet.

Kven skal ein vidaresende prøvar til?

Som hovudregel bør det praktiserast to alternativ; eige regionlaboratorium og det nasjonale referanselaboratoriet. Dersom enkeltlaboratorium innfører ein systematisk praksis med heller å sende prøvar til andre lab. enn desse, er det uheldig. Det bør i så fall vere etter konferanse med nemnde lab. I spesielle enkelttilfelle må ein likevel kunne sende dit det vurderast formålstenleg.

Forslag til matrise

Metode	avdeling	Når	Kvifor
ELISA m/VlsE	Alle	Alltid	God sensitivitet
C6-ELISA	Alle	Svak pos ELISA IgG og klinisk suspekt. Unntaksvis som ELISA nr 2 ved suspekt klinikk og neg primær-ELISA.	Aukar spesifisitet
Blot	Region	Pos ELISA og neg C6 for utvalde. Heilt unntaksvis for ELISA negative. Isolert positiv ELISA IgM kombinert med sterk klinisk mistanke.	Etter konf. med klinikar?
PCR	Nasjonalt, evt. region	Leddvæsker, evt. biopsiar	Dette kan raskt endre seg.
Dyrking, evt med res.best., stamme-karakterisering mv.	Nasjonalt	Forskning	
Andre	Nasjonalt	Forskning	
CSF/serum	Alle i endemisk område		Ekskl Bodø/Tromsø?

Referansar:

1. Harbo, SO et al. Diagnostikk og behandling av Lyme borreliose. Rapport til Helsedirektoratet fra arbeidsgruppen. November 2009.
http://www.helsedirektoratet.no/vp/multimedia/archive/00269/Rapporten__Diagnost_269839a.pdf (23.08.2011)
2. Dessau RB, Bangsborg JM, Ejlersen T, Hansen K, Lebech A-M, Østergaard C. Lyme Borreliose - Klinik, diagnostik og behandling.
http://www.ugeskriftet.dk/portal/page/portal/LAEGERDK/UGESKRIFT_FOR_LAEGER/KLINISKE_VAERKTOEJER/KLARINGSRAPPORTER/Lyme%20Borreliose_0.pdf (05.09.2011)
3. Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, Birtles RJ, Bjoersdorff A, Blanco JR, et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. Clin Microbiol Infect. 2004;10:1108-32.
4. Lyme disease diagnosis. Centers for Disease Control, CDC.
www.cdc.gov/ncidod/dvbid/lyme/ld_humandisease_diagnosis.htm (14.09.2010).
5. Ang C, Notermans D, Hommes M, Simoons-Smit A, Herremans T. 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.

STING-studien

Fästingspridda sjukdomar - detektion, kvantifiering och typning för epidemiologiska studier av *Borrelia* med molekylärbiologisk och serologisk metodik

Per-Eric Lindgren, Avdelningen för Medicinsk Mikrobiologi, Linköpings Universitet, Sverige

Inledning

Fästingar är ofta bärare av bakterier och virus, vilka kan överföras till människor. Flera av mikroorganismerna, [*Borrelia* spp, *A. phagocytophilum*, *R. helvetica*] samt "tick-borne encephalitis" (TBE)-virus, är kända att orsaka sjukdom hos människan. Risken att bli smittad av dessa infektiösa agens genom enstaka fästingbett är inte känd, men uppskattningar har gjorts baserade på förekomsten av infekterade fästingar som samlats in.

Mål

Inom detta projekt har vi med nyutvecklad realtids-PCR för detektion och kvantifiering av *Borrelia sp* skapat bättre och mer slagkraftiga verktyg för studier av fästingburna borreliasjukdomar. Genom denna studie hoppas vi få ökade kunskaper om såväl risken att bli sjuk efter ett bitt av en borreliainfekterad fästing samt varför vissa personer blir sjukare än andra.

1. Hur stor är risken att bli sjuk efter bitt av en fästing infekterad med *Borrelia*?
2. Hur stor del av fästingar som biter personer i vår region är infekterade med *Borrelia*? Finns geografiska skillnader?
3. Är vissa kloner mer virulenta? Finns koppling mellan olika borreliakloner och risk för att smittas/kliniskt förlopp?
4. Förekommer och i så fall hur vanligt är dubbelinfektioner av olika fästingburna infektiösa agens?
5. Vid dubbelinfektioner - hur påverkas sjukdomsförloppet?

Metodik

Information om studien sprids genom lokalpress (annonser, artiklar), anslag på vårdcentraler (VC), bibliotek mm. Personer som är intresserade av att delta i studien ombedes att, om de blir fästingbitna ta bort fästingen och lämna in den till sin VC eller till infektionskliniken vid US i Linköping. I samband med detta tas ett rör blod för antikroppsanalys och ett frågeformulär fylls i. Ett andra besök görs hos forskningssköterska ca 12 veckor efter fästingbittet. Vid detta tillfälle tas två rör blod och ett nytt frågeformulär fylls i. Samtidigt lämnar personen ett rör med eventuella fästingar som bitit under tremånadersperioden. Personen uppmanas redan vid första besöket att snarast kontakta infektionskliniken om symptom uppkommer före den planerade tidpunkten för det andra besöket.

Från det insamlade provmaterialet extraheras RNA, som omvandlas till komplementärt DNA (cDNA). För detektion och kvantitativ bestämning av olika typer av *Borrelia* analyseras DNA:t med realtids-PCR. Grupp-specifika primerpar för *Borrelia*, riktade mot *ospA*-genen respektive 16S rRNA-genen (rDNA), används. För typning och epidemiologisk spårning av olika borreliakloner amplifieras cDNA:t med konventionell PCR, följt av elektroforetisk analys av PCR-produkterna. Härigenom fås information om vissa kloner av mikroorganismer ifråga oftare infekterar personer än andra och huruvida flera multiklonala infektioner

förekommer. Parallellt med de molekylärbiologiska analyserna utförs bestämningar av antikroppstitrar och inflammationsmarkörer.

Preliminära resultat

Antalet medverkande regioner och antalet vårdcentraler som, ingår i studien har vuxit och nu medverkar över 50 vårdcentraler fördelade på 8 regioner i Sverige samt på Åland. Under 2007 inkom ca 400 fästingar varav 19% var infekterade med *Borrelia*. Fördelningen av de olika borreliatyperna hos de infekterade fästingarna är 52 % *B. afzelii*, 19% *B. garinii*, 11% *B. valaisiana*, 1% *B. lusitaniae* och 1% *B. burgdorferi sensu stricto*. Resterande Borreliainfekterade fästingar håller nu på att typas. Under 2008 insamlades ca 1300 fästingar och hittills 2009 ca 1100 st. Analyser av dessa pågår nu och är snart färdigställda.

En "robotiserad" metodik för RNA-extraktion och cDNA-syntes har satts upp, vilket gör processningen av fästingarna snabbare och säkrare. Vi har nu mycket goda verktyg som används vid analyserna av det insamlade fästingmaterialet.

Prover från 1536 fästingbitna personer har hittills analyserats för förekomst av anti-Borrelia specifika antikroppar (ak). 425 av de 1536 (28%) personerna blev bitna av Borreliainfekterad fästing. 23/425 (5.4%) personerna utvecklade nya ak under studietiden, dvs Borrelia fördes över från de infekterade fästingarna och gav upphov till en Borreliainfektion. Även 27 av 1111 personer som blev bitna av fästingar som inte innehöll Borrelia utvecklade nya antikroppar under tremånadersperioden. Frekvensen kliniska diagnoser/sjukdom är under pågående analys.

Referenser

1. Wilhelmsson, P., Fryland, L., Börjesson, S., Nordgren, J., Ernerudh, J., Bergström, S., Forsberg, P., & Lindgren, P.-E. 2010. Prevalence and diversity of *Borrelia spp.* in ticks that have bitten humans in Sweden. *J Clin Microbiol* 48:4169-76
2. L. Fryland, Wilhelmsson, P., Ernerudh, J., Lindgren, P.-E., Forsberg, P., & Ekerfelt, C. 2011. Low risk of developing *Borrelia burgdorferi* infection even after a bite by a *Borrelia burgdorferi*-infected tick in the South East of Sweden. *Int J Infect Dis* 15:174-181

Diagnostikk av nevroborreliose.

Einar Nilsen, Avdeling for mikrobiologi og smittevern, Universitetssykehuset i Nord-Norge.

Inndeling av nevroborreliose.

Man bør definere hvilken tilstand man mistenker før man gjør laboratoriediagnostikk. Inndeling mellom akutt og kronisk nevroborreliose skaper ofte forvirring. Begrepene perifer og sentral nevroborreliose er mer presise og sier noe om hva man kan forvente av symptomer og hva man kan forvente av laboratoriefunn.

Perifer nevroborreliose:

Akutt/subakutt debut av en eller flere av følgende: Lammelser (hjernenerver og/eller spinalnerver), radikulerende smerter, hodepine, parestesier (1). Ofte forutgående eller ledsagende allmennsymptomer. Det antas at sykdommen kan forløpe asymptomatisk, eller med så sparsomme symptomer at sykdommen ikke blir diagnostisert i akuttfasen. Små barn kan ha utelukkende diffuse symptomer i form av nyoppstått slapphet, tretthet, uvelhet, men oftest har barn det typiske bilde man ser hos voksne.

Perifer nevroborreliose ser ut til å være en selvlimiterende sykdom, men ubehandlet får rundt halvparten sequeler av forskjellig alvorlighetsgrad. Tidlig behandling minsker risikoen for sequele (2;3).

Sentralnervøs nevroborreliose:

Borrelia-encefalitt og -myelitt er sjeldne tilstander. Det er bare publisert enkeltkasus. Myelitt ser ut til å være relativt vanligere enn encefalitt. Det kliniske bildet er mangeartet for begge tilstandene. Mistanken bør forbeholdes tilfeller med objektive nevrologiske/kognitive utfall. Publiserte kasus har ofte funn ved MR (4-9). Det finnes ingen holdepunkter for at borrelia encefalitt/myelitt kan arte seg som subjektive symptomer i form av kronisk utmattelse eller ME-lignende tilstander. Men gjennomgått perifer nevroborreliose ser ut til å kunne gi sequele hos voksne i form av et slikt bilde (3).

Laboratoriediagnostikk:

Perifer nevroborreliose:

Diagnosen perifer nevroborreliose kan stilles sikkert ved passende klinikk, mononukleær pleocytose i spinalvæske og minimum ett av følgende kriterier:

1. Klassisk mønster for totalantistoff i serum og spinalvæske vurdert ved reibergrammer.
2. Antistoffindeks over 1,5 for IgG og IgM.
3. (Positiv CXCL13 i spinalvæske)

Ved bruk av tester med VSI\C6 antigen er det ikke uvanlig at IgG i spinalvæske er positiv før IgM, men positiv IgG AI uten andre funn i spinalvæsken kan ikke tolkes som perifer nevroborreliose i akuttfase.

Anamnesticke opplysninger om ubehandlet erythema migrans innenfor siste 6 måneder styrker mistanken, men fravær skal ikke svekke mistanken. Utelukkende meningittiske symptomer gir samme funn i spinalvæske som ved Banwartsyndrom (10).

Vurdering av de enkelte parametere:

1. Spinalvæske:

Økt antall mononukleære celler, lett økt protein og normal glukose. Celletall kan være lavt i tidlig fase, men kan være forhøyet før man finner spesifikke intratekale antistoff. Diagnosen nevroborreliose skal som hovedregel ikke stilles uten pleocytose i spinalvæske. Man bør gjøre ny spinalpunksjon dersom man mistenker at første prøvetakning er gjort før det har tilkommet pleocytose.

2. Totalantistoff: ”Reiber-prinsipper” - Barrierefunksjon, intratekal fraksjon.

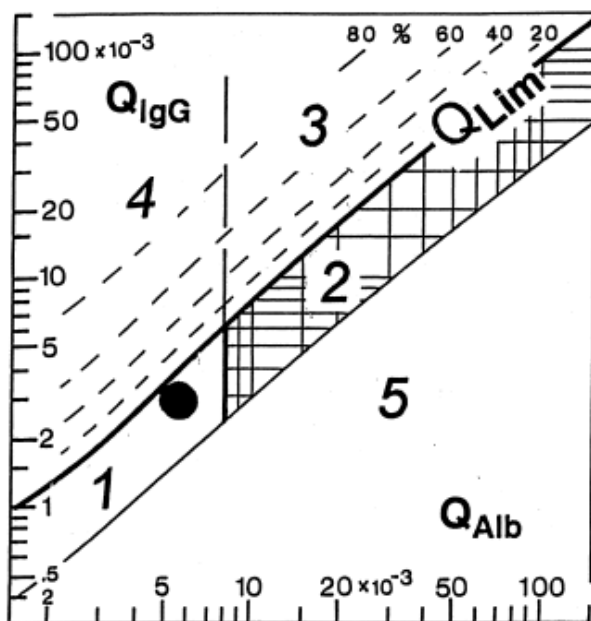
”Reiber-prinsippene” baserer seg på forholdstall (kvotienter) for albumin og antistoff mellom spinalvæske og serum (ex. $Q_{alb} = ALB_{csf} / ALB_{serum}$). Ut fra disse kan man avlede intratekal fraksjon og barrierefunksjon.

Albumin produseres ikke intratekalt og økt intratekal albumin må derfor skyldes en barrieredysfunksjon. Albumin-kvotienten beskriver på denne måten blod-hjernebarrierens funksjon. Antistoffer kan både diffundere over blod-hjernebarrieren og bli produsert intratekalt. *Intratekal fraksjon* er et mål på hvor mye av målt total-antistoff i spinalvæske som har intratekalt opphav.

Barrieredysfunksjon er i realiteten en endring av spinalvæskestrømmen, og ikke en morfologisk skade på blod-hjernebarrieren. Endring av spinalvæskestrømmen gir endrede diffusjonsforhold mellom serum og spinalvæske, og derav endret intratekale proteinnivåer.

Ved å sette inn målte albumin- og antistoffkvotienter i normalkurver (reibergrammer) får man grafisk fremstilt barrierefunksjon og om det foreligger en økt intratekal produksjon av antistoffer. Det finnes tilstandsspesifikke mønster for disse reibergrammene. Det typiske mønsteret for perifer nevroborreliose er en uttalt barrieredysfunksjon og en økt intratekal produksjon av antistoffer. IgM har den forholdsvis største økningen, fulgt av IgA og IgG. Ved diagnosetidspunkt for perifer nevroborreliose er sensitivitet og spesifisitet for dette mønsteret henholdsvis 70 % og 96 %. Sensitiviteten øker de første dagene og ukene i akutfasen og synker så etter hvert som sykdommen går over og antistoffproduksjonen avtar og spinalvæskestrømmen normaliseres (11).

3. Spesifikke antistoffer og antistoffindeks (AI).



Reiber diagram (11).

- 1: Normal område. Intakt blod-hjernebarriere. Ingen økt intratekal antistoffproduksjon.
- 2: Dysfunksjon i blod-hjernebarrieren. Ingen økt intratekal antistoffproduksjon.
- 3: Dysfunksjon i blod hjernebarrieren, økt intratekal antistoffproduksjon.
- 4: Normal blod-hjernebarriere, økt intratekla antistoffproduksjon.
- 5: Feil ved prøvetakning eller ved analysen.

Tid fra symptomdebut er viktigste faktor med tanke på sensitiviteten for antistoffundersøkelsene. Mange av studiene som har undersøkt sensitivitet av diagnostikken har ikke inndelt pasientene godt nok etter "tid fra symptomdebut", og den samlede sensitiviteten er derfor lite brukbar når man vurderer de enkelte kasesene. Det er enighet om at negativ serologi/spinalvæskeundersøkelse ved symptomer over 6-8 uker utelukker nevroborreliose.

Antistoffindeks (AI) avklarer om borrelia-spesifikt antistoff i spinalvæsken er produsert intratekalt eller om det har diffundert over blod-hjernebarrieren fra blodet. Intratekal produksjon av spesifikke antistoff har tradisjonelt blitt ansett nødvendig for å stille diagnosen "sikker nevroborreliose"(1). Flere mindre studier antyder at passende klinikk og funn av spesifikke antistoff bare i serum kan indikere perifer nevroborreliose (12-14). Stor forskjell mellom de ulike serologiske testene brukt i studiene vanskeliggjør en metaanalyse. Det som taler mot vektlegging av spesifikke antistoff bare i serum, er høy forekomst av antistoffer blant normalbefolkningen, og fallende spesifisitet for antistofftestene når det foreligger andre inflammasjonstilstander. Flere studier bekrefter at nyere ELISA-tester med VlsE/C6-antigen øker sensitiviteten i tidlig fase også ved bruk i spinalvæske, og gjør at færre pasienter med meningo-radikulopati havner i gruppen med antistoff bare i serum (13;15-17).

(Antistoffindex kan beregnes på flere måter, metoden som beskrives her er i ferd med å bli mest utbredt. En tidligere studie har sammenlignet to metoder uten å finne forskjell i resultat (18).)

Antistoffindex er ratio mellom spinalvæske-serum-kvotienten for spesifikt antistoff og spinalvæske-serum-kvotienten for totalantistoff:

$$(Ab-Bor_{spinal}/Ab-Bor_{serum}) / (Ab-total_{spinal} / Ab-total_{serum}) = \underline{AI} = Q_{bor}/Q_{total}$$

Lik sammensetning av antistoff i serum og spinalvæske taler for at målt spesifikt antistoff i spinalvæske har diffundert fra blodet. Teoretisk vil indeksen bli 1,0 i slike tilfeller. Noe måleusikkerhet gjør at AI-grenseverdi for intratekal produksjon av spesifikt antistoff er satt til 1,5 (11). Verdier under 2 bør vurderes nøkternt.

Positiv AI alene bør tolkes med forsiktighet. AI kan forbli positiv i flere år etter gjennomgått symptomatisk eller asymptomatisk perifer nevroborreliose, og kan derfor være tilfeldig positiv ved annen nyoppstått sykdom. Dette gjelder særlig dersom AI er positiv bare for IgG, og det er normale reibergrammer samt fravær av pleocytose i spinalvæsken. (Fravær av CXCL 13 bør også vekke mistanke om at det dreier seg om gjennomgått perifer nevroborreliose og ikke aktuell sykdom).

Sentral nevroborreliose - encefalitt/myelitt:

Det er ikke publisert materialer store nok til å kunne sammenfatte hva som er typiske laboratoriefunn for Borrelia-encefalitt og myelitt. Diagnosene må derfor stilles på skjønnsmessig grunnlag i samarbeid mellom kliniker, mikrobiolog og radiolog. Mistanken bør forbeholdes tilfeller hvor det foreligger objektive nevrologiske og/eller kognitive symptomer som tilsier sentralnervøs patologi (4-9). Positiv antistoffindeks uten andre laboratoriefunn hos pasienter med ME-lignende tilstander bør tolkes i retning gjennomgått perifer nevroborreliose og ikke som "kronisk-nevroborreliose". (CXCL13 i spinalvæske vil sannsynligvis kunne være til hjelp for å avklare slike tilfeller)

Fremtidig diagnostikk:

CXCL 13.

CXCL 13 er en B-celle kjemoattraktant som i CNS produseres av dendrittiske celler etter stimulering av TLR-2 (19;20). Flere studier bekrefter at CXCL 13 i spinalvæske er en sensitiv markør for perifer nevroborreliose. Dette også tidlig i sykdomsforløpet hvor spesifikke antistoffer ikke kan måles i spinalvæsken. Spesifisiteten ser ut til å være generelt god, men avhenger av hvor man legger cut-off. Det finnes så langt ingen standardisert cut-off, og det finnes heller ingen kommersielt tilgjengelige tester som av produsenten er godkjent for diagnostisk bruk i spinalvæske.

Interessant er det at CXCL13 i spinalvæske synker raskt ved behandling, og er en mulig markør for sykdomsaktivitet. Man må ha dette i bakhodet dersom man starter behandling på mistanke før det blir gjort spinalpunksjon.

Alt i alt ser testen ut til å kunne være nyttig, og når det kommer tester i salg som er godkjent for diagnostisk bruk vil det være naturlig at den tas i bruk i de laboratorier som gjør diagnostikk av nevroborreliose (21-24).

Massespektrometri:

Det er publisert en artikkel hvor man har gode resultater ved å bruke massespektrometri til å skille pasienter med sequeler etter nevroborreliose fra pasienter med kronisk utmattelses-syndrom. Studien omfatter et lite antall pasienter, men dersom dette viser seg reproduserbart vil det kunne være til nytte for en sårbar pasientgruppe (25).

Hvem skal drive med diagnostikk?

Diagnostikk av nevroborreliose bør gjøres ved laboratorier i høyendemiske områder.

Diagnostikken baserer seg på en samlet vurdering av klinikk og flere laboratorieparametere.

Vurderingene kan til dels være krevende, og svar skal ikke gis ut før klinikk og laboratoriefunn

er vurdert av lege med erfaring innenfor borreliadiagnostikk. Et oppdatert diagnostisk tilbud krever at man kontinuerlig følger med på forskning og utvikling i fagfeltet.

Referanser

1. Mygland Å, Ljøstad U, Fingerle V, Rupprecht T, Schmutzhard E, Steiner I. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *European J Neurology* 2010;17:8-e4.
2. Kruger H, Reuss K, Pulz M, Rohrbach E, Pflughaupt KW, Martin R, et al. Meningoradiculitis and encephalomyelitis due to *Borrelia burgdorferi*: a follow-up study of 72 patients over 27 years *J Neurol* 1989;236:322-8.
3. Ljøstad U, Mygland Å. Remaining complaints 1-year after treatment for acute Lyme neuroborreliosis; frequency, pattern and risk factors. *European J Neurol* 2010;17:118-23.
4. Aboul-Enein F, Kristoferitsch W. Normal pressure hydrocephalus or neuroborreliosis? *WMW Wiener Medizinische Wochenschrift* 2009;159:58-61.
5. Bigi S, Aebi C, Nauer C, Bigler S, Steinlin M. Acute transverse myelitis in Lyme neuroborreliosis. *Infection* 2010;38:413-6.
6. Blanc F, Froelich S, Vuillemet F, Carre S, Baldauf E, de Martino S, et al. [Acute myelitis and Lyme disease] *Rev Neurol (Paris)* 2007;163:1039-47.
7. Drouet A, Meyer X, Guilloton L, Mullet JP, Dusseau JY, Denoyel GA, et al. [Acute severe leukoencephalitis with posterior lesions due to *Borrelia burgdorferi* infection] *Presse Med* 2003;32:1607-9.
8. Kawano Y, Shigeto H, Shiraishi Y, Ohyagi Y, Kira J. [Case of *Borrelia* brainstem encephalitis presenting with severe dysphagia] *Rinsho Shinkeigaku* 2010;50:265-7.
9. Koc F, Bozdemir H, Pekoz T, Aksu HS, Ozcan S, Kurdak H. Lyme disease presenting as subacute transverse myelitis. *Acta Neurol Belg* 2009;109:326-9.
10. Djukic M, Schmidt-Samoa C, Lange P, Spreer A, Neubieser K, Eiffert H, et al. Cerebrospinal fluid findings in adults with acute Lyme neuroborreliosis. *J Neurol* 2012;259:630-6.
11. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurological Sciences* 2001;184:101-22.
12. Cerar T, Ogrinc K, Strle F, Ruzic-Sabljić E. Humoral Immune Responses in Patients with Lyme Neuroborreliosis. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:645-50.
13. Tjernberg I, Henningsson AJ, Eliasson I, Forsberg P, Ernerudh J. Diagnostic performance of cerebrospinal fluid chemokine CXCL13 and antibodies to the C6-peptide in Lyme neuroborreliosis. *J Infection* 2011 ;62:149-58.
14. Øymar K, Tveitnes D. Clinical characteristics of childhood Lyme neuroborreliosis in an endemic area of northern Europe. *Scand J Infect Dis* 2009;41:88-94.
15. van Burgel ND, Brandenburg A, Gerritsen HJ, Kroes ACM, van Dam AP. High sensitivity and specificity of the C6-peptide ELISA on cerebrospinal fluid in Lyme neuroborreliosis patients. *Clin Microbiol and Infect* 2011;17:1495-500.
16. Skarpaas T, Ljøstad U, Søybye M, Mygland Å. Sensitivity and specificity of a commercial C6 peptide enzyme immuno assay in diagnosis of acute Lyme neuroborreliosis. *European J Clinical Microbiol Infect Dis* 2007;26:675-7.
17. Skogman BH, Croner S, Forsberg P, Ernerudh J, Lahdenne P, Sillanpaa H, et al. Improved laboratory diagnostics of Lyme neuroborreliosis in children by detection of antibodies to new antigens in cerebrospinal fluid. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27:605-12.

18. Kaiser R, Lücking CH. Intrathecal synthesis of specific antibodies in neuroborreliosis comparison of different ELISA techniques and calculation methods. *J Neurological Sciences* 1993;118:64-72.
19. Rupprecht TA, Kirschning CJ, Popp B, Kastenbauer S, Fingerle V, Pfister HW, et al. *Borrelia garinii* Induces CXCL13 Production in Human Monocytes through Toll-Like Receptor 2. *Infect Immun* 2007;75:4351-6.
20. Narayan K, Dail D, Li L, Cadavid D, Amrute S, Fitzgerald-Bocarsly P, et al. The nervous system as ectopic germinal center: CXCL13 and IgG in lyme neuroborreliosis. *Ann Neurol* 2005;57:813-23.
21. Ljøstad U, Mygland Å. CSF B-lymphocyte chemoattractant (CXCL13) in the early diagnosis of acute Lyme neuroborreliosis. *Journal of Neurology* 2008;255:732-7.
22. Schmidt C, Plate A, Angele B, Pfister HW, Wick M, Koedel U, et al. A prospective study on the role of CXCL13 in Lyme neuroborreliosis. *Neurology* 2011;76:1051-8.
23. Senel M, Rupprecht TA, Tumani H, Pfister HW, Ludolph AC, Brettschneider J. The chemokine CXCL13 in acute neuroborreliosis. *J Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 2010;81:929-33.
24. Wutte N, Berghold A, Löffler S, Zenz W, Daghofer E, Krainberger I, et al. CXCL13 chemokine in pediatric and adult neuroborreliosis. *Acta Neurol Scand* 2011;124:321-8.
25. Schutzer SE, Angel TE, Liu T, Schepmoes AA, Clauss TR, Adkins JN, et al. Distinct cerebrospinal fluid proteomes differentiate post-treatment lyme disease from chronic fatigue syndrome. *PLoS One* 2011;6:e17287.

Kontroversielle tester og tester med foreløpig ikke tilstrekkelig dokumentasjonsgrunnlag

Andreas Emmert, Mikrobiologisk avdeling, Sykehuset i Vestfold, Tønsberg

Lymfocytt transformasjonstester

I 90 tallene forsøkte ulike grupper seg på en forbedring av LB diagnostikken ved å undersøke den spesifikke cellulære immunresponsen på *B. burgdorferi* ved bruk av ulike lymfocytt transformasjonstester (LTT) (1-11).

Oversikt over studier ved bruk av LTT på 1990 tallet

Publikasjon	Antall prøver	Antall antigener	Type antigen
Dattwyler et al 1988 (1)	35	1	Hel <i>B. burgdorferi</i>
Dressler et al 1991 (2)	178	3	Hel/sonikert <i>B. burgdorferi</i>
Krause et al 1991 (3)	74	1	Hel <i>B. burgdorferi</i>
Yoshinari et al 1991 (4)	24	6	Polypeptid fraksjoner
Zoschke et al 1991 (5)	26	1	Hel <i>B. burgdorferi</i>
Krause et al 1992 (6)	61	3	Hel <i>B. burgdorferi</i> og 2 rekombinante antigener
Schempp et al 1993 (7)	12	2	Hel/sonikert <i>B. burgdorferi</i>
Roessner et al 1994 (8)	12	4	Hel/sonikert <i>B. burgdorferi</i> og 3 rekombinante antigener
Breier et al 1995 (9)	44	1	Hel <i>B. burgdorferi</i>
Huppertz et al 1996 (10)	103	2	Hel <i>B. burgdorferi</i>
Rutkowski et al 1997 (11)	16	1	Hel <i>B. burgdorferi</i>

Grunnet lav sensitivitet, spesifisitet og reproduserbarhet ble det imidlertid frarådd å bruke disse tester (12).

Mulig årsak for disse dårlige resultater er 1) ikke validerte og ikke standardiserte LTT protokoller med lave lymfocytt konsentrasjoner (<250 000 celler/ test) og 2) dårlig definerte lysater med heterogen antigensammensetning av lysater fra *B. burgdorferi*.

Valentine-Thon et al (13) publiserte i 2006 et standardisert LTT- MELISA protokoll (memory lymphocyte immunostimulation assay (MELISA)) ved bruk av høyere celle konsentrasjoner (1×10^6 celler per test) og bruk av definerte rekombinante *Borrelia* spesifikke antigener. Den tekniske validiteten og klinisk relevans av MELISA protokollet har ifølge Valentine-Thon blitt omfattende dokumentert (13). Metoden har imidlertid blitt senere kritisert (blant annet av en medforfatter av originalartikkelen) for å ha lav spesifisitet (18).

Valentine-Thon et al testet 244 pasienter mistenkt for å ha Lyme Borreliose. 90 (36,9%) av de 244 pasienter hadde positiv MELISA resultat.

56 av 65 (86,2%) pasienter som også hadde serologiske resultater hadde positive resultater i serologien (ELISA eller Western Blot). 9 LTT- MELISA positive pasienter var seronegativ. 7 av disse viste symptomer av Lyme Borreliose, 1 var asymptomatisk men hadde fått flåttbitt 12 dager før analysen ble gjennomført, ble behandlet med antibiotika og ble LTT MELISA negativ under oppfølgingen. For 1 pasient forelå det ingen kliniske data.

Blant de 154 (63,1 %) MELISA negative pasienter var 70,7% seropositiv (65/92 som hadde serologiske resultater). 58,6 % av disse var ved undersøkelse asymptomatisk; dvs. disse hadde spontant eller behandlingsrelatert tilbakegang av symptomene. 41,4% av pasientene hadde ukarakteristiske symptomer (hodepine, trøtthet, ledd- og muskelplager, eksem, facialis parese, burnout syndrom).

Blant de 30 friske helsearbeidere var kun 1 kontrollperson positiv, tilsvarende en spesifisitet på 96,7%.

I oppfølgingsprøver blant 32 LTT positive pasienter som fikk antibiotisk behandling ble 25 negativ i MELISA testen. Noen pasienter ble negativ under terapi, andre opp til 1 år etter avsluttet behandling, de fleste innen 4-8 uker. De resterende 7 pasienter hadde signifikant fall i LTT testen, men var fortsatt positiv.

17 av 22 pasienter med LTT MELISA inkonklusive testresultater og klinisk mistanke om akutt LB ble negativ etter terapi, 5 hadde uforandrede resultater.

En annen T-celle basert test er Borrelia Elispot LTT test.

Litteratur som omhandler Borrelia Elispot LTT testen gir foreløpig ikke tilstrekkelig dokumentasjon mht testens sensitivitet eller spesifisitet og dermed anvendelighet av denne testen i rutinediagnostikken (14,15,16).

Om og i hvilken grad LTT analyser kan bli brukt som supplement til nåværende diagnostiske tester må framtidig forskning vise. Undertegnede mener imidlertid i tråd med det nasjonale og internasjonale fagmiljøet for øvrig at den per dags dato foreliggende dokumentasjonen er for spinkelt til at bruken av disse tester kunne blitt anbefalt i rutinediagnostikken (12,18,21).

CD57+/CD3- lymfocytt telling

Metoden er publisert av RB Stricker og EE Winger i 2001 (17). Ved hjelp av flerfarget flowcytometri og antistoffer mot overflatemarkører viser de at pasienter med kronisk LB har redusert antall CD3-CD57+ NK celler. De hevder at analysen kan være viktig for å påvise kronisk LB og at den kan benyttes for å følge behandlingen av sykdommen ved at verdiene normaliseres ved vellykket behandling. Gruppen har senere publisert to artikkeler av enkelt – kasus hvor de også hevder at analysene av CD57 lymfocytt-subset viser tilsvarende funn (18).

Søk på medline har ikke gitt treff på studier fra andre grupper som støtter disse funn.

Imidlertid har en annen gruppe publisert data som setter spørsmålstegn ved funnene til Stricker et al. (19,20).

Også her er dokumentasjonen foreløpig for sparsomt og usikkert til at denne testen kan bli anbefalt til bruk i rutinediagnostikken.

Vurderinger

Det har ikke blitt publisert data som indikerer at holdningen til ovenfor omtalte tester burde revurderes siden utgivelse av rapporten til helsedirektoratet i november 2009. Man slutter seg derfor til vurderingen som ble gitt i denne rapporten (18) med følgende ordlyd:

”T-celle proliferasjonstesten utføres på opprensede lymfocytter isolert fra pasientenes fullblod. Prosedyren er arbeidskrevende, kostbare og ressurskrevende med hensyn til utstyr og personell. Det er ikke konsensus om hvilke antigener som bør benyttes i testen, og metoden er

vanskelig å standardisere. Påvisning av T-celle responser som diagnostisk metode er lite utbredt mot andre mikrober; vi kjenner kun til Quantiferon testen for påvisning av Tuberkulose.

Begge de to angitte analysene utføres på friske lymfocytter fra pasientens fullblod. Blodet må være ved analyselaboratoriet innen 24 timer etter prøvetaking
Ingen norske laboratorier utfører disse analysene, men noen videreformidler pasientprøver til blant annet tyske (kommersielle) laboratorier (pris ca. 1500-2000 NOK per T celle proliferasjonstest). Tyske, franske, britiske, kanadiske, nederlandske og amerikanske mikrobiologiske organisasjonene anbefaler ikke disse testene for diagnostikk av Lyme Borreliose (12,18,21,32).

CXCL13

CXCL13 tilhører CXC kjemokin familien og er en selektiv kjemoattraktant for B- og B hjelper T- lymfocytter via kjemokin reseptoren CXCR5. Analysering av CXCL13 i CSF skjer med hjelp av en ELISA.

Ifølge europeiske retningslinjer fra 2010 frarådes bruk av CXCL13 som verktøy i rutinediagnostikken (21), under henvisning på følgende dokumentasjon: (22-25).

Imidlertid er det publisert en rekke artikler i mellomtiden (26-30)

CXCL13 kan mest sannsynligvis ikke brukes som markør for sykdomsaktivitet ved Lyme Borreliose. (27)

Studier så langt viser en sensitivitet av CXCL13 i CSF for akutt Neuroborreliose i tidlig fase, på mellom 96-100% (28).

Tumani og Cadavid (29) konkluderer med at resultatene fra studiene så langt indikerer at økt CXCL13 kan hjelpe med å diagnostisere a) klinisk atypiske tilfeller av Lyme NB b) tidlige stadier av Lyme NB når intrathekal Borrelia spesifikke antistoffer er fortsatt negative og c) for å skille aktiv fra tidligere gjennomgått infeksjon. En del spørsmål er imidlertid fortsatt ikke avklart: 1. Hvordan er CXCL13 influert av ulike B. burgdorferi genospecies? 2. Hva skjer med CXCL13 hos pasienter med kronisk Lyme neuroborreliose? 3. Er CXCL13 forhøyet også hos pasienter med Lyme Borreliose uten CNS affeksjon?

Det trengs også flere studier for å evaluere betydningen av CSF CXCL13 nivået mht om parameteret kan brukes til vurdering av optimal behandlingstidspunkt.

Schmidt et al (30) fant i sin pro-/ retrospektiv kontrollstudie en sensitivitet på 94,1% og en spesifisitet på 96,1% ved en cut off på 1229 pg/ml for CSF CXCL13 for 17 ubehandlede pasienter med Lyme Borreliose. Ved en cut off på 697pg/ml oppnådde man en sensitivitet på 100% og en spesifisitet på 93,3%. Pasienter behandlet for LNB hadde avhengig av behandlingstidspunkt ingen CXCL13 økning i CSF. CXCL13 kan derfor kun brukes i diagnostikken av ubehandlede pasienter med en aktuell LNB. Sensitiviteten for AI i denne studien var 85,7%. Tidligere studier fant en sensitivitet for AI på mellom 79 og 94%. (Obs: Kan ikke se hvilken AI som ble brukt i denne studien). Sensitiviteten av CXCL13 hos ubehandlede pasienter med LNB ser ut til å være høyere sammenlignet med AI (94% vs. 86%).

Spesifisiteten for AI og CXCL13 i CSF var lik i begge grupper (96,1%). Også andre studier viser at noen maligne sykdommer som CNS lymfomer, AML, etc. kan ha forhøyete CXCL13 verdier i CSF. Siden denne pasientgruppen er overrepresentert i omtalte studien antas spesifisiteten av CXCL13 å være enda høyere.

Ifølge Burgel et al (31) er sensitiviteten for CXCL13 for LNB ellers i litteraturen angitt mellom 96-100% og spesifisiteten mellom 63-98%.

Burgel foreslår en cut off på 250 pg/ml som resulterer i 88% sensitivitet og 89% spesifisitet.

Siden dette er en retrospektiv studie ble en del av prøvene lagret i flere år, som mulig årsak til noe lav sensitivitet. Sensitiviteten for pasienter med sikker Nevroborreliose var 91% hhv 77% for de med sannsynlig Nevroborreliose. CXCL13 nivået var lavere hos barn enn voksne men forskjellen var ikke signifikant. Faktorer som er rapportert til og muligens kunne gi falsk positiv CXCL13 er noen maligne sykdommer, tuberkuløs meningitt, bakteriell og viral meningitt og *Cryptococcus neoformans* meningitt. Immunokompromitterte pasienter kan også ha økt CXCL13 nivå (Hypogammaglobulinemi, HIV). Også pasienter med autoimmunsykdommer, MS og pasienter med akutt disseminert encephalomyelitt kan ha forhøyede CXCL13 verdier.

Vurderinger

CXCL13 er en parameter som ser ut til å ha et potensial til å bidra til en forbedret diagnostikk av LNB. Foreløpig foreligger det kun tilstrekkelige data for pasienter med akutt LNB. Datagrunnlaget for personer med kronisk LNB er sparsomt. Det ser ut som om en del andre sykdommer kan gi falsk positive CXCL13 resultater. Valg av cut off varierer sterk i litteraturen. Det blir spennende å følge med hva framtidig forskning vil vise blant annet mht bruk av CXCL13 som aktivitets- behandlingsmarkør samt som diagnostisk verktøy ved kronisk LNB.

Europeiske retningslinjer fra 2010 fraråder bruk av CXCL13 som rutineverktøy i diagnostikken av LNB.

Allikevel kan det i noen tilfeller være nyttig å ha CXCL13 som supplement i diagnostikk av LNB, så lenge man tolker funnene med varsomhet.

Referanser

1. Dattwyler RJ, Volkman DJ, Luft BJ et al. Seronegative Lyme disease. Dissociation of specific T- and B- lymphocyte responses to *Borrelia burgdorferi*. *N Engl J Med* 1988;19:1441-1446.
2. Dressler F, Yoshinari NH, Steere AC. The cell proliferative assay in the diagnosis of Lyme disease. *Ann Intern Med* 1991;115: 533-9.
3. Krause A, Brade V, Schoerner C, et al . T cell proliferation induced by *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme borreliosis. Autologous serum required for optimum stimulation. *Arthritis Rheum* 1991;34: 393-402.
4. Yoshinari NH, Reinhardt BN, Steere AC. T- cell responses to polypeptide fractions of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme arthritis. *Arthritis Rheum* 1992;34:707-13.
5. Zoschke DC, Skemp AA, Dosse DL. Lymphoproliferative responses to *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease. *Ann Intern Med* 1991;114: 285-9.
6. Krause A, Burmester GR, Rensing A, Schoerner C, Schaible UE, et al. Cellular immune reactivity to recombinant OspA and flagellin from *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme borreliosis. Autologous serum required for optimum stimulation. *Arthritis Rheum* 1992;34: 393-402.
7. Schempp C, Owsianowski M, Lange R, et al. Comparison of *Borrelia burgdorferi* ultra-sonicate and whole *B. burgdorferi* cells as a stimulus for T-cell proliferation and GM-CSF secretion in vitro. *Zentralbl Bakteriologie* 1993;279: 417-425.
8. Roessner K, Fikrig E, Russell JQ et al. Prominent T lymphocyte response to *Borrelia burgdorferi* from peripheral blood of unexposed donors. *Eur J Immunol* 1994;24:320-4.

9. Breier F, Klade H, Stanek G. Lymfocytenproliferationstest bei kutanen Manifestationen der Lyme-Borreliose. *Wien Med Wschr* 1995;27: 170-173.
10. Huppertz H-I, Mösbauer S, Busch DH. Lymphoproliferative responses to *Borrelia burgdorferi* in the diagnosis of Lyme arthritis in children and adults. *Eur J Pediatr* 1996;155: 297-302.
11. Rutkowski S, Busch DH, Huppertz H-I . Lymphocyte proliferation assay in response to *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme arthritis: analysis of lymphocyte subsets. *Rheumatol Int* 1997;17:151-158.
12. Wilske B. Review: Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2003;3:215-217.
13. Valentine-Thon, E, Ilsemann K, Sandkamp M et al. A novel lymphocyte transformation test (LTT-MELISA) for Lyme borreliosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;57:27-34.
14. Forsberg P, Ernerudh C, Ekerfelt M et al. The outer surface proteins of Lyme disease *borrelia* spirochetes stimulate T cells to secrete interferon gamma: diagnostic and pathogenic implications. *Clin Exp Immunol* 1995: 453-460.
15. Vrethem M, Widhe M, Ernerudh J et al. Clinical, diagnostic and immunological characteristics of patients with possible neuroborreliosis without intrathecal Ig-synthesis against *Borrelia* antigen in the cerebrospinal fluid. *Neurol Int* 2011;3:e2.
16. Widhe M, Jarefors S, Ekerfelt C et al. *Borrelia* specific interferon-gamma and interleukin 4 secretion in cerebrospinal fluid and blood during Lyme Borreliosis in Humans: Associations with clinical outcome. *J Infect Dis* 2004;189:1881-91.
17. Stricker RB, Winger WW. 2001. Decreased CD57 lymphocyte subset in patients with chronic Lyme disease. *Immunol Lett* Feb 2001;76:43-8.
18. Diagnostikk og behandling av Lyme Borreliose. Rapport til Helsedirektoratet av arbeidsgruppen. November 2009.
19. Marques A, Brown M, Fleisher TA. Natural killer cell counts are not different between patients with post lyme disease syndrome and controls. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:1249-50.
20. Letter to the editor. Natural killer cells in chronic Lyme disease. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:1704-6.
21. Mygland Å, Ljøstad U, Fingerle V et al. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *European J Neurol* 2010;17:8-16.
22. Goodman JL, Jurkovich P, Kramber JM, Johnson RC. Molecular detection of persistent *Borrelia burgdorferi* in the urine of patients with active Lyme disease. *Infect Immun* 1991; 59:269-278.
23. Ljøstad U, Mygland A. CSF B- lymphocyte chemoattractant (CXCL13) in the early diagnosis of acute Lyme neuroborreliosis. *J Neurol* 2008;255:732-737.
24. Rupprecht TA, Pfister HW, Angele B. The chemokine CXCL13 (BLC): a putative diagnostic marker for neuroborreliosis. *Neurology* 2005;65:448-50.
25. Rupprecht TA, Kirsching CJ, Popp B, et al. *Borrelia garinii* induces CXCL13 production in human monocytes through Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 2007; 75: 4351-4356.

26. Tjerneberg I, Henningson AJ, Eliasson I, et al. Diagnostic performance of cerebrospinal fluid chemokine CXCL13 and antibodies to the C6-peptide in Lyme neuroborreliosis. *J Infection* 2011; 62:149-158.
27. Wutte N, Berghold A, Krainberger I, Aberer E. Serum CXCL13 chemokine is not a marker for active Lyme Borreliosis. *Acta Derm Venereol* 91: 1-3. Letters to the editor 2011 Epub ahead of print.
28. Wutte N, Berghold A, Loeffler S, et al. CXCL13 chemokine in pediatric and adult neuroborreliosis. *Acta Neurol Scand* 2010 DOI: 10.1111/j. 1600-0404
29. Tumani H, Cadavid D. Are high CSF levels of CXCL13 helpful for diagnosis of Lyme neuroborreliosis? *Neurology* 2011;76:1034-35.
30. Schmidt C, Plate A, Angele B et al. A prospective study on the role of CXCL13 in Lyme neuroborreliosis. *Neurology* 2011;76:1051-1058.
31. van Burgel ND, Bakels F, Kroes ACM, et al. Discriminating Lyme Neuroborreliosis from other neuroinflammatory diseases by levels of CXCL13 in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 2011;49:2027-2030.
32. Coumou J, van der Poll T, Speelman P et al. Tired of Lyme borreliosis. Lyme borreliosis in the Netherlands. *Neth J Med* 2011;69:101-11.

Forkortelser: LNB: Lyme Neuroborreliose. AI: Antibody index.

Betydningen av cysteformer og spesifikke sirkulerende immunkomplekser

Tore Stenstad, Infeksjonsmedisinsk avd. Sykehuset i Vestfold, Tønsberg

Betydningen av cysteformer og spesifikke sirkulerende immunkomplekser ved Lyme borreliose

Spiroketer er gram-negative bakterier som bl.a. forårsaker sykdommer slik som syfilis, tilbakefallsfeber, leptospirose, nekrotiserende gingivitt og Lyme borreliose. I naturen er de frittlevende eller verts-assosierte, patogene og non-patogene og har karakteristisk helisk struktur med periplasmatiske fibriller som er unike for disse mikroorganismene.

Karakteristisk er også evnen til å danne såkalte "round bodies" (cyster, sphaeroplaster, vesikler). Disse strukturene ble tidlig påvist bl.a. hos *Borrelia duttonii* som respons på høy atmosfære-temperatur og i en rekke eldre publikasjoner for *Treponema pallidum*, *Borrelia vincenti* og *leptospirae* (1-4). Påvisning av cyster er også vel dokumentert for *Borrelia burgdorferi* både *in vitro* og *in vivo*. Ved dyrkning av *B burgdorferi* opptrer cyster i øket konsentrasjon med økende alder av kulturen; proporsjonalt med reduksjon av heliske former. I lang tid har disse strukturene vært vurdert som degenererte, moribunde bakterier. Det finnes imidlertid en rekke *in vitro* og *in vivo* studier som indikerer at dette er en viabel pleomorfisme som kan representere et stadium i mikrobenes livssyklus med evne til bevegelse, vekst og reproduksjon (5-7). Cysteformen synes å kunne representere mikrobens tilpasning til ugunstige miljøfaktorer slik som endring i temperatur, viskositet, pH, kjemisk sammensetning av salter, organiske stoffer og antibiotika (8,9). Flere rapporter demonstrerer reversering av cysteformer tilbake til helisk struktur. Cysteformer er påvist *in vivo* ved både nevrosyfilis (4) og ved Lyme borreliose. Cyster er påvist i øvre dermis ved erythema migrans i tidlig sykdomsfase (10), i hjernevev hos pasienter med samtidig kronisk neuroborreliose og Alzheimers sykdom (11,12), i tonsillevev *ex vivo* (13) og i spinalvæske hos enkelte pasienter med MS, dog uten samtidig klinisk verifisert neuroborreliose (7).

Betydningen av cysteformer er imidlertid fortsatt uklar når det gjelder patogenese og persistens hos pasienter med Lyme borreliose. Behandlingssvikt etter standardisert antibakteriell behandling kan observeres hos pasienter ved denne som ved andre bakterielle infeksjoner (14), men recidiv av sikker, påvisbar infeksjon synes å være sjelden. Ikke uvanlig forekommer imidlertid klinisk recidiv eller vedvarende symptomer, ofte kalt postborreliose-syndrom. Denne tilstanden synes ikke å være tilgjengelig for målrettet antibiotikabehandling (15,16). I ulike dyreeksperimentelle modeller finnes samtidig dokumentasjon for at en form for persisterende, ikke-kultiverbare spiroket-former som er resistente over for behandling med en rekke antibiotika (bl.a. amoxicillin, doxycylin, azitromycin, ceftriaxon og tigecylin), fremdeles er viable og infeksjose (17-21). Hvilken betydning disse observasjonene har i en klinisk kontekst, og hvilken sammenheng som eksisterer mellom disse og cysteformer av *B burgdorferi*, er imidlertid uviss.

Sirkulerende immunkomplekser (IK) kan påvises ved en rekke akutte og kroniske inflammasjonssykdommer, både maligne, autoimmune (SLE) og infeksjose (HBV). Teknisk kan IK presipiteres fra plasma ved hjelp av polyetylenglykol. Etter vasking og redissosiasjon av pellet kan spesifikke ELISA-tester gjennomføres etter samme prosedyre som for rutinepåvisning av frie antistoffer i serum. Deteksjon av sirkulerende IK ved Lyme borreliose er grundig dokumentert (22-25). Det synes som om IgM-IK er et tidlig fenomen ved primær infeksjon, og at denne metoden har noe høyere sensitivitet enn påvisning av fritt anti-*Borrelia* IgM i serum (26-29). Det er antatt at dette kan bero på overskudd av antigen. Vår kliniske erfaring er også at det hos enkeltstående seronegative pasienter kan være utslag ved denne metodikken. Ved senere stadier av sykdommen er bruksverdien mer usikker. Det er postulert

at sirkulerende IK avspeiler pågående infeksjonsaktivitet pga. antagelsen om at det i IK alltid er spesifikke *Borrelia*-antigener til stede. På denne måten er det derfor antatt at nivåer av spesifikke IK kan brukes som aktivitets-parameter og at fall i IK-konsentrasjoner verifiserer behandlingseffekt. Det er også hevdet at påvisning av signifikante nivåer av IK er en funksjon av kronisk, persisterende infeksjon. Dette er ikke godt dokumentert i litteraturen. Det finnes enkelte publikasjoner hvor *Borrelia*-antigener (OspA) kan påvises (30-33). Andre har imidlertid med samme metodikk ikke kunne avdekke slike bakterie-antigener (34), og har endog påvist IK hos ikke-infiserte, Lymerix-vaksinerte individer. Egen erfaring tilsier at en rekke personer med postborreliose-syndrom har høye nivåer av IK i serum, men at disse i stor utstrekning samvarierer med frie antistofftitre. Det er også en erfaring av man hos behandlede med klinisk respons, ser jevnt fallende antistofftitre; både frie og kompleksbundne, ved repeterte målinger over tid.

Referanser

1. DeLamater ED, Wiggall RH, Haanes M. Studies on the life cycle of spirochetes; the life cycle of the Nichols pathogenic *Treponema pallidum* in the rabbit testis as seen by phase contrast microscopy. *J Exp Med.* 1950;92:239-46.
2. Mac Donald AB: Spirochetal cyst forms in neurodegenerative disorders,...hiding in plain sight. *Med Hypotheses.* 2006;67:819-32.
3. Culwick AT, Fairbairn H. Polymorphism in *Treponema recurrentis* and *Spirochaeta vincenti*. *Ann Trop Med Parasitol.* 1947;41:1-5.
4. Miklossy J: Biology and neuropathology of dementia in syphilis and Lyme disease. *Handbook of Clinical Neurology* 2008;89:825-844.
5. Brorson Ø, Brorson SH, Scythes J et al: Destruction of spirochete *Borrelia burgdorferi* round-body propagules (RBs) by the antibiotic Tigecycline. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:18656-61.
6. Miklossy J, Kasas S, Zurn A et al: Persisting atypical and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and local inflammation in Lyme neuroborreliosis. *J Neuroinflammation* 2008; 5: 40.
7. Brorson Ø, Brorson SH, Henriksen TH et al: Association between multiple sclerosis and cystic structures in cerebrospinal fluid. *Infection* 2001;29:315-319.
8. Brorson Ø, Brorson SH: An in vitro study of the susceptibility of mobile and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to tinidazole. *Int Microbiol* 2004;7:9-12.
9. Brorson Ø, Brorson SH: An in vitro study of the susceptibility of mobile and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to hydroxychloroquine. *Int Microbiol* 2002;5:25-31.
10. Aberer E, Kersten A, Klade H et al: Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* in the skin. *Am J Dermatopathol* 1996;18:571-9
11. Miklossy J, Khalili K, Gern L et al: *Borrelia burgdorferi* persists in the brain in chronic lyme neuroborreliosis and may be associated with Alzheimers disease. *J Alzheimer's Disease* 2004;6:639-649.
12. MacDonald AB: *Borrelia* in brains of patient dying with dementia. *JAMA* 1986;256: 2195-2196.
13. Duray PH, Yin SR, Ito Y et al: Invasion of human tissue ex vivo by *Borrelia burgdorferi*. *J Infect Dis.* 2005;191:1747-54.
14. Schmidli J, Hunziker T, Moesli P et al: Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from joint fluid three months after treatment of facial palsy due to Lyme borreliosis. *J Infect Dis.* 1988; 158:905-6.
15. Feder HM, Johnson BJB, O'Connell S: A critical appraisal of "chronic Lyme disease". *N E J Med* 2007;357:1422-1430.

16. Marques A: Chronic Lyme disease: an appraisal. *Infect Dis Clin North Am* 2008;22:341-360.
17. Barthold SW, Hodzic E, Imai DM et al: Ineffectiveness of tigecycline against persistent *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:643-651.
18. Straubinger RK, Summers BA, Chang Y et al: Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. *J Clin Microbiol* 1997;35:111-116.
19. Straubinger RK, Straubinger AF, Summers BA et al: Status of *Borrelia burgdorferi* infection after antibiotic treatment and the effects of corticosteroids: an experimental study. *J Infect Dis* 2000;181:1069-1081.
20. Bockenstedt LK, Mao J, Hodzic E et al: Detection of attenuated, noninfectious spirochetes in *Borrelia burgdorferi*-infected mice after antibiotic treatment, *J Infect Dis* 2001;186:1430-1437.
21. Hodzic E, Feng S, Holden K et al: Persistence of *Borrelia burgdorferi* following antibiotic treatment in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1728-1736.
22. Schutzer SE, Coyle PK, Dunn JJ et al: Early and specific antibody response to OspA in Lyme disease. *J Clin Invest* 1994;94:454-457.
23. Schutzer SE, Coyle PK, Belman A et al: Sequestration of antibody to *Borrelia burgdorferi* in immune complexes in seronegative Lyme disease. *Lancet* 1990;335:312-315.
24. Schutzer SE, Coyle PK, Reid P et al: *Borrelia burgdorferi*-specific immune complexes in acute Lyme disease. *JAMA* 1999;282:1942-1946.
25. Coyle PK, Schutzer Se, Belman AL et al: Cerebrospinal fluid immune complexes in patients exposed to *Borrelia burgdorferi*: detection of *Borrelia*-specific and –nonspecific complexes. *Ann Neurol* 1990;28:739-744.
26. Brunner M: New method for detection of *Borrelia burgdorferi* antigen complexed to antibody in seronegative Lyme disease. *J Immunol Methods* 2001;249:185-190.
27. Brunner M, Stein S, Mitchell PD et al: Immunoglobulin M capture assay for serologic confirmation of early Lyme disease: analysis of immune complexes with biotinylated *Borrelia burgdorferi* sonicate enhanced with flagellin peptide epitope. *J Clin Microbiol* 1998;36:1074-1080.
28. Lencakova D, Stefanickova A, Ivanova R et al: Immune complexes in early Lyme disease. *Can J Microbiol* 2007;53:1375-1377.
29. Brunner M and Sigal LH: Use of serum immune complexes in a new test that accurately confirms early Lyme disease and active infection with *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 2001;39:3213-3221.
30. Coyle PK, Schutzer SE, Deng Z et al: Detection of *Borrelia burgdorferi*-specific antigen in antibody-negative cerebrospinal fluid in neurologic Lyme disease. *Neurology* 1995;45:2010-2015.
31. Zhong W, Oschmann P, Wellensiek HJ: Detection and preliminary characterization of circulating immune complexes in patients with Lyme disease. *Med Microbiol Immunol*. 1997;186:153-8.
32. Brunner M and Sigal LH: Immune complexes from serum of patients with Lyme disease contain *Borrelia burgdorferi* antigen and antigen-specific antibodies: potential use for improved testing. *J Infect Dis* 2000;182:534-539.
33. Brunner M: Report refuting value of immune complexes to diagnose Lyme disease is invalid. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:304-306.
34. Marques AR, Hornung RL, Dally L et al: Detection of immune complexes is not independent of detection of antibodies in Lyme disease patients and does not confirm active infection with *Borrelia burgdorferi*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:1036-1040.

Borreliose på nett.

Yngvar Tveten, Seksjon for laboratoriemedisin, Sykehuset Telemark HF, Skien

Under er angitt noen nettadresser som er viktige for å følge med på hva som skjer i den virtuelle verden når det gjelder borreliose.

Behandlingstilbud

Norsk borreliosesenter: <http://www.norskborreliosesenter.no/default.aspx>

Arenaklinikken: <http://www.arenaklinikken.no/>

Laboratorium: <http://burns.idium.net/bmlab.no/>

Borreliose Centrum Augsburg: <http://www.aerzte-bca.de/index.php?id=108&L=1>

Pasientforeninger og lignende

Norsk Lyme Borreliose forening: <http://www.lyme.no/>

Borreliforeningen: <http://www.borreli-foreningen.no/>

Foreningens blogg: <http://iloapp.borreli-foreningen.no/blog/blogg?Home>

Norsk forum for mennesker med kroniske smerter: <http://www.mosken.com/borreliia.html>

Forum for borreliose: <http://sunshine35446.yuku.com/topic/11723>

International Lyme and Associated Diseases Society: <http://www.ilads.org/>

Medisinske fagsider med anbefalinger fra USA og Europa

Infectious Diseases Society of America: <http://www.idsociety.org/Lyme/>

European Concerted Action on Lyme Borreliosis/EUCALB):

<http://meduni09.edis.at/eucalb/cms/index.php?lang=en>

ESCMID study Group for Lyme Borreliosis (ESCBOR):

http://www.escmid.org/research_projects/study_groups/esgbor/

DELTAGERE

Afset, Jan Egil, Mikrobiologisk avdeling, St. Olavs hospital, Trondheim
Barlinn, Regine, Avdeling for virologi, Folkehelseinstituttet, Oslo
Bjark, Per, Infeksjonsmedisinsk avdeling, Sykehuset Vestfold HF, Tønsberg
Brendefur, Linn Merete, Mikrobiologisk avdeling, Sykehuset Drammen, Vestre Viken HF
Christensen, Andreas, Avdeling for medisinsk mikrobiologi, St. Olavs Hospital, Trondheim
Dahlberg, Vibeke, Mikrobiologisk avdeling, Sykehuset Asker og Bærum, Vestre Viken HF
Dedi, Lumnije, Mikrobiologisk avdeling Ullevål, Oslo Universitetssykehus
Dorenberg, Dagny Haug, Mikrobiologisk avdeling Ullevål, Oslo Universitetssykehus
Dudman, Susanne, Avdeling for virologi, Folkehelseinstituttet, Oslo
Eliassen, Knut Erik, Universitetet i Oslo
Emmert, Andreas, Mikrobiologisk avdeling, Sykehuset Vestfold HF, Tønsberg
Grub, Carola, Mikrobiologisk avdeling, Sykehuset Innlandet, Lillehammer
Grude, Nils, Mikrobiologisk avdeling, Sykehuset Vestfold HF, Tønsberg
Haarr, Elisebet, Mikrobiologisk avdeling, Stavanger universitetsjukehus, Stavanger
Hide, Reidar, Mikrobiologisk avdeling, Ålesund sjukehus.
Hjetland, Reidar, Mikrobiologisk avdeling, Helse Førde HF, Førde
Hoddevik, Gunnar, Avdeling for virologi, Folkehelseinstituttet, Oslo
Holter, Ellen, Mikrobiologisk avdeling Rikshospitalet, Oslo Universitetssykehus
Hvidsten, Dag, Avdeling for mikrobiologi og smittevern, Universitetssykehuset i Nord-Norge, Tromsø
Jenum, Pål, Mikrobiologisk avdeling, Sykehuset Asker og Bærum, Vestre Viken HF
Johnsen, Bjørn Odd, Akerhus Universitetssykehus
Kristiansen, Bjørn Erik, Unilabs Telelab, Skien
Larsen, Astri Iervik, Mikrobiologisk avdeling, Sykehuset Østfold HF, Fredrikstad
Larsen, Kjersti Wik, Mikrobiologisk avdeling, St. Olavs hospital, Trondheim
Lerstad, Silje Alm, Mikrobiologisk avdeling, Molde Sjukehus, Molde
Lindgren, Per-Eric, Avdelningen för Medicinsk Mikrobiologi, Linköpings Universitet, Sverige
Melby, Kjetil, Mikrobiologisk avdeling, Oslo Universitetssykehus
Merckoll, Patricia, Mikrobiologisk avdeling, Akershus Universitetssykehus
Mortensen, Liisa, Mikrobiologisk avdeling, Nordlandssykehuset, Bodø
Naaber, Paul, Mikrobiologisk avdeling, Stavanger universitetsjukehus, Stavanger
Nilsen, Einar, Avdeling for mikrobiologi og smittevern, Universitetssykehuset i Nord-Norge, Tromsø
Njølstad, Gro, Mikrobiologisk avdeling, Haukeland universitetssykehus, Bergen
Noraas, Sølvi, Mikrobiologisk avdeling, Sørlandet sykehus, Kristiansand
Nøkleby, Hanne, Divisjons for smittevern, Folkehelseinstituttet, Oslo
Pettersen, Frank Olav, Mikrobiologisk avdeling Rikshospitalet, Oslo Universitetssykehus

Rykkvin, Rikard, Avdeling for virologi, Folkehelseinstituttet, Oslo
Samdal, Helvi Holm, Mikrobiologisk avdeling Ullevål, Oslo Universitetssykehus
Skarpaas, Tone, Mikrobiologisk avdeling, Sørlandet sykehus, Kristiansand
Steinbakk, Martin, Avdeling for bakteriologi og infeksjonsimmunologi, Folkehelseinstituttet, Oslo
Stenstad, Tore, Infeksjonsmedisinsk avdeling, Sykehuset Vestfold HF, Tønsberg
Stutzer Alexa, Mikrobiologisk avdeling, Molde Sjukehus, Molde
Sønstebø, Liv Jorunn, Mikrobiologisk avdeling, Haugesund Sjukehus, Fonna
Tjade, Trygve, Først medisinske Laboratorium, Oslo
Tveten, Yngvar, Seksjon for laboratoriemedisin, Sykehuset Telemark HF, Skien
Vestrheim, Didrik, Avdeling for bakteriologi og infeksjonsimmunologi, Folkehelseinstituttet, Oslo
Vik, Inger Sofie Samdal, Avdeling for virologi, Folkehelseinstituttet, Oslo
Vold, Line, Avdeling for infeksjonsovervåking, Folkehelseinstituttet, Oslo
Wilhelmsen, Marianne, Mikrobiologisk avdeling, Haukeland universitetssykehus, Bergen
Aaberge, Ingeborg, Avdeling for bakteriologi og infeksjonsimmunologi, Folkehelseinstituttet, Oslo
Aase, Audun, Avdeling for bakteriologi og infeksjonsimmunologi, Folkehelseinstituttet, Oslo

Utgitt av Nasjonalt folkehelseinstitutt
Divisjon for smittevern
Telefon: 21 07 70 00
Juni 2012

Rapporten kan lastes ned gratis eller bestilles
på www.fhi.no/publikasjoner

ISBN 978-82-8082-507-0 trykt utgave
ISBN 978-82-8082-508-7 elektronisk utgave