



AF BIOANALYTIKER JANE S. J. SKOU
KLINISK MIKROBIOLOGISK AFDELING, RIGSHOSPITALET

BIOANALYTIKER MALENE AA. HANSEN
TOKSIKOLOGISK AFDELING, H. LUNDBECK A/S



LYME BORRELIOSE

Fakta om Lyme Borreliose

Sygdommen Lyme Borreliose har været kendt i Europa siden 1880'erne. Betegnelsen Lyme Borreliose, også kaldet Lyme sygdom, blev dog ikke anvendt før i slutningen af 1970'erne. Dette skete i forbindelse med en undersøgelse af et større antal tilfælde af juvenil rheumatoid arthritis i byen Old Lyme i Connecticut, USA. I forbindelse med denne undersøgelse blev der fra flåten *Ixodes scapularis* isoleret en bakterie tilhørende spirokætfamilien; denne fik navnet *Borrelia burgdorferi sensu lato*.

Allerede i 1909 havde en svensk dermatolog dog forbundet et rødt udslæt (erythema migrans) med skovflåten (*Ixodes ricinus*), men det var først mange år senere, man fandt frem til den endelige sammenhæng mellem symptomerne, bakterien og flåten og således erkendte sygdommens rette ætiologi [1, 4, 10].

Bakterien overføres til mennesker via flåter, bl.a. skovflåten. Flåtens livscyklus består af tre stadier: Larve, nymfe og den fuldt udviklede flåt, se figur 1. Skovflåterne selv inficeres med *Borrelia*-bakterien i larvestadiet, når de suger blod fra et andet inficeret dyr, f.eks. en mus. Bakterien opformerer dernæst i skovflåtens tarm. Når skovflåten tager føde til sig, vil bakterien vandre op til spytkirtlerne og kan således overføres til bl.a. mennesker, i forbindelse med at flåten fouragerer. Det er dog ikke alle skovflåter, der er inficeret med bakterien. I Danmark anslår man således, at under 10 % af flåterne er inficerede med *B. burgdorferi*, og at ca. 250 danskere årligt udvikler serologisk verificeret Lyme borreliose [1-4, 10-12].



Borrelia-infektion

Hos mennesker opdeles infektionen i 3 stadier: Første stadium (I) er en lokal infektion, hvor det mest karakteristiske symptom er erythema migrans (EM), se figur 2. Dette er et udslæt, der udgår fra bidstedet og kan typisk erkendes 2 til 30 dage efter, flåten har bidt. I forbindelse med dette stadium vil nogle patienter udvikle IgM-antistoffer mod bakterien.

Andet stadium (II) indtræder, når mikroorganismen er blevet spredt med blodbanen og lymfesystemet til andre væv, hvilket kan inkludere andre dele af huden, nervesystemet, skelettet, musklerne og hjertet. Dette kan medføre en lang række kliniske symptomer (f.eks. Lyme arthritis, tidlig neuroborreliose og ansigtsslammelser), der viser sig fra få uger og op til et år efter den første infektion. I dette stadium sker der som oftest en serokonvertering fra IgM- til IgG-antistoffer.

Det tredje stadium (III) er et kronisk stadium og præsenterer sig typisk flere år efter den første infektion og kan involvere leddene (Lyme arthritis) og huden (ACA - Acrodermatitis Chronica Atrophicans; kan ses som en misfarvning af huden). Mere sjældent ses kroniske neurologiske syndromer, f.eks. kronisk neuroborreliose. I dette stadium ses ligeledes IgG-antistoffer, der kan persistere i op til flere år efter den primære infektion [1, 3, 4, 10].



Bakterien *Borrelia burgdorferi*.
Bakterien har et typisk prop-
trækkerlignende struktur.

● FAKTA OM BORRELIA

- Tilhører spirokætfamilien (*Spirochaetaceae*)
 - Slægten *Borrelia* kan opdeles i flere forskellige arter, f.eks. *Borrelia burgdorferi sensu lato*
 - Tre genospecies er humant patogener: *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* og *Borrelia afzelii*
- *B. garinii* er den hyppigste i Europa
 - Har en karakteristisk spiralform
 - Er 5-30 µm lang og 0,2-0,3 µm i diameter
 - Gram-negativ bakterie, men vanskelig at gramfarve
 - Mikroaerofil
 - Bevægelig vha. endoflageller
 - Eksempler på overfladeproteiner: OspA, OspB, OspC og VlsE

Flåten er afhængig af blod for at kunne udvikle sig til de forskellige stadier, og for at æggene kan modnes. En voksen flåt som ikke har suget blod, er 2-3 mm stor, mens en flåt fuld af blod vokser til 10 mm.



En evaluering af to ELISA-metoder til påvisning af antistoffer mod *Borrelia burgdorferi sensu lato* viser, at den nye VlsE-baserede ELISA er både mere sensitiv, billigere og hurtigere at udføre

Denne første danske sammenligning af den traditionelle flagel-baserede ELISA og den nye VlsE-baserede ELISA er et bachelorprojekt, der er udført af bioanalytikerne Jane S. J. Skou og Malene Aa. Hansen i samarbejde med Klinisk Mikrobiologisk Afdeling på Næstved Sygehus. Resultaterne herfra peger i retning af, at den nye ELISA-metode både er mere sensitiv, billigere og hurtigere at udføre end den p.t. anvendte.

Diagnosticering Borreliose

I Europa foregår den parakliniske diagnosticering af Lyme Borreliose primært ved anvendelse af kommercielle ELISA-kits, der kan påvise tilstedeværelsen af specifikke antistoffer rettet mod *Borrelia*-bakterien. Disse serologiske tests er beregnet som en hjælp i forbindelse med diagnosticeringen, idet anamnesen og de kliniske fund spiller en væsentlig rolle, særligt i sygdommens tidlige stadium [10].

Den hyppigst anvendte ELISA-metode i Danmark er baseret på anvendelsen af flagel-antigener fra *Borrelia*-bakterien. Andre steder i Europa er denne ELISA-metode dog ved at vige for andre ELISA'er baseret på det forholdsvis nyopdagede overflade-antigen VlsE (variable major protein-like sequence, expressed). Der har ikke tidligere været foretaget en dansk undersøgelse af denne nye ELISA-metode. Derfor har vi fundet det interessant at foretage en sammenligning af en flagel-baseret og en VlsE-baseret ELISA-metode. I denne forbindelse har vi ønsket at belyse,

hvorvidt anvendelsen af VlsE-antigenet har nogle fordele i forhold til det p.t. anvendte flagel-antigen.

Materialer og metoder

Til studiet er der anvendt 325 serumprøver fra hhv. raske og syge personer. Referenceprøverne fra de raske personer (217) stammer fra danske bloddonorer bosat på Sydsjælland og Lolland-Falster og er indsamlet i september og oktober 2005. De positive prøver er indsamlet i hhv. Danmark, Norge og Skotland, hvoraf 33 er potentielt krydsreagerende, medens de øvrige (75) stammer fra personer diagnosticeret med borreliose i alle tre sygdomsstadier samt fra en person i risikogruppen, se tabel 1.

Som den flagel-baserede ELISA anvender vi IDEIA® *Borrelia Burgdorferi* IgM/IgG fra Dako A/S (Dako G+M), da denne er den hyppigst anvendte ELISA-metode i Danmark. På tidspunktet for udførelsen af forsøget (oktober 2005) var Quick ELISA C6 *Borrelia* Kit fra Immunetics Inc. (C6) den eneste kommercielt tilgængelige ELISA-metode baseret på VlsE-antigenet, hvorfor vi har anvendt denne. Samtlige prøver er analyseret ved parallelkørsel på BEP2000 Advance (fra Dade Behring A/S) og er fortolket ud fra de af producenterne anbefalede tolkningskriterier.

I forbindelse med dette projekt har vi valgt at følge den totrins-model, der anbefales af CDC og German Society of Hygiene and Microbiology, og som i stor udstrækning anvendes i USA og

dele af Europa. Herved anvendes en screeningsmetode med høj sensitivitet (her ELISA), hvor positive og inkonklusive resultater bekræftes vha. Western Blot, der således fungerer som "gold standard". Til projektet her har vi anvendt recomBlot *Borrelia* IgG/IgM produceret af Mikrogen GmbH (WB). Konfirmeringen er foretaget på Mikrogens eget laboratorium i Tyskland. Den anvendte "gold standard" kommer således til at definere, hvad der i dette projekt forstås ved hhv. et "sandt" positivt og et "sandt" negativt prøveresultat. Sensitiviteten og specificiteten er beregnet på baggrund af disse definitioner. [10]

Resultater og diskussion

Vurdering af specificitet og sensitivitet: Specificiteten angiver sandsynligheden for et negativt analyseresultat hos reelt raske personer og er for Dako G+M og C6 beregnet til hhv. 98 % og 94 %, se tabel 2. Heraf kan man udlede, at antallet af falsk-positive analyseresultater hos donorerne er lidt højere for C6 end for Dako G+M. Vi tillægger dog ikke denne forskel på 4 % den store betydning, idet begge metoder trods alt har en høj specificitet.

Sensitiviteten angiver sandsynligheden for et positivt analyseresultat hos reelt syge personer og er for Dako G+M og C6 beregnet til hhv. 77 % og 97 %, se tabel 2. Antallet af falsk-negative analyseresultater er således en del højere for Dako G+M end for C6.

Der kan være flere årsager til de

Tabel 1: Fordeling af prøvemateriale

	Raske	Potentielt krydsreagerende						Total
	(donorer)	1. stadie	2. / 3. stadie	RF	Syfilis	EBV	Andre	
KIA, Nykøbing F	217							217
Kristiansand, Norge		20a						20
KMA, Næstved			12b					12
Uni. Hosp. of Cork, Skotland			5c					5
Aberdeen Royal Inf., Skotland		19c	16c					35
KBA, Bispebjerg					10			10
KMA, Herlev			2b					2
KBA, Nykøbing F				19		4		23
Risikogruppe (skovarbejder)							1	1
Total	217	39	35	19	10	4	1	325

Ordforklaring:

KIA = Klinisk Immunologisk Afd., KMA = Klinisk Mikrobiologisk Afd., KBA = Klinisk Biokemisk Afd.

RF = Rheumatoid Factor, EBV = Epstein-Barr Virus

a) Diagnosticeret vha. symptomer og en klassespecifik ELISA

b) Diagnosticeret vha. en ELISA specielt fremstillet med henblik på diagnosticering af neuroborreliose

c) Diagnosticeret vha. en til to ELISA's og Western Blot



Det typisk cirkulære udslæt erythema migrans er et sikkert tegn på Borrelia infektion. Udslættet kan imidlertid ofte mangle eller være atypisk.

tabel 3. Andre studier, der har anvendt ELISA'er med C6 som antigen, opnår sensitiviteter på hhv. 87 % og 74 % for patienter i stadie I [6-7].

Hos patienter i stadie I vil man hovedsageligt forvente at finde IgM-antistoffer. Derfor vil man samtidig forvente, at Dako M er bedre end Dako G med hensyn til detektion af positive prøver fra patienter i stadie I, hvilket resultaterne i tabel 3 bekræfter.

Uanset om man ser på sensitiviteten for Dako's ELISA sammen (G+M) eller hver for sig (G eller M), er sensitiviteten for C6 dog stadig den højeste, hvorfor vi vurderer den til at være det bedste valg af de anvendte ELISA'er til påvisning af specifikke antistoffer rettet mod *Borrelia*-bakterien hos patienter med borreliose i stadie I.

Vurdering af positive prøver (stadie II og III)

Betragter man resultaterne for patienterne i stadie II og III (tabel 4), viser det sig, at Dako G+M har en sensitivitet på 77 %. I modsætning hertil opnår C6 en sensitivitet på 100 %. Andre undersøgelser, der ligeledes anvender C6-antigenet, har opnået sensitiviteter på hhv. 70 % og 95-100 % [6-7].

Patienterne i stadie II og III vil i langt de fleste tilfælde serokonvertere fra IgM-antistoffer til IgG-antistoffer, hvorfor andelen af detekterbare antistoffer må forventes at være højere for Dako G i forhold til Dako M. Dette gør sig også gældende i dette projekt (tabel 4), men da C6 under alle omstændigheder har den størst mulige sensitivitet (100 %) til påvisning af antistoffer hos patienter med borreliose i stadie II og III, vil vi vurdere den til ligeledes at være den foretrukne analysemetode hos denne

patientgruppe.

Vurdering af de potentielt krydsreagerende prøver

I tabel 5 ses det, at C6 har påvist 3 af de i alt 33 potentielt krydsreagerende prøver. I modsætning hertil har Dako G+M påvist 6, medens Western Blot-metoden har påvist 5. Samlet set peger resultaterne for de potentielt krydsreagerende prøver således mod en minimal krydsreaktivitet for C6 sammenlignet med både Dako G+M og referencemetoden (WB).

En sådan vurdering må dog tages med et vist forbehold, idet antallet af prøver inden for denne gruppe har været begrænset. Vurderingen tager udgangspunkt i, at ingen af de krydsreagerende prøver samtidig er positive for antistoffer rettet mod *Borrelia*-bakterien. Imidlertid kendes den eksakte *Borrelia*-status ikke for nogen af de potentielt krydsreagerende prøver, hvorfor der naturligvis er en risiko for, at nogle af disse prøver indeholder antistoffer mod *Borrelia*-bakterien som følge af tidligere infektion. Dette kan meget vel gøre sig gældende for den syfilis-prøve, der er positiv for alle tre metoder.

Sammenholder man disse resultater med tilsvarende resultater fra andre forsøg, må der dog siges at være en vis tendens til, at C6-antigenet er mindre tilbøjeligt til at krydsreagere i forhold til andre antigener anvendt i serologiske tests [6-9].

Andre aspekter ved en metode-evaluering

Vælger man at anskue de to ELISA-metoder ud fra et økonomisk aspekt, viser der sig ligeledes at være forskel de to metoder imellem. Prisen for ét C6-kit er

ovenstående forskelle i sensitivitet og specificitet. Der kan f.eks. være manglende komplementaritet mellem det anvendte antigen og det antistof, man ønsker at påvise. Dette kan medføre en lavere bindingsstyrke mellem antigen og antistof og en deraf følgende lavere sensitivitet. Derudover kan analysering ved forkert pH eller forkert temperatur medføre, at det enzym, der tilsættes i forbindelse med analysering, ikke fungerer optimalt.

Vi vurderer imidlertid, at den primære årsag til de forskellige analyseresultater er, at C6 har en relativt lav cut-off-værdi - (Angiver grænsen mellem et positivt og et negativt analyseresultat) i forhold til Dako G+M. Er cut-off-værdien lav, vil det alt andet lige afstedkomme falsk-positive resultater og en deraf faldende specificitet, hvorimod en høj cut-off-værdi tilsvarende kan medføre en del falsk-negative resultater og dermed en faldende sensitivitet.

Andre studier bekræfter, at anvendelsen af C6-antigenet i ELISA's udmunder i både en høj specificitet og sensitivitet, idet man har været i stand til at påvise en specificitet på 97-100 % og sensitiviteter på hhv. 64 % og 100 % [5-7, 9].

Vurdering af positive prøver (stadie I)

Fokuserer man udelukkende på stadie I, vil man kunne konstatere, at Dako G+M har en sensitivitet på 76 %, medens C6 har opnået en sensitivitet på 94 %, se

>>>



REFERENCER

1. Degré, M. et al, Medisinsk Mikrobiologi, 2. udgave, Gyldendal Norsk Forlag AS, 2000, side 218-223
2. Høiby, N., Basal og Klinisk Mikrobiologi, 2. udgave, FADL's forlag, 1993, 153 + 156-157
3. Lorenzen, I. et al, Medicinsk Kompendium, 15. udgave, Nyt Nordisk Forlag Arnold Busck, Viborg, 1999, side 752-754 (bind 1)
4. Murray, P.R. et al, Manual of Clinical Microbiology, 8. udgave, ASM Press, Washington D.C., 2003, side 937-950
5. Jansson, C. et al, "Analysis of Borrelia burgdorferi IgG antibodies with a combination of IgG ELISA and VlsE C6 peptide ELISA, Clinical Microbiology and Infection, vol. 11, nr. 2, 2005, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, side 145-150
6. Liang, F.T. et al, "Antigenic Conservation of an Immunodominant Invariable Region of the VlsE Lipoprotein among European Pathogenic Genospecies of Borrelia burgdorferi SI", The Journal of Infectious Diseases, nr. 182, 2000, The Infectious Diseases Society of America
7. Liang, F.T. et al, "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", Journal of Clinical Microbiology, vol. 37, nr. 12, 1999, American Society for Microbiology, side 3990-3996
8. Magnarelli, L.A. et al, "Comparative reactivity of human sera to recombinant VlsE and other Borrelia burgdorferi antigens in class-specific enzyme-linked immunosorbent assays for Lyme borreliosis", Journal of Medical Microbiology, vol. 51, 2002, Society for General Microbiology, side 649-655
9. Mogilyanski, E. et al, "Comparison of Western Immunoblotting and the C6 Lyme Antibody Test for Laboratory Detection of Lyme Disease", Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, vol. 11, nr. 5, 2004, American Society for Microbiology, side 924-929
10. www.eucalb.com
11. www.ssi.dk
12. Ram Dessau, overlæge, Klinisk Mikrobiologisk afd., Storstrømmens Sygehus, Næstved

Tabel 2: Oversigt over statistiske beregninger

Metoder	Sensitivitet	Specificitet
C6	97 %	94 %
Dako G+M	77 %	98 %

Tabel 3: Sensitivitet for stadie I

Metoder	Sensitivitet
C6	94 %
Dako G+M	76 %
Dako G	39 %
Dako M	58 %

Tabel 4: Sensitivitet for stadie II og III

Metoder	Sensitivitet
C6	100 %
Dako G+M	77 %
Dako G	65 %
Dako M	55 %

Tabel 5: Oversigt over de positive krydsreagerende prøvers betegnelse

Prøvebetegnelse	Metoder		
	C6	Dako G+M	WB
Syfilis	-	+	+
Syfilis	-	+	+
Syfilis	+	+	+
RF	+	-	-
RF	+	-	+
EBV	-	+	-
EBV	-	+	+
EBV	-	+	-

+: Positiv - : Negativ

ca. kr. 3.400,- (prisen er oplyst af leverandøren, Biotech-IgG A/S). Den tilsvarende pris for ét Dako G- eller M-kit er ca. kr. 2.000,- (prisen er oplyst af Klinisk Mikrobiologisk afd. på Næstved Sygehus). Således bliver den "samlede" pris for analysering vha. Dako G+M ca. kr. 4.000,-. Disse priser svarer til de officielle listepreiser (2005) for de anvendte ELISA's, men der er dog mulighed for at opnå visse rabatter fra leverandørerne.

Ydermere kan der vha. ét C6-kit analyseres op til 94 prøver ad gangen, hvorimod ét Dako G- eller M-kit kan analysere op til 90 prøver ad gangen. Ser man bort fra aflønning af personale og andre omkostninger, der ikke er direkte "kit-afhængige", vil prisen pr. prøve være ca. kr. 44,- for Dako G+M og ca. kr. 36,- for C6.

Det tidsmæssige aspekt spiller også en rolle: Ved anvendelse af Dako G+M kan analysen til påvisning af antistoffer mod Borrelia-bakterien tage op til dobbelt så lang tid som den tilsvarende analysering vha. C6-ELISA, forudsat at begge analyser udføres på BEP2000 Advance. Dette skyldes, at protokollen for C6 indeholder et inkuberingsstrin mindre end de anvendte ELISA's fra Dako A/S, ligesom C6-ELISA anvender ufortyndet prøvemateriale. Det samlede tidsforbrug for en C6-ELISA er således ca. 75-90 minut-

ter afhængig af antallet af prøver. En Dako G+M ELISA tager derimod ca. 135-180 minutter, hvilket ligeledes afhænger af hvor mange prøver, der analyseres ad gangen.

Konklusion og perspektivering

I tråd med flere videnskabelige artikler viser dette projekt, at C6 ikke er en helt uinteressant analysemetode. Dako G+M har ganske vist opnået den højeste specificitet (98 %) af de to ELISA's, men denne er ikke meget forskellig fra specificiteten for C6 (94 %). Dog er der stor forskel på sensitiviteten de to metoder imellem, idet C6 giver en sensitivitet på 97 %, medens Dako G+M samlet har en sensitivitet på 77 %. På baggrund af disse resultater har vi vurderet C6-ELISA til at være den bedst egnede af de to til diagnosticering af borreliose. Dertil kommer, at C6 er mere tidsbesparende i forhold til Dako G+M og samtidig minimerer omkostningerne pr. prøve, hvilket støtter vores vurdering af C6 som den foretrukne ELISA-metode til påvisning af antistoffer specifikt rettet mod *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

På baggrund af dette ene projekt er det ikke umiddelbart muligt at afgøre, hvorvidt Dako G+M kan eller bør erstattes med C6 som rutineanalyse. Overvejer man en sådan udskiftning, vil vi anbefale, at der foretages en