

Analysemetoder for påvisning av Lyme borreliose

Tone Skarpaas, Hanne Quarsten, Sølvi Noraas

Mikrobiologisk avdeling, Sørlandets sykehus HF

Alle illustrasjoner ved Jahn Frederik Grue.

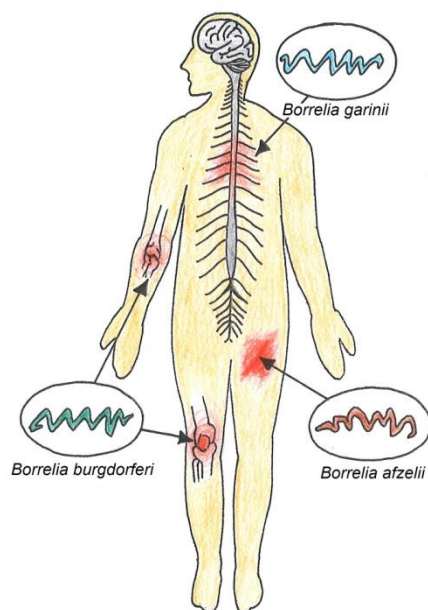
Liste over forkortelser (alfabetisk)

ACA	Acrodermatitis chronica atrophicans, kronisk hudinfeksjon
BA	Borreliaartritt, leddbetennelse
CSF	Spinalvæske (cerebrospinal fluid)
ELISA	Enzyme linked immunosorbant assay
EM	Erythema migrans, lokal, tidlig hudinfeksjon
LB	Lyme borreliose
LNB	Lyme nevroborreliose
PCR	Polymerasekjedereaksjon (polymerase chain reaction)
NK-celler	Naturlige dreperceller (natural killer cells)
SLP	Sammenliknende laboratorieprøving
SSHF	Sørlandet sykehus helseforetak

Bakgrunn

Lyme borreliose (LB) er en sykdom forårsaket av bakterien *Borrelia burgdorferi sensu lato*, en spirokete. I Europa overføres bakterien til mennesket ved bitt av flåtten *Ixodes ricinus*, mens i andre deler av verden er andre flåtterarter smittebærere. Flåtten har tre stadier: larve, nymfe og voksen. I Agder ble det i en studie i 2007 funnet at larver, nymfer og voksne flått inneholdt i snitt henholdsvis 0,5 %, 24,5 % og 26,9 % *Borrelia*, og i Brønnøysund ble det i 2013 funnet at 11,3 % av nymfer og 33,3 % av voksne flått inneholdt *Borrelia*. Det er store variasjoner fra sted til sted (1, 2). Vanligvis oppholder *Borrelia* seg i flåttens tarmsystem, men når flåtten biter, beveger bakterien seg til spyttkjertlene. Det tar tid før mikroben kommer over i spyttet, og det antas derfor å være liten risiko for å bli smittet om flåtten fjernes i løpet av de første 24 timer. Ved bitt av flått som inneholder *Borrelia* er det rundt 5 % sjans for å bli syk, og den vanligste sykdomsmanifestasjon er utslettet Erythema migrans (EM) (3, 4). Hos noen vil borreliabakterien spre seg fra hud til andre kroppsorganer, da kalles det disseminert infeksjon. Bakteriene foretrekker å oppholde seg lokalt i vev, og dersom man får en disseminert infeksjon vil mikroben trolig være kortvarig i kroppsvæsker som blod og spinalvæske (CSF; cerebrospinal fluid). I Europa er det flere undertyper av *Borrelia* (minst 5) som ser ut til å foretrekke forskjellige typer vev (tabell 1/figur 1). De vanligste er *Borrelia*

afzelii som foretrekker hud, *Borrelia burgdorferi sensu stricto* som ofte søker til ledd og *Borrelia garinii* som ofte etablerer seg i nervesystemet. De forskjellige undergruppene av *Borrelia* kan infisere mer enn en type vev. Både *B. afzelii* og *B. burgdorferi* kan f.eks. være årsak til nevroborreliose (5, 18).



Figur 1. Ulike borreliaundertyper foretrekker ulikt vev.

Det finnes flere borreliaundergrupper som alle kan forårsake ulik sykdom, men det er en klar tendens til at noen varianter oftere er assosiert med noen sykdomstyper enn andre. *Borrelia afzelii* påvises oftest i hudutslett (andre enn EM), mens *Borrelia burgdorferi sensu stricto* er den vanligste undertypen som gir leddplager. Symptomer i nervesystemet er vanligvis forårsaket av *Borrelia garinii*.

Det første symptomet på en borreliainfeksjon vil vanligvis være EM, et ringformet utslett som oppstår rundt flåttbittet etter noen dager. EM er > 5 cm i diameter og brer seg utover. Om EM ikke behandles med antibiotika eller kroppens immunforsvar ikke klarer å slå ut infeksjonen, vil bakterien kunne spre seg og gi

disseminert infeksjon som oftest i løpet av 1-2 måneder. I spredningsfasen kan man ha relativt kortvarige generelle plager som feber og smerter i ledd og muskulatur. Slike plager er kroppens svar på infeksjon, og de er uspesifikke i den forstand at de samme plagene kan forårsakes av mange andre typer smittestoff. De vanligste rapporterte formene av disseminert LB i Norge og Europa er Lyme nevroborreliose (LNB) med symptomer fra nervesystemet (6) og borreliaartritt (BA) som gir betennelse i ett eller flere store ledd. Det er oftest betydelig hevelse i leddet ved BA, og uten behandling har sykdommen vanligvis et tilbakevendende forløp. En sjelden gang kan *Borrelia* føre til karditt, en betennelse i hjertet som gir rytmeforstyrrelse. Uten behandling kan LB etter mange år føre til en kronisk hudinfeksjon, ACA (acrodermatitis chronica atrophicans), som karakteriseres av partier med tynn og misfarget hud.

Diagnosen LB baserer seg på vurdering av pasientens symptomer, sykdomshistorikk, biokjemiske tester og mikrobiologiske undersøkelser. Når man vurderer å sende inn prøver til undersøkelse for *Borrelia*, er det viktig at pasienten i utgangspunktet har plager som kan være forenlig med borreliainfeksjon. Hvis det undersøkes prøver fra en person som har plager som er atypisk for LB, er det mindre sannsynlig at testene er nyttige

Tabell 1. Humanpatogene *Borrelia* undertyper i Europa og foretrukket vev

Borreliaarter	Foretrukket vev
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	Ledd
<i>B. afzelii</i>	Hud
<i>B. garinii</i>	Nervesystemet
<i>B. lusitaniae</i>	Hud, annet?
<i>B. valaisiana</i>	Hud, nervesystemet
<i>B. spielmanii</i>	EM (hud), annet?

forenlig med borreliainfeksjon. Hvis det undersøkes prøver fra en person som har plager som er atypisk for LB, er det mindre sannsynlig at testene er nyttige (7). Denne artikkelen omhandler mikrobiologiske og immunologiske tester for påvisning av LB. Testenes ytelse blir ofte oppgitt med sensitivitet og spesifisitet. Begrepene kan være relatert

til selve testen (analytisk sensitivitet/spesifisitet) eller pasientens tilstand (diagnostisk sensitivitet/spesifisitet). Det er viktig å forstå disse begrepene for å kunne tolke betydning av prøvesvar og diagnostisk litteratur.

- *Analytisk sensitivitet.* Testens evne til å påvise f.eks. bakterien eller antistoffet hvis den/det er til stede i prøvematerialet. Begrepet sier noe om testens tekniske kvalitet.
- *Diagnostisk sensitivitet.* Testens evne til å identifisere alle individer som har aktuell sykdom. Andre faktorer enn testens ytelse kan ha betydning for analysesvaret. Valg av feil prøvemateriale kan gi falske negative prøvesvar.
- *Analytisk spesifisitet.* Testens evne til å påvise kun det som det undersøkes for og ikke noe annet som finnes i prøvematerialet. Hvis testen påviser et annet molekyl enn ønsket og gir falske positive resultater, har den lav analytisk spesifisitet.
- *Diagnostisk spesifisitet.* Testens evne til å være positiv kun når pasienten har den sykdom det undersøkes for. Hvis testen også er positiv ved andre tilstander eller hos friske, vil det senke testens diagnostiske spesifisitet. Dette kan føre til falske positive resultater selv om analytisk spesifisitet er høy. For at en test skal kunne brukes i sykdomsdiagnostikk, må man derfor alltid ha undersøkt kontrollgrupper for å sikre at det er færrest mulig andre tilstander som gir positivt testresultat.

Metodene som beskrives her inndeles i to grupper. Det er metoder for direkte påvisning av borreliabakterien og indirekte metoder som påviser deler av kroppens immunrespons mot infeksjonen. Direkte påvisning av bakterien med riktig utførte tester gir et sikkert positivt diagnostisk funn. Ved bruk av indirekte tester kreves det derimot mer omfattende dokumentasjon for å forstå sammenhengen mellom analyseresultatet og pasientens diagnose. Artikkelen ønsker å gjøre rede for styrker og svakheter til ulike tester som brukes i forskjellige laboratorier i dagens borreliadiagnostikk. I tillegg vil bakgrunn for valg av hvilke metoder som benyttes ved Mikrobiologisk avdeling ved SSHF belyses.

Metoder for direkte påvisning av *Borrelia*

I mikrobiologisk diagnostikk generelt er påvisning av selve mikroben den sikreste måten å identifisere infeksjoner. Er det funn av en bakterie hos en pasient som har symptomer som denne bakterien vanligvis forårsaker, har man med høy sannsynlighet funnet årsaken til sykdommen. Metoder som benyttes til direkte påvisning av mikrober er mikroskopi, dyrkning og påvisning av arvemateriale (DNA) ved bruk av polymerasekjedereaksjon (PCR; polymerase chain reaction). Slike metoder kan også benyttes for å påvise *Borrelia*.

En viktig forutsetning for at direkte påvisning av en mikrobe skal gi korrekt diagnose, er at pasientmaterialet hentes fra et område hvor mikroben er til stede og infeksjonen er etablert. Borreliaspiroketen oppholder seg i varierende antall på ulike steder i kroppen avhengig av hvordan infeksjonen utvikler seg hos hver enkelt pasient. Et bekreftet positivt funn vil gi pasienten en riktig diagnose, men ofte vil *Borrelia* ikke kunne påvises i materiale fra en

pasient med LB. Direkte påvisning har derfor lav diagnostisk sensitivitet i forhold til infeksjon med *Borrelia*.

Direkte mikroskopi av *Borrelia* i pasientmateriale

Påvisning av borreliabakterier hos LB-pasienter er vanskelig. *Borrelia* er påvist ved direkte mikroskopi og sølvfarging i hudbiopsier fra EM og leddbiopsier (8). Forsøk på mikroskopisk påvisning i annet humant materiale har ikke vært vellykket, sannsynligvis fordi bakterien der finnes mer spredt og i et lavt antall. Direkte mikroskopi har lav diagnostisk sensitivitet. I tillegg vil preparering av pasientmateriale med kompleks sammensetning kunne føre til at det oppstår "falske" strukturer (artefakter) som blant annet kan forveksles med bakterier ved mikroskopi. Hvis spiroketeliknende strukturer observeres ved direkte mikroskopi, må man derfor i tillegg benytte andre metoder for å bekrefte at det man ser faktisk er *Borrelia* og ikke et artefakt. Dette kan f.eks. gjøres med fluorescensmerkede spesifikke borreliaantistoffer som vil feste seg til bakterien, eller det kan undersøkes med PCR.

Verifisering av en metodes pålitelighet er nødvendig før den er aktuell for bruk til diagnostisering av pasienter. I en nylig publikasjon som hevder å påvise *Borrelia* direkte i pasienters blod (9), er det ikke gjort slik verifisering. Dette er en stor svakhet som gjør funnene svært usikre. Det er også nødvendig med testing av mikroskopifunn i kontrollgrupper for å sikre at metoden har forsvarlig diagnostisk spesifisitet. Direkte mikroskopi benyttes ikke i rutinediagnostikk av LB på grunn av lav diagnostisk sensitivitet. Derimot er mikroskopi nyttig for å bekrefte vekst av *Borrelia* ved dyrkning i kultur (se nedenfor). Preparat fra kultur vil gi et renere og mer oversiktlig mikroskopisk bilde som er lettere å tolke uten å bruke andre tilleggsundersøkelser enn et preparat laget direkte fra pasientmateriale.

Dyrkning av *Borrelia* fra pasientmateriale

For å oppformere *Borrelia* kreves et svært spesialisert medium (Barbour-Stoener-Kelly) og kulturen må dyrkes i minst seks uker fordi bakterien deler seg langsomt (doblingsid på 7-20 timer). Verifisering av positiv kultur kan gjøres med mikroskopi (med eller uten farging) eller PCR.

Dyrkning av *Borrelia* fra vevsbiter (biopsier) har gitt gode resultater. Det kan dyrkes *Borrelia* fra opptil 88 % av biopsier fra klassisk EM- eller ACA-utslett (10, 11). Som regel er utslettet ved EM så typisk at behandling kan gis uten at det er nødvendig å gjøre ytterligere diagnostiske undersøkelser. Det er kun ved ukarakteristiske hudforandringer det er behov for diagnostisk bekreftelse. Som regel vil man da benytte PCR fordi det er en enklere og raskere metode enn dyrkning.

Det har vist seg å være lite nyttig i diagnostikk å dyrke *Borrelia* fra blod. I USA er det derimot ved dyrkning fra stort blodvolum (over 9 ml) påvist *Borrelia* fra blod hos opptil 40 % av pasienter i tidlig fase (med EM) av sykdommen (12, 13). Ved senere stadier av LB er det mye lavere frekvens av dyrkningspositive kulturer, og den diagnostiske nytteverdi av dyrkning fra blod er derfor usikker (14, 15). Nylig har Sapi mfl. (16) publisert en optimalisert dyrkningsmetode for *Borrelia* fra blod med en sensitivitet på 90 % i det aktuelle

pasientmaterialet. Spiroketen holdes først i en vanlig korttidskultur, før denne overføres til ny kultur hvor bakterienes overlevelse og vekst er bedret ved hjelp av kollagenbelagte plater. Disse resultatene er uventet gode. Sapi har bekreftet (personlig kommunikasjon) at det vil komme mer detaljert informasjon om pasientgruppen i studien i en oppfølgingspublikasjon. Denne informasjonen er nødvendig for en grundigere vurdering av dataene. Nylig er det publisert en artikkel hvor forfatterne påpeker at det er genetisk stor likhet mellom de påviste borreliabakteriene hos pasientene i Sapis studie og en kontrollstamme fra laboratoriet (17). Laboratorieforurensning kan derfor ikke utelukkes. Denne dyrkningsteknikken må derfor bekreftes i flere studier før metoden eventuelt kan benyttes i rutinediagnostikk.

Få laboratorier benytter foreløpig dyrkning på grunn av lav sensitivitet ved disseminert LB. En viktig fordel med dyrkning er muligheten for å identifisere hvilken borreliatype pasienten er smittet med. Slik informasjon kan få betydning for valg av antibiotika til behandling (18). I forskning er imidlertid dyrkning svært nyttig. Muligheten for å holde *Borrelia* fra pasientmateriale i kultur kan bidra til økt kunnskap om hvilke typer av *Borrelia* som gir sykdom. Bakterier fra kultur brukes også for å optimalisere andre diagnostiske metoder som f.eks. PCR.

PCR-påvisning av borreliaarvestoff

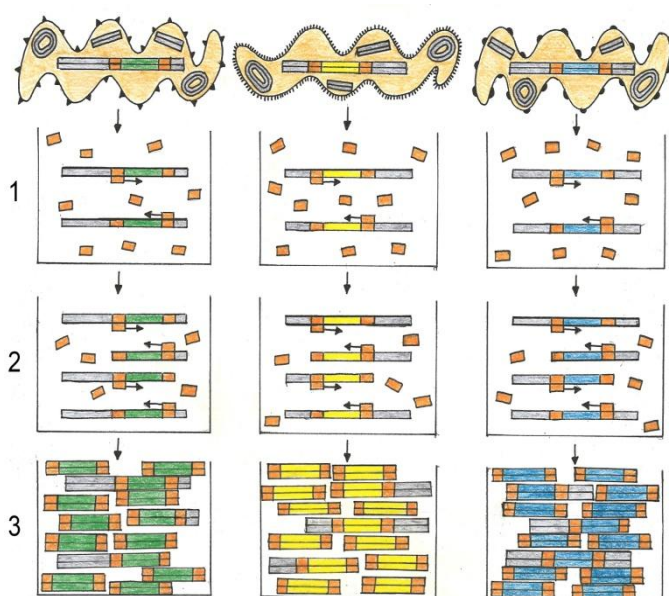
Påvisning av arvestoff (DNA) med PCR er regnet for å være en svært sensitiv metode. Sensitiviteten varierer noe avhengig av hvilken del av arvematerialet (kromosom eller plasmid) som påvises og hvilke detektorer (primere) som benyttes. Primerne er laget slik at de binder nær hverandre i DNA-området som skal påvises, og sekvensen mellom disse kan kopieres ved hjelp av blant annet DNA polymerase (et enzym). Kopieringsprosessen kontrolleres med temperaturskift, hvor skiftene i temperatur gjentas i sykler. Kopiene påvises vanligvis med en fluorescerende DNA-probe eller ved gelelektroforese. Deler av mikrobens DNA mangfoldiggjøres i løpet av et par timer med PCR. Tilsvarende økning av mikroben i kultur krever uker med dyrkning.

Det må vanligvis være 5-10 borreliabakterier tilstede i prøven som analyseres for å få en positiv PCR. PCR påviser *Borrelia*, som ved kultur, i en høy andel (50-100 %) av hudbiopsier fra EM og ved ACA (19, 20). Studier viser også at hele 50-70 % av leddvæsker tappet fra pasienter med ubehandlet BA er borrelia-DNA positive (21). PCR-analysens sensitivitet i et slikt materiale er muligens enda høyere enn oppgitt i litteraturen, og SSHF har 75 % positive funn i leddvæske fra BA-pasienter (22). Analysene etablert ved SSHF viser også høy diagnostisk sensitivitet (66 %) på biopsier fra EM (pågående prosjekt v/Eliassen KE). Siden PCR-metoden er lett å standardisere for rutine og har dokumenterte gode resultater, benyttes metoden rutinemessig for BA, ukarakteristisk EM og ACA. PCR blir av andre ofte benyttet til å kartlegge hvor mange flått som er infisert og hvilke typer *Borrelia* det finnes i flått i ulike områder.

Studier viser at det er liten mulighet (10-18 %) for å påvise borrelia-DNA med PCR i blod ved LB. Noe bedre diagnostisk sensitivitet er vist ved LNB hvor 38 % av pasientene får påvist borrelia-DNA ved hjelp av PCR i CSF i tidlig sykdomsfasen, men muligheten for positivt funn

reduseres raskt etter som symptomene vedvarer (23, 24, 25, 26). PCR utføres på SSHF i noen tilfeller på CSF, men per i dag har det ikke gitt diagnostisk gevinst sammenliknet med antistoffundersøkelse.

En begrensning ved PCR er at metoden kun påviser mikrobevarianter hvor analysens primere (og probe) binder. Dette kan potensielt gi et problem om det dukker opp nye varianter hvor PCR-detektorene ikke binder på grunn av sekvensulikheter med mikrobe-DNA. Primere til mikrobepesifikk PCR skal om mulig velges fra et område hvor det vanligvis ikke er sekvensvariasjon (figur 2). SSHF har valgt å benytte to typer borreliaspesifikke PCR analyser på alt prøvemateriale som undersøkes for å redusere denne type risiko. En OspA-PCR påviser de vanligste humanpatogene variantene, mens en 16S-PCR påviser en DNA sekvens som finnes i alle kjente borreliasubtyper uavhengig om de er humant patogene eller ikke.



Figur 2. En PCR-analyse kan påvise flere borreliaundertyper selv om disse har forskjeller i DNA-sekvensen.

Figuren viser tre ulike borreliaundertyper. Bakterienes DNA har mange likheter, men også en del forskjeller. PCR-primere binder DNA som de komplimenterer (begge deler er farget oransje). Disse bindingssetene er like i de tre ulike bakteriene, slik at selv om det er forskjeller i DNA-sekvensen utenfor eller innenfor så vil PCR-analyse med disse primerne resultere i at området mellom primerne kopieres (trinn 1-3). I pasientprøven vil et høyt antall av PCR-kopier lett påvises med ulike teknikker. En PCR-analyse vil på denne måten kunne påvise ulike borreliaundertyper.

Da PCR-metoden, som anses å være en svært sensitiv metode, ble tatt i bruk, var det forventet at dette ville forbedre muligheten til å påvise *Borrelia* hos pasienter med pågående og aktiv LB. PCR er enklere, raskere og minst like sensitiv som kultur, men metoden har ikke løst alle utfordringer i borreliadiagnostikken. Ett problem er at borreliabakterien ikke er til stede i tilstrekkelige mengder i blod eller CSF. Det er derfor viktig med fokus på mulige forbedringer av den diagnostiske sensitiviteten i disse materialene. I blod og CSF bør f.eks. forbehandling som oppkonsentrerer mikroben før preparering av DNA videreutvikles. Det er også mulig at det er kritisk for analysen å undersøke på ferskt pasientmateriale noe som i dag ikke gjøres rutinemessig. Bruk av PCR for å overvåke tidlig behandlingseffekt kan ha begrenset verdi fordi arvemateriale kan være til stede en tid etter at mikroben er død. Dette vil gi falske positive resultater en stund etter at infeksjonen er fjernet. Det er gode mulighet for at PCR-metodens diagnostiske sensitivitet kan økes med mer fokus på optimaliseringsstrategier.

Metoder for påvisning av kroppens immunreaksjon mot *Borrelia*

Kroppens immunapparat er komplisert og består av et primært- og et spesialisert forsvarsverk som skal bekjempe mikroorganismer som forårsaker infeksjon. Det primære forsvarsverk er et medfødt førstelinjeforsvar som tar seg av alle inntrengere generelt. Det spesialiserte forsvarsverk består blant annet av T-celler og B-celler. Disse er hvite blodlegemer, lymfocytter, som kan bli aktivert etter møte med mikrobeantigener de gjenkjenner. Testene som er beskrevet videre er basert på både primær- og spesialisert immunrespons.

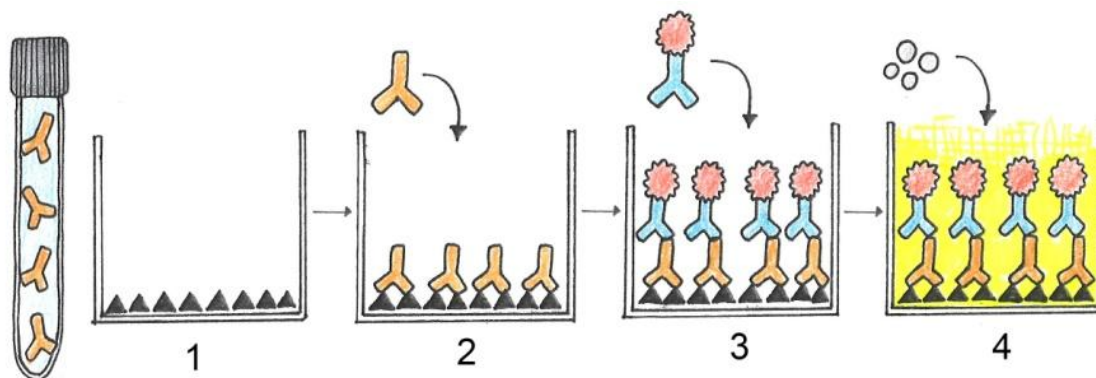
Påvisning av borreliaantistoff

B-cellene er en av flere immunceller som har en viktig rolle i den spesialiserte delen av immunforsvaret. Denne celletypen kan identifisere og feste seg til strukturer på f.eks. proteiner som sitter i overflaten til en sykdomsfremkallende mikrobe. Når dette skjer, vil B-cellene bli aktivert og modnes til plasmaceller. Plasmaceller produserer store mengder antistoffmolekyler. Disse antistoffene er spesifikke og binder den samme type mikrobe som den aktiverte B-cellen. Antistoffene fungerer som markører for immunforsvaret, og en rekke forsvarsmekanismer vil iverksettes for å ødelegge og fjerne organismen som forårsaker infeksjon. Antistoffene dannes vanligvis i løpet av noen uker etter smitte og sykdom. Dette skjer hos alle individer dersom de ikke er behandlet svært tidlig med antibiotika, har medfødte immundefekter eller andre spesielle tilstander. Ved førstegangsinfeksjon produserer kroppen først IgM-antistoffer og etter hvert også IgG-antistoffer. Særlig IgG vil være til stede i blodet i flere år etter infeksjon, kanskje livet ut.

Antistoffpåvisning utføres i serum fra blodprøver. Selv om påvisning av antistoff er en indirekte metode i forhold til påvisning av selve mikroben, er spesifikt antistoff et bevis på at kroppen har vært eller er infisert med mikroben. Analysene som påviser antistoff inneholder deler av bakterieproteiner (antigener) som det er kjent at kroppen danner antistoffer mot ved sykdom. Hvis pasientens blod inneholder antistoffer som binder testens antigener, kan dette synliggjøres med ulike teknikker, og testen vil være positiv.

Enzyme linked immunosorbant assay (ELISA). ELISA er den mest brukte metoden for å påvise borreliaantistoffer (figur 3). Antigenene er festet til små brønner i et plastbrett, og dersom pasientens prøve inneholder borreliaantistoffer vil disse binde seg til antigenene i brønnene. Antistoffene synliggjøres deretter ved at det tilsettes et enzym/substratsystem som gir farge ved positiv test. Prinsippet er det samme for andre typer tester, men systemet for synliggjøring av antistoffbinding er forskjellig. Metodene CLIA (chemiluminescence immunoassay) og ELFA (enzyme linked fluorescence assay) benytter henholdsvis kjemiluminescens og fluorescens for å påvise bundet antistoff. Testene er automatisert og avlesningen skjer maskinelt.

Et ankepunkt mot tidligere brukte *Borrelia* ELISA-tester har vært at testene inneholder forskjellige antigener, og at hver test derfor ikke detekterer alle antistoff. Utviklingen innen feltet har imidlertid vært god, og testene som norske laboratorier benytter i dag inneholder VlsE (variable major protein-like sequence expressed), et overflateantigen som finnes hos alle



Figur 3. ELISA påviser antistoffer fra pasientens blod.

Trinn 1. I en ELISA benyttes serumfraksjonen fra pasientens blodprøve hvor antistoffene befinner seg. Serum skal tilsettes plastikkbrønner hvor antigener (svarte) fra borreliabakterien er festet i bunnen.

Trinn 2. Inneholder pasientens serum antistoffer (orange) som er dannet under en infeksjon med *Borrelia*, så vil disse binde seg til borreliaantigenene i brønner.

Trinn 3. Brønner blir tilsatt ELISA-antistoffer (blå) som vil binde den delen av borreliaantistoffene som ikke binder antigenen i bunnen av brønner. ELISA-antistoffer som ikke binder vaskes vekk.

Trinn 4. ELISA-antistoffene har her koplet til seg enzymer (rød) som gir en fargereaksjon i brønner om brønner blir tilsatt substrat. En positiv prøve vil gi en farget brønn, mens en negativ prøve vil være blank.

kjente humanpatogene borreliaarter. C6 som benyttes som antigen i noen tester er en del av VlsE-komplekset. Testene som inneholder VlsE eller C6 er rapportert å ha diagnostisk sensitivitet på 88,6-98 % i blod ved tidlig LNB og 98,3 % ved BA (27, 28, 29). Ved SSHF benyttes to forskjellige ELISA-tester som begge inneholder VlsE/C6. I rutinediagnostikk brukes den ene testen, mens den andre kun brukes som en tilleggstest. Tabell 2 gir oversikt over ELISA-tester benyttet ved norske mikrobiologiske laboratorier.

Tabell 2. ELISA- tester benyttet i norske mikrobiologiske laboratorier

Test (Produsent/Leverandør)	Påviser		Antall brukere*
	Antigen	Antistoffklasse	
Enzygnost borreliosis/IgM Lyme link VlsE/IgG (Siemens, Marburg, Germany)	Helcelle Ba* PKo + rekombinant VlsE	IgM og IgG	12
RecomWell Borrelia IgM og IgG (Mikrogen, Neuried, Germany/Orion Norsk representant)	Rekombinante antigener IgM: Osp C (Ba,Bg*), P41/internal, VlsE IgG: p100 (Ba), Osp C (Bbss*,Bg), VlsE, P 18(Ba)	IgM og IgG	3
Borrelia burgdorferi IgM og IgG (Liaison/DiaSorin, Saluggia Italy)	Rekombinante antigener IgM: OspC, VlsE IgG: VlsE	IgM og IgG	2
Vidas (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France)		IgM og IgG	2

*Totalt 19 laboratorier

De fleste antistofftester måler både IgM og IgG. Ved infeksjon med *Borrelia* legges det lite vekt på resultatet av IgM bortsett fra ved tidlig infeksjon og hos barn (30, 56). En årsak er at borrelia-IgM kan påvises ved infeksjoner som stimulerer immunceller, f.eks. Epstein Barr-virusinfeksjon (kysseysyke) og cytomegalovirusinfeksjon (31). En annen årsak er at IgM kan være falsk positiv, det vil si at testen kan bli positiv som følge av kryssreaksjon med annet

IgM, f.eks. IgM ved revmatiske sykdommer (32). Det legges derfor størst vekt på påvisning av borrelia-IgG. Ved SSHF angis konsentrasjonen av IgG i serum. Hvis en pasient har symptomer på LB og høyt IgG-nivå i blod, er det sannsynlig at pasienten har pågående infeksjon.

Ved disseminert LB, vil dagens tester påvise borreliaspesifikke antistoffer hos de aller fleste pasienter med symptomvarighet av en viss lengde. De fleste vil ha positiv antistofftest etter 6-8 uker. Ved negativ test og kort sykdomsvarighet anbefales oppfølgingsprøve etter ca. 4 uker.

I Agder har 15-20 % av frisk befolkning (blodgivere) borreliaspesifikke antistoffer i blodet (upublisert materiale). Bruk av borreliaantistofftester på befolkningen i Agder har derfor lav diagnostiske spesifisitet. Hvor stor prosentandel av frisk befolkning som har borreliaantistoff i blodet i pasientens bostedsområde vil innvirke på testens diagnostiske verdi. Når antistoff påvises og diagnostisk spesifisitet ikke er høy, står man i fare for å overdiagnostisere. I slike tilfeller er det kliniske symptomer og andre laboratoriefunn som er avgjørende for diagnosen.

Ved LNB undersøkes det både om det finnes borreliaantistoffer i blod og i CSF.

Sammenlikning av mengden antistoff påvist i disse prøvematerialene gir informasjon om hvorvidt det er en aktiv antistoffproduksjon i sentralnervesystemet, såkalt intratekal produksjon av antistoff. Når antistoffmengden i CSF er signifikant høyere enn i blod, angis dette som positiv antistoffindeks (AI) eller -ratio, noe som indikerer at pasienten har LNB. Ved seks ukers symptomvarighet, vil AI være positiv hos ~100 % av pasienter med LNB (33). Et usikkerhetsmoment er at antistoffene i både blod og CSF kan være til stede også i høye nivåer i mange år etter gjennomgått LNB. For å kunne stille diagnosen pågående LNB, må man derfor sammenholde symptomer, funn i CFS (antall hvite blodlegemer og protein) med resultatene av antistofftestene. Det er viktig å gjøre en totalvurdering nettopp fordi de enkelte diagnosekriterier ikke er tilstrekkelige hver for seg (18).

Western blot (WB). I blottester er bakteriens antigener spredd utover en strips, og antistoff mot de enkelte antigenene fra pasientens serum vil avsettes og synliggjøres som streker der antigenet er plassert (figur 4). Tidligere benyttet man ofte "hjemmelagde" WB, noe som gjorde at resultatene ble sprikende, og

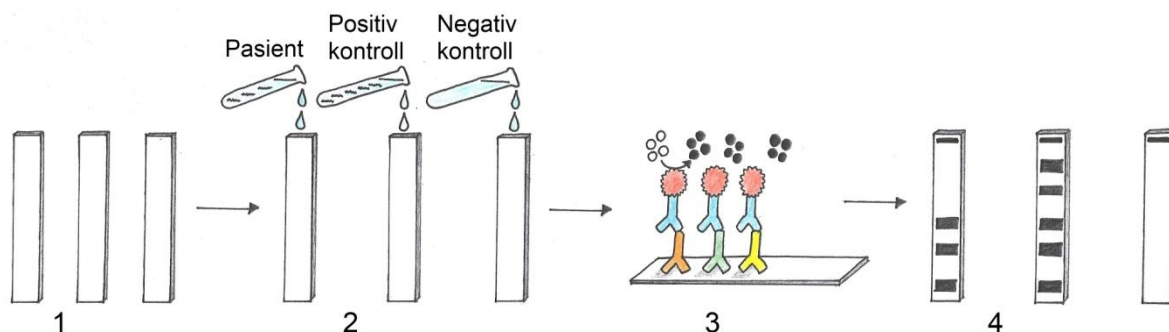
Tabell 3. Immunoblot

Test (Produsent/Leverandør)	Antall brukere**
RecomLine (Mikrogen, Neuried, Germany/Orion Norsk representant)	4
Euroline-RN-AT Blot (Euroimmun, Lübeck, Germany)	2

** Totalt 6 laboratorier

testene var vanskelig å sammenligne. Mangel på standardisering har gjort at eldre litteratur om WB er noe forvirrende. I Norge benyttes i dag kun kommersielle WB-tester (tabell 3).

I Europa og USA har de generelle anbefalingene vært å utføre Western blot i tillegg til primær ELISA-test, såkalt tottrinns testing. Bakgrunnen for dette er at ELISA-testene tidligere hadde mange falske positive funn som kunne korrigeres ved å utføre blottest. Nå er imidlertid situasjonen en annen. Dagens tester er mer spesifikke, og det er sterke holdepunkter for at ELISA-tester som inneholder Vlse/C6-antigen kan benyttes som eneste test (29, 34). Blottestene kan gi noe informasjon om sykdommens varighet. I første



Figur 4. Western blot påviser ulike antistoffer i pasientens serum.

Trim 1. I Western blot er ulike borreliaantigener avsatt som streker på en strips. Disse strekene er ikke synlige.

Trim 2. Serumprøve fra pasienten tilsettes en strips. Her vises også strips for en negativ og en positiv kontroll. Borreliaantistoffer til stede i prøvene vil feste seg til antigenene på stripsen.

Trim 3. Ulike varianter av borreliaantistoffer (oransje, grønne, gule) vil binde ulike borreliaantigener. Påvisning av binding av antistoffer fra pasientprøven gjøres med analyseantistoffer (blå) som er koplet til et enzym/substratsystem (rød/svart) som avgir farge.

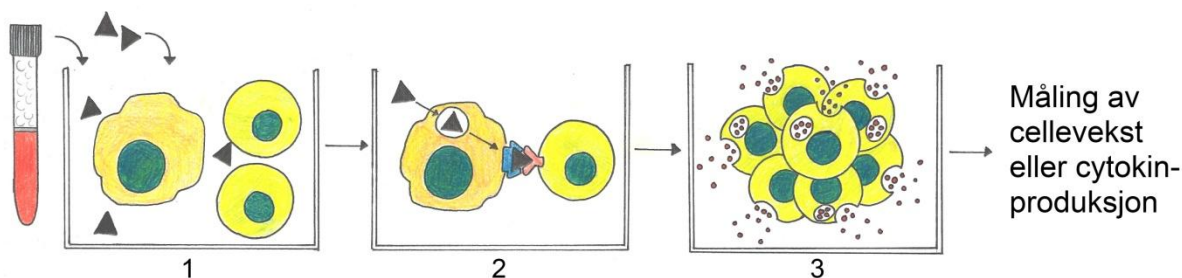
Trim 4. Alle stripsene inneholder et kontrollbånd (øverst) som skal være positivt for at analysen skal være vellykket. Positiv kontroll har påvist alle borreliaantigenene og har synlige bånd i alle posisjonene hvor det er borreliaantigen. En strips for en positiv pasientprøve trenger ikke å ha alle båndene tilstede. I første sykdomsfase påvises færre bånd en senere i sykdomsforløpet.

sykdomsfase påvises få bånd, mens det senere i forløpet påvises flere bånd. Erfaring ved laboratoriet i SSHF viser at blot-IgG hos noen personer er positiv i lenger tid enn ELISA-test etter en borreliainfeksjon. I Norge utføres WB av få laboratorier, og testen brukes kun som et supplement i utredning av spesielle tilfeller.

Påvisning av borreliaspesifikk T-cellerespons – lymfocytt-transformasjonstester

T-celler i det spesialiserte forsvarsverk har unike reseptorer i cellemembranen som kan gjenkjenne og binde antigen fra en mikrobe. Gjenkjennelse av fremmed antigen vil aktivere T-celler som vil begynne å dele seg og øke i antall. Aktiverte antigenspesifikke T-celler vil f.eks. kunne gi hjelp til antistoffproduksjon, utføre celledrap og produserer cytokiner som er viktige signalstoffer i immunforsvaret. Når infeksjonen er fjernet, vil de fleste aktiverte T-celler dø, mens noen få vil gå inn i en hviletilstand som hukommelsesceller. T-celler har et regulert forflytningsmønster i kroppen, slik at de skal være beredt om de møter samme mikroorganisme igjen. Det antas at antigenspesifikke T-celler oppholder seg i blodet i høyt antall kun under en aktiv infeksjon. Det er derfor mulig at borreliaspesifikke T-celler kan påvises i blodet bare ved de tilfeller borreliabakterier finnes i kroppen.

Borreliaspesifikke T-celler kan påvises med lymfocytt-transformasjonstester (LTT) (35, figur 5). Hvite blodlegemer fra pasientens blod blir i slike tester stimulert med borreliaantigen i kultur. En aktivering av T-celler måles ved økning av antall celler (f.eks. memory lymphocyte immunostimulation assay; MELISA) eller ved måling av cytokiner som aktiverte T-celler skiller ut (f.eks. ELISPOT). Det er publisert data med flere varianter av LTT. Testene utføres på svært ulike måter og er lite standardiserte, og dataene har av den grunn ikke gitt entydig informasjon om testenenes diagnostiske nytteverdi. Det er blant annet stor variasjon i hvilke



Figur 5. Lymfocyt transformasjonstest påviser T-celler som gjenkjenner *Borrelia*

Trinn 1. De hvite blodcellene (separert fra de røde blodcellene) fra pasientens blod tilsettes en kulturbrønn hvor det også blir tilsatt borreliaantigener.

Trinn 2. Blant pasientens celler finnes det celler som kan ta opp bakterieantigener og endrer disse slik at de kan binde spesialiserte antigenreseptorer i overflaten av disse cellene. Finnes det T-celler i blodet som er dannet på grunn av en borreliainfeksjon, så vil disse binde celler som presenterer borreliaantigen.

Trinn 3. T-celler som binder reseptorbundet borreliaantigen vil bli aktivert. Aktiverte T-celler begynner å dele seg og skille ut cytokiner.

Det finnes ulike metoder for å påvise en T-cellerespons. Radioaktive isotoper eller andre kjemikalier kan benyttes for å påvise økning i antall celler, mens ELISPOT kan måle antall cytokinproduserende celler.

typer og hvor stor mengde antigen som benyttes. To nyere studier konkluderer med at det er mulig å påvise borreliaindusert T-celleaktivitet i blodet hos pasienter som har fått antibiotika, noe som tolkes som påvisning av behandlingssvikt (36, 37). Selv om testene viser borreliaspesifikk antigenrespons, mangler data som viser at *Borrelia* samtidig finnes i pasientens kropp. I tillegg mangler verifisering i kontrollgrupper for å sikre diagnostisk spesifisitet. Det siste er svært viktig før testene kan tas i bruk. Det er kjent at også andre infeksjoner fører til cytokinproduksjon. Dette vil medføre at man i blodbanen også kan påvise stimulerte T-celler med spesifisitet for andre mikrober enn den som er aktuell (38, 39). Det er mulig at tilstander som autoimmunitet eller allergi kan bidra til at borreliaspesifikke T-celler oppholder seg i blodet uten at pasienten lenger er infisert av *Borrelia*. I tilfeller med spesielt kraftig immunrespons kan det også være at nedreguleringen av antigenspesifikke T-celler er forsinket sammenliknet med en svakere immunrespons. Nedregulering av antigenspesifikke T-celler i blod vil derfor ikke nødvendigvis samsvare med bekjempelsen av bakterien hos alle pasienter. Dette vil ha særlig betydning for metodens verdi ved overvåkning av behandlingsrespons. Disse og flere andre usikkerhetsmomenter ved LTT bør undersøkes videre. Sammenlikninger av studier blir lettere om mer standardiserte testformer benyttes. Det er ikke umulig at LTT kan utvikles slik at det kan bli et nyttig supplement til dagens diagnostikk, men testen vil være mer komplisert å gjennomføre og tolke enn antistoffmåling. Denne testen er i dag ikke anbefalt i europeiske retningslinjer og utføres ikke ved norske laboratorier.

Telling av CD3-/CD57+ lymfocytter (NK-celler) til påvisning av LB

NK-celler i det primære immunforsvaret responderer vanligvis på cytokiner og blir blant annet effektive dreperceller. Alle NK-celler bærer CD56-molekylet i sin overflate, mens bare en undergruppe bærer CD57-molekylet (CD57+). Det finnes også T-celler som er CD57+, men NK-cellene vil i motsetning til T-cellene ikke uttrykke CD3 i cellemembranen. Den

viktigste funksjonen til NK-celler er å fjerne virusinfiserte celler og kreftceller som har nedregulert HLA klasse I-molekyler. Undergruppen av NK-celler som bærer CD57 antas å være stimulert over lengre tid, og det er mulig at cellene er i et sent stadium og er døende (40). Dette understøttes av at antallet CD57+ NK-celler øker hos eldre (41).

Én studie viser at ved bruk av fluorescensmerkede antistoffer og flowcytometri har en gruppe pasienter som skal ha kronisk LB, nedsatt antall av CD57+ NK-celler (42). Samme forskergruppe har i en annen studie overvåket en langtidssyk pasient med LB og vist at antall av CD57+ NK-celler har holdt seg lavt over lengre tid (43). Studiene konkluderer med at unormalt lavt antall CD57+ NK-celler viser at pasienten har en pågående og aktiv LB, og at testen også kan benyttes til å overvåke behandlingseffekt. Sammenhengen mellom lavt CD57+ NK-celletall og levende *Borrelia* i kroppen er tilbakevist av andre (44). Det er ikke publisert flere liknende studier og testens spesifisitet er ikke studert. Det er derfor svært usikkert om denne analysen har noen betydning for diagnostikk av LB. Denne testen er ikke anbefalt i europeiske retningslinjer og utføres ikke ved norske laboratorier.

CXCL13-test

Det finnes flere familier med cytokiner, og en av dem er kjemokiner. Kjemokiner er løselige molekyler som produseres ved ulike infeksjons- og betennelsestilstander av en rekke ulike celletyper. De danner en kjemisk gradient som tiltrekker seg immunceller. CXCL13 er et kjemokin som hovedsakelig tiltrekker seg B-celler og kan påvises i en ELISA.

Det er rapportert at nivået av CXCL13 er forhøyet i CSF hos LNB-pasienter med akutt sykdom (45, 46, 47, 48). Nivået økes før antistoffproduksjon i sentralnervesystemet kan påvises og testens sensitivitet er angitt å være høy. CXCL13-nivået i CSF er derfor en mulig markør for aktiv LNB. En slik markør vil være nyttig for å påvise tidlig infeksjon og for å overvåke behandlingsrespons. Andre og nyere studier viser derimot at CXCL13 i CFS også er assosiert med andre sykdommer som multipel sklerose (49, 50, 51), nevrosyfilis (52), neurologisk asymptomatisk HIV-infeksjon (53) og systemisk lupus erythematosus (54). Selv om de forhøyede CXCL13-nivåene er lavere ved disse sykdommene enn ved LNB, kompliserer det tolkningen av testresultatene noe. Det utelukker allikevel ikke at CXCL13-testen kan være et nyttig supplement til nåværende diagnostikk av LNB.

Testen er foreløpig ikke i rutinebruk i Norge, men den benyttes i andre land i Skandinavia. SSHF ønsker i nærmeste fremtid å benytte CXCL13 i et prosjekt for å evaluere testens diagnostiske betydning og for å vurdere om testen bør tas i bruk i rutinediagnostikk.

Kvalitetssikring i laboratoriet

Hensikten med kvalitetssikring i medisinske laboratorier er å unngå feil i analysevirksomheten. Dette gjelder hele prosessen fra og med prøvetaking, analysering og til

og med svarrapportering. Ved mikrobiologisk avdeling, SSHF er det etablert et omfattende kvalitetssystem som kontinuerlig blir fulgt opp av en kvalitetskoordinator. Høsten 2013 vil Norsk Akkreditering bedømme hvorvidt laboratoriet utfører oppgaver i henhold til de standardene som gjelder nasjonalt og internasjonalt. Dette er det høyeste nivå for sertifisering av analysevirksomhet.

En viktig del av kvalitetssikringen er deltagelse i sammenliknende laboratorieprøving (SLP). Mikrobiologisk avdeling, SSHF deltar i et internasjonalt *Borrelia* SLP program hvor resultatenes riktighet blir vurdert av arrangøren. I 2012 ble det også gjennomført en nasjonal SLP i borreliadiagnostikk, som viste at de mikrobiologiske laboratoriene i Norge benytter anerkjente metoder som gir sammenlignbare analyseresultater.

Bakgrunn for valg av laboratoriemetoder

Forskning danner grunnlaget for forbedringer innen alle områder innenfor medisinske fag, også innenfor mikrobiologisk diagnostikk. Det kreves flere metodologisk gode studier for at en testmetode skal være godt nok dokumentert for bruk i medisinske laboratorier. Funn fra små studier med dårlig definert pasientmateriale uten gode kontrollgrupper har begrenset verdi og kan ikke overføres til andre pasientpopulasjoner. Det er et grunnleggende krav at forskning skal være kontrollert og etterprøvable. Det skal være oppgitt detaljert og presis informasjon for andre, slik at funnene kan bekreftes eller tilbakevises. Slike krav gir en nødvendig kvalitetssikring for å redusere mulighetene for innføring av diagnostikk uten helsemessig nytteverdig.

Kriterier for diagnostisering av LB i Europa og USA bygger på grundig gjennomgang og vurdering av tilgjengelige publikasjoner. Dette arbeidet utføres av store organisasjoner som har medlemmer med helsefaglig erfaring og ekspertise innenfor fagområdet (55, 56, 57, 58, 59, 60). På tross av ulik forekomst av borreliatyper og ulik fordeling av forskjellige typer disseminert sykdom, har det vist seg at hovedretningslinjene fra USA også kan følges i Europa. Laboratoriene i Norge følger internasjonale retningslinjer (55, 62, 63). Det ble i 2011 arrangert nasjonalt strategimøte i borreliadiagnostikk i regi av Folkehelseinstituttet. De fleste av landets laboratorier var representert. I slike møter er det grundig gjennomgang av aktuell diagnostikk og det blir også vurdert muligheten og behovet for ny tester (64).

Noen laboratorier i utlandet tilbyr tester som ikke har fått gjennomslag i dagens internasjonale retningslinjer. Dette gjelder blant annet cystediagnostikk, mikroskopi, antigen i urin og leddvæske, LTT og CD57-telling (60, 65). Betydningen av de fleste av disse testene er ikke godt nok dokumentert, og tolkningen av resultatene er ikke standardisert slik at pasientene i mange tilfeller ender opp med usikre prøvesvar (66). Dette fører til stor fare for feiltolkning og overdiagnostisering av LB. Slik overdiagnostisering er lite ønskelig og kan blant annet øke risikoen for feilbehandling og at andre alvorlige årsaker til sykdom blir oversett.

Diagnostiske utfordringer ved langvarige sykdomsplager

Det er kjent at disseminert LB kan gi langvarige plager selv etter at pasientene har fått antibiotikabehandling. Ved gjennomgått, antibiotikabehandlet LNB er det vist at 36 % av pasienter med LNB etter 30 måneder fremdeles hadde nevrologiske symptomer og/eller kognitiv svikt. Alvorlig sykdom og sen oppstart av behandling øker risikoen for å få langtidsplager (67, 68). Generelt er det grunn til å tro at plager etter antibiotikabehandlet LB skyldes skader av vevet på grunn av gjennomgått infeksjon, og i mange tilfeller vil plagene gradvis bedres over tid. I andre tilfeller vil nye episoder med symptomer være forårsaket av ny infeksjon (69, 70). Borreliaantistoffer gir ikke immunitet mot senere sykdom. I flere tilfeller der man har mistenkt at nye symptomer skyldes oppblussing av tidligere utilstrekkelig behandlet infeksjon, er mistanken avvist fordi den nye infeksjonen er forårsaket av borrelia-subtyper som er genetisk forskjellig fra de som forårsaket førstegangssykdom. Vedvarende alvorlige plager etter behandling skaper behov for diagnostisk bekreftelse eller avkreftelse av om borrelia-infeksjonen er bekjempet (71, 72, 73, 74).

Oppsummering

Diagnostikk av LB byr på mange utfordringer. Metodene som brukes i norske mikrobiologiske laboratorier har sine begrensinger, men bygger på godt dokumentert vitenskap. De er i tråd med internasjonale evidensbaserte anbefalinger og bidrar sammen med erfaring i klinisk diagnostikk til at man som oftest kommer i mål med korrekt diagnose og effektiv behandling. Det er imidlertid stort behov for å etablere metoder for påvisning av aktiv infeksjon.

Litteratur

1. Kjelland V, Stuen S, Skarpaas T, Slettan A. Prevalence and genotypes of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in *Ixodes ricinus* ticks in southern Norway. *Scand J Infect Dis* 2010; 42: 579-85.
2. Soleng A, Kjelland V. *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in Brønnøysund in northern Norway. *Tics tick Borne Dis* 2013; 4: 218-21.
3. Oschmann P, Kraiczy P, Halperin J et al. Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis. Side 52. UNI-MED Verlag, 1999.
4. Fryland L, Wilhelmsson P, Lindgren PE et al. Low risk of developing *Borrelia burgdorferi* infection in the south-east of Sweden after being bitten by a *Borrelia burgdorferi* infected tick. *Int J Infect Dis* 2011; 15:174-81.
5. Luft B, Steinman CR, Neimark Hc et al. Invasion of the central nervous system by *Borrelia burgdorferi* in acute disseminated infection. *JAMA* 1992; 267: 1364-7.
6. NevroNel. Søk på NevroNel. NEL-Sykdommer- nevroborreliose.

7. Kristiansen BE, Grude N, Tveten Y, Emmert A. Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2009; 129: 2132-4.
8. De Koning J, Bosma RB, Hoogkamp-Korstanje JA. Demonstration of spirochaetes in patients with Lyme disease with a modified silver stain. *J Med Microbiol* 1987; 23: 261-7.
9. Mysterud I, Laane MM. A simple method for the detection of live *Borrelia* spirochaetes in human blood using classical microscopy techniques. *Biological and Biochemical Reports* 2013; 3: 15-28.
10. van Dam AP, Kuiper H, Vos K et al. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis*. 1993;17: 708-17.
11. Berger BW, Johnson RC, Kodner C, Coleman L. Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from erythema migrans lesions and perilesional skin. *J Clin Microbiol*. 1992; 30: 359-61.
12. Wormser GP, Bittker S, Cooper D, et al. Comparison of the yields of blood cultures using serum or plasma from patients with early Lyme disease. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1648-50.
13. Wormser GP, Bittker S, Cooper D, et al. Yield of large-volume blood cultures in patients with early Lyme disease. *J infect Dis* 2001;184: 1070-2.
14. Marques AR, Stock F. Evaluation of a new culture medium for *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4239-41.
15. Nadelman RB, Pavia CS, Magnarelli LA, Wormser GP. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from the blood of seven patients with Lyme disease. *Am J Med*. 1990; 88: 21-6.
16. Sapi E, Pabatti N, Datar A, Davies EM et al. Improved culture condition for the growth and detection of *Borrelia* from human serum. *Int J Med Sci* 2013; 10: 362-76.
17. Johnson BJB, Pilgard MA, Russell TM. Assessment of new culture method to detect *Borrelia* species in serum of Lyme disease patients. *J Clin Microbiol* Published online ahead of print Aug 2013.
18. Strle F, Ruzic-Sabljić E, Cimperman J et al. Comparison of findings for patients with *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* isolated from cerebrospinal fluid. *CID* 2006; 43: 704-10.
19. Rijpkema SG, Tazelaar DJ, Molkenboer MJ et al. *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3:109-16.
20. Steere AC, Sikand VK, Meurice F et al. Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 209-15.
21. Wilske B. Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis. *Ann Med* 2005; 37:568-79.
22. Hansen IJW, Noraas S, Skarpaas T et al. Lyme arthritis in southern Norway – an endemic area of borreliosis. *EULAR* 2012; Poster 2685.
23. Goodman JL, Bradley JF, Ross AE, et al. Bloodstream invasion in early Lyme disease: results from a prospective, controlled, blinded study using the polymerase chain reaction. *Am J Med* 1995; 99:6-12.

24. Nocton JJ, Bloom BJ, Rutledge BJ et al. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid in Lyme neuroborreliosis. *J Infect Dis* 1996; 174: 623-7.
25. Lebech AM, Hansen K, Brandrup F et al. 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.
26. Aguero-Rosenfeld ME. Lyme Disease Laboratory Issues. *Infect Dis Clin N Am* 2008; 22: 301-13.
27. Skarpaas T, Ljostad U, Sobyte M, Mygland A. 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.
28. Tjernberg I, Schön T, Ernerudh J et al. C6 peptide serology as diagnostic tool in neuroborreliosis. *APMIS* 2008; 116: 393-9.
29. Wormser GP, Schriefer M, Aguero-Rosenfeld ME et al. Single-tier testing with the C6 peptide ELISA kit compared with two-tier testing for Lyme disease. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 75: 9-15.
30. Dessau R, Brangsborg JM, Ejlersen T et al. Utilization of serology for the diagnosis of suspected Lyme borreliosis in Denmark: Survey of patients seen in general practice. *BMC Infectious Diseases* 2010, 10: 317.
31. Goossens HAT, Nohlmans MKE, van den Bogaard AE. Epstein Barr virus and cytomegalovirus cause false-positive results in IgM two-test protocol for early Lyme borreliosis. *Infection* 1999; 27: 31.
32. Goossens HAT, van den Bogaard AE, Nohlmans MKE. Reduced specificity of combined IgM and IgG Enzyme immuno assay testing for Lyme borreliosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 400-2.
33. Ljøstad U, Skarpaas T, Mygland Å. Clinical usefulness of intrathecal antibody testing in acute Lyme neuroborreliosis . *Eur J Neurol* 2007; 14: 873-6.
34. Branda JA, Lindskey K, Yeowon A 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.
35. Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of Lyme borreliosis. Review. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 484-509.
36. Valentin-Thon E, Ilseman K, Sandkamp M. A novel lymphocyte transformation test (LTT-MELISA) for Lyme borreliosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57:27-34.
37. Von Baehr V, Doebis C, Volk HD, von Baehr R. The lymphocyte transformation test for borrelia detects active Lyme borreliosis and verifies effective antibiotic treatment. *Open Neurol J* 2012; 6:104-12.
38. Boyman O. Bystander activation of CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 2010; 40:936-9.
39. Di Genova G, Savelyeva N, Suchacki A. Bystander stimulation of activated CD4+ T cells of unrelated specificity following a booster vaccination with tetanus toxoid. *Eur J Immunol* 2010; 40: 976-85.
40. Lopez Verges S, Milush JM, Pandey S et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK subset. *Blood* 2010; 116: 3865-74.

41. Gayoso I, Sanchez-Correa B, Campos C et al. Immunosenescence of human natural killer cells. *J Innate Immun* 2011; 3:337-43.
42. Stricker RB, Winger EE. Decreased CD57 lymphocyte subset in patients with chronic Lyme disease. *Immunol Lett* 2001; 76: 43-8.
43. Stricker RB, Burrascano J, Winger E. Longterm decrease in the CD57 lymphocyte subset in a patient with chronic Lyme disease. *Ann Agric Environ Med* 2002; 9:111-13.
44. Marques A, Brown MR, Fleisher TA: Natural killer cell counts are not different between patients with post-Lyme disease syndrome and controls. *Clin Vaccine Immunol* 2009, 16:1249–1250.
45. Rupprecht TA, Plate A, Adam M et al. The chemokine CXCL13 is a key regulator of B cell recruitment to the cerebrospinal fluid in acute Lyme neuroborreliosis. *J Neuroinflammation* 2009; 6: 42.
46. Ljøstad U, Mygland A. CSF B-lymphocyte chemoattractant (CXCL13) in the early diagnosis of acute Lyme neuroborreliosis. *Neurology* 2011; 76: 1051-8.
47. Schmidt C, Angele B, Pfister HW et al.,. A prospective study on the role of CXCL13 in Lyme neuroborreliosis. *Neurology* 2011; 76:1051-8.
48. van Burgel ND, Bakels F, Kroes AC, van Dam AP. Discriminating Lyme neuroborreliosis from other neuroinflammatory diseases by levels of CXCL13 in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2027-30.
49. Sellebjerg F, Börnsen L, Khademi M et al. Increased cerebrospinal fluid concentrations of the chemokine CXCL13 in active MS. *Neurology* 2009; 73: 2003-10.
50. Khademi M, Kockum I, Andersson ML et al. Cerebrospinal fluid CXCL13 in multiple sclerosis: a suggestive prognostic marker for the disease course. *Mult Scler* 2011;17: 335-43.
51. Kowarik MC, Cepok S, Sellner J et al. CXCL13 is the major determinant for B cell recruitment to the CSF during neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 2012; 9:93.
52. Marra CM, Tantalo LC, Sahi SK et al. CXCL13 as a cerebrospinal fluid marker for neurosyphilis in HIV-infected patients with syphilis. *Sex Transm Dis* 2010; 37: 283-7.
53. Bremell D, Mattsson N, Edsbacke M et al. Cerebrospinal fluid CXCL13 in Lyme neuroborreliosis and asymptomatic HIV infection. *BMC Neurol.* 2013;13:2.
54. Schiffer L, Kümpers P, Davalos-Misslitz AM et al. B-cell-attracting chemokine CXCL13 as a marker of disease activity and renal involvement in systemic lupus erythematosus (SLE). *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 3708-12.
55. Stanek G, Fingerle V, Hunfeld et al. Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin Microbiol and Infect* 2011; 17: 69-79.
56. Mygland Å, Ljøstad U, Fingerle V et al. EFNS guidelines on diagnosis and management of European Lyme Neuroborreliosis. *Eur J Neurol* 2010; 17: 8-16.
57. Wormser GP, Dattwyler RJ, Shapiro ED et al. The Assessment, treatment and prevention of Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis and babesiosis. Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *CID* 2006; 43: 1089-134.

58. Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. *Lancet* 2012; 379(9814): 461-73. Epub 2011. Review.
59. www.Eucalb.com
60. www.CDC.gov.
61. www.helsedirektoratet.no. Diagnostikk og behandling av Lyme borreliose 2009.
62. www.fhi.no. Årsrapport. Flått og flåttbårne sykdommer.
63. Tveitnes D, Hjetland R, Øymar K. Interpretation of serological tests. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2013;133: 826.
64. Grude N, Tveten Y, Stutzer A et al. Laboratoriediagnostikk ved borreliose. Strategirapport Folkehelseinstituttet, 2011.
65. Notice to readers: caution regarding testing for Lyme disease. *MMWR, CDC Surveillance Summary*, 2005, 54:125.
66. Halperin JJ, Baker P, Wormser GP. Common misconceptions about Lyme disease. *Am J Med* 2013; 126: 264. e1-7.
67. Eikeland R, Ljøstad U, Mygland Å et al. European neuroborreliosis: Neuropsychological findings 30 months after treatment. *Eur J Neurol* 2012; 19: 480-7.
68. Eikeland R, Mygland Å, Herlofsen K, Ljøstad U. Risk factors for a non-favorable outcome after treated European Neuroborreliosis. *Acta Neurol Scand* 2013; 127: 154.
69. Nadelmann RB, Hanincová K, Mukherjee P et al. Differentiation of reinfection from relapse in recurrent Lyme disease. *N Engl J Med* 2012; 367: 1883-90
70. Steere A. Reinfection versus relapse in Lyme disease. Editorial. *N Engl J Med* 2012; 367: 1950-51.
71. Seidel MF, Domene AB, Vetter H. Differential diagnoses of suspected Lyme borreliosis or post-Lyme-disease syndrome. *Eur J Microbiol Infect Dis* 2007; 26: 611-17.
72. Djukic M, Schmidt-Samoa C, Nau R et al. The diagnostic spectrum in patients with suspected chronic Lyme neuroborreliosis – the experience from one year of a hospital's Lyme neuroborreliosis outpatients clinic. *Eur J Neurol* 2011; 18: 547-55.
73. Ljøstad U, Mygland Å. The phenomenon of “chronic Lyme”; an observational study. *Eur J Neurol* 2012; 19: 1128-35.
74. Ljøstad U, Mygland Å. Chronic Lyme: Diagnostic and therapeutic challenges. *Acta Neurol Scand Suppl* 2013; 196: 38-47.