

Falskt positivt serologisk prøvesvar ved mistenkt borreliose

Dei kliniske teikn og symptom ved borreliose viser stor variasjon, og laboratorieundersøkingar har derfor ein sentral plass i diagnostikken. Testar for å måle antistoff mot *Borrelia burgdorferi* har manglar både med omsyn til sensitivitet og til spesifisitet. I artikkelen vert det gjort greie for ein del vanlege fallgruver ved tolking av serologiske resultat, med spesielt omsyn til diagnostisk falskt positive prøvesvar. Nærare 1,5% av befolkninga har naturleg førekommande IgM-antistoff mot bakterien sitt p41-flagellprotein. Desse antistoffa kan gi falskt positivt prøvesvar. Ved å nytte ein immunblot-teknikk med rekombinant framstilte antigen fekk vi ei serologisk avklaring i fire av fem tilfelle ved mistanke om diagnostisk falskt positive prøvesvar. Overdiagnostikk av sjukdomen borreliose kan føre til at underliggjande patofysiologi vert oversett, og til at pasientar vert over- og feilbehandla.

Smitte med *Borrelia burgdorferi*, ein bakterie som kan overførast etter flåttbit, kan føre til eit mangearta sjukdomsbilete (1). Konvensjonell bakteriedyrking og testar for påvising av bakterielle antigen og nukleinsyrer er ikkje i vanleg bruk, mellom anna på grunn av store krav til preanalytisk handtering av prøvene og lav diagnostisk sensitivitet av testane. Serologi er framleis det beste diagnostiske hjelpemiddelet ein har, og vert derfor nytta for å avklare status ved mistenkt borreliose. Dette er ein god praksis, men kan i nokre tilfelle få uheldige konsekvensar dersom rekvirenten tillet testresultatet å få sjølvstendig liv og dermed overta styringa over den vidare pasienthandteringa (2). Ein risikerer då at underliggjande patofysiologi vert oversett og at pasienten vert over- og feilbehandla. Kjennskap til korleis prøvesvar kan feiltolkast er derfor nødvendig, særleg sidan laboratoria ikkje har gode testar til å avklare mange tvilsamme serologiske resultat.

Immunresponsen mot *B burgdorferi* kan være svak og ofte ikkje målbar etter overflatiske hudinfeksjonar, medan ein ved meir alvorleg systemisk infeksjon oftast får ein god immunrespons. Det vert derfor med rette å tvivle på falskt negative prøveresultat ved serodiagnostikk, særleg i tidleg sjukdomsfase (3). At også diagnostisk falskt positive prøveresultat kan være eit stort problem innan borreliaserologien, har vore mindre omtalt.

Elling Ulvestad
elling.ulvestad@haukeland.no

Einar K. Kristoffersen
Avdeling for mikrobiologi og immunologi,
Gades Institutt
Haukeland Sykehus
5021 Bergen

Serologiske mønster ved undersøking for mistenkt borreliose

Serologiske testar for påvising av antistoff mot *B burgdorferi* er laga for best mogeleg å oppdage infeksjon hos pasientar med borreliose (høg sensitivitet) og for å utelukke infeksjon hos friske (høg spesifisitet). For å auke spesifisiteten i borreliaserologien samstundes med at sensitiviteten vert bevart har DAKO (Glostrup, Danmark) utvikla ein test basert på ELISA-prinsippet der antistoffreaksjonen mot bakterien sitt p41-flagellantigen vert målt. Dette er den vanlegaste testen i bruk ved dei norske mikrobiologiske laboratoria (4). Dei andre testane som vert brukt i Noreg, målar antistoff mot ei blanding av fleire ulike antigen frå *B burgdorferi*. Sidan p41-flagellantigenet er ein viktig ingrediens også i andre testar, vil resonnementa som fylgjer i stor grad kunne generaliserast til å gjelde tolking av all serologi for påvising av infeksjon med *B burgdorferi* (5).

Dei serologiske manifestasjonane ein finn hos pasientar med borreliose, er godt undersøkt og kan i hovudsak delast i fire ulike mønster (tab 1):

- Antistoff ikkje påvist
- Påvising fyrst av IgM- og deretter IgG-antistoff
- Påvising berre av IgG-antistoff
- Påvising berre av IgM-antistoff

Det fyrste mønsteret finn ein i hovudsak hos pasientar med hudmanifestasjonar, men også i nokre tilfelle av systemisk sjukdom. Sidan det kan ta frå seks til åtte veker før pasientar utviklar antistoff, kan det derfor være nødvendig å gjenta undersøkinga for å finne ut om konsentrasjonen av antistoff har endra seg.

Det andre mønsteret er den vanlegaste manifestasjonen hos pasientar med borreliose, men nokre gongar er IgM- eller IgG-responsen så svak at det ikkje kan påvisast spesifikke antistoff. I tillegg er det nokre pasientar med aktuell borreliose som ikkje produserer anti-p41 IgM-antistoff sjølv om dei produserer antistoff mot andre antigen på *B*

burgdorferi. Ein risikerer derfor diagnostisk falskt negative prøveresultat dersom ein brukar testar som berre kan påvise anti-p41 IgM-antistoff.

Det tredje mønsteret kan ein finne ved primærinfeksjon, men det kan også påvisast ved gamal infeksjon. Det kan være vanskeleg å avgjere om påvist IgG retta mot *B burgdorferi* representerer eit positivt prøvesvar som talar for at pasienten har aktuell infeksjon, eller om prøvesvaret representerer eit minne frå ein gamal infeksjon og dermed er diagnostisk falskt positivt med omsyn til aktuell infeksjon. Dersom det vert påvist endra konsentrasjon av IgG i ny prøve teken etter eit par veker, tyder dette på aktuell infeksjon, medan stabil IgG-konsentrasjon tyder på uaktuell infeksjon. Det er også mogeleg at måling av IgG-aviditet, som framleis ikkje er vanleg å utføre i dei diagnostiske laboratoria, kan vise seg å vere nyttig for å avklare enkelte kompliserte diagnostiske tilfelle (6).

Også ved det fjerde reaksjonsmønsteret står ein framfor problemet med å skilje falskt positive frå reelt positive prøvesvar. Etter den klassiske immunologiske tolkinga tyder påvising av IgM-, men ikkje av IgG-antistoff på at pasienten har ein infeksjon i tidleg fase og at behandling derfor er indisert (fig 1). Denne konklusjonen kan være rett, særleg dersom ein før testing held det som sannsynleg at pasienten har borreliose og i tillegg at prevalensen av borreliose er høg i den geografiske regionen pasienten kjem frå. Dersom pasienten har borreliose, vil ein i løpet av eit par veker vente å finne auka antistoffkonsentrasjon og overgang frå IgM- til IgG-antistoff. Ofte finn ein derimot at prøver tatt med fleire månaders mellomrom framviser stabil konsentrasjon av IgM-antistoff og inga utvikling av IgG-antistoff. Ei forklaring kan då vere at antibiotikabehandling tidleg i sjukdomsutviklinga reduserer antigenmengda, noko som igjen fører til at IgG-produksjonen vert for lav til å gi positivt utslag i dei diagnostiske testane.

Denne forklaringa viser seg i svært mange tilfelle ikkje å vere den rette. Det fjerde reaksjonsmønsteret, som ikkje er eit uvanleg mønster, kan også påvisast også hos pasientar som ikkje har borreliose og som ikkje har fått antibiotikabehandling. For alle som nyttar serologisk diagnostikk kan det derfor vere nyttig å kjenne til minst to alternative forklaringar på fenomenet vedvarande IgM-positivitet. Begge forklaringane konkluderer med at prøveresultatet er falskt positivt med omsyn til borreliose. Ein lyt kjenne til alternativna for å unngå å tolke eit laboratorieresultat som uttrykk for sjukdom.

Naturleg førekommande antistoff som årsak til falskt positivt prøvesvar

Den mest nærliggjande alternative forklaringa på IgM-antistoffa er at pasienten har hatt ein infeksjon med ein mikrobe med nærst antigent slektskap til B burgdorferi, til dømes *Treponema pallidum* (7), og at antistoffa som dannar seg mot denne mikroben, kryssreagerar med B burgdorferi. Vi har funne at anti-p41 IgM-antistoffa ikkje reagerer med *T. pallidum*, noko som kan tyde på at antistoffa ikkje er uttrykk for ein slik kryssreaktiv respons mot denne bakterien (5). Vi kan likevel ikkje utelukke at andre mikroorganismar kan indusere anti-p41 IgM-antistoff, men vi finn det då vanskeleg å forklare at pasientane ikkje dannar anti-p41 IgG-antistoff.

Ei anna forklaring på anti-p41 IgM-antistoffa er at dei representerer naturleg førekommande antistoff. Dette er antistoff som immunsystemet produserer uavhengig av antigen stimulus, og som B-cellene startar å produsere alt i fosterlivet. Sannsynlegvis er naturlege antistoff foredla gjennom evolusjonen som eit ledd i fyrsteforsvaret vårt mot framande mikrober (8). Ved naturleg førekommande antistoff mot eit antigen forventar ein ikkje å finne IgG-antistoff.

For å teste hypotesen om at anti-p41 IgM-antistoffa mot B burgdorferi er naturleg førekommande undersøkte vi nyleg sera frå pasientar med og utan mistenkt borreliose, og frå blodgjevarar og nyfødde (5). Vi fann at dei fleste pasientar med gjentekne positive testar for IgM-antistoff mot B burgdorferi og som ikkje utvikla IgG-antistoff hadde diagnostisk falskt positivt testresultat. Antistoff av IgM-, men ikkje IgG-klasse fann vi hos blodgjevarar frå Tromsø og frå Bergen samt i navlestrengsblod. Vi konkluderte med at opp mot 1,5% av den friske befolkninga har naturleg førekommande antistoff av IgM-klasse mot B burgdorferi. Ikkje uventa fann vi også anti-p41 IgM-antistoff i sera frå pasientar med mononukleose. Som kjent infiserer Epstein-Barr-virus B-cellene, noko som fører til B-celleaktivering og polyklonal auka produksjon av mellom anna naturleg førekommande antistoff. Dei naturleg førekommande antistoffa evnar å immobilisere B burgdorferi in vitro, noko som tyder på at antistoffa er funksjonelt aktive. Dette kan tyde på at personar med naturleg førekommande IgM-antistoff har eit betre fyrstelinjeforsvar mot infeksjon med B burgdorferi enn dei som manglar slike antistoff. Vi får då den paradoksale konklusjonen at påvising av IgM-antistoff mot B burgdorferi hos desse personane ikkje tyder på aktuell infeksjon, men tvert imot kan tyde på at personane har naturleg immunitet mot B burgdorferi!

For å gjere vurderingane ekstra kompliserte fann vi, til like med Eldøen og medarbeidarar (1), også positiv IgM- og negativ IgG-serologi hos nokre pasientar med sikker borreliose som hadde fått antibiotika. Både Hofstad og medarbeidarar (9) og Eldøen og medarbeidarar (1) har vist kor viktig det er at

Tabell 1 Ulike serologiske mønster og deira tolking

Serologisk mønster	Tolkingar
Antistoff ikkje påvist	Pasienten har ikkje borreliose Tidleg fase av infeksjon
Påvising fyrst av IgM- og deretter IgG-antistoff	Aktuell infeksjon
Berre IgG-antistoff	Aktuell infeksjon ¹ Gamal uaktuell infeksjon
Berre IgM-antistoff	Aktuell infeksjon ¹ Kryssreagerande antistoff Naturleg førekommande antistoff

¹Særleg dersom det kan påvisast endra konsentrasjon av antistoff etter eit par veker

ein ved mistanke om nevroborreliose også undersøker spinalvæske, der konsentrasjonen av IgG-antistoff kan vere høgare enn i serum.

Differensiering av IgM-antistoff mot B burgdorferi

I eit forsøk på å skilje mellom naturleg førekommande IgM-antistoff og IgM-antistoff relatert til infeksjon har vi tidlegare brukt

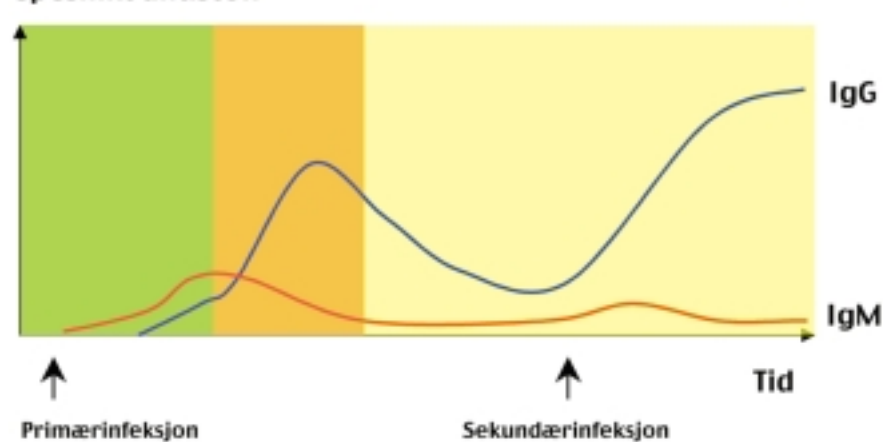
både eigenproduserte og kommersielle Western blot-testar. I USA tilrådde Centers for Disease Control and Prevention (CDC) at immunblot vart gjort på alle prøver som var positive eller tvilsamt positive i ELISA, men grunna uavklart nytteverdi har denne anbefalinga seinare blitt modifisert (10). Eit problem med Western blot basert på ekstrakt av heile bakteriar er at resultatane ofte er vage og dermed ikkje kan bidra til ei serologisk avklaring av dei diagnostiske problema, særleg dersom ein ynskjer å stadfeste diagnosen borreliose (5, 11).

I vel eitt år har vi nytta ein immunblotteknikk basert på rekombinant framstilte B burgdorferi-antigen (Mikrogen, Martinsried, Tyskland) for å differensiere mellom naturleg førekommande IgM-antistoff og infeksjonsrelaterte IgM-antistoff. Denne testen tillet differensiering av antistoffsvaret ved å undersøke semikvantitativt for IgM- eller IgG-antistoff. Immunblotteknikken gir klare utslag og er lettare å tolke enn konvensjonell Western blot. I dei fleste tilfelle der pasienten har naturleg førekommande antistoff, finn vi berre eitt positivt band, medan pasientar med aktuell infeksjon som regel viser reaksjon mot fleire band (fig 2). Det er framleis uklart kor god testen er til å konfirmere diagnosen borreliose, men testen har gitt ei serologisk avklaring i fire av fem tilfelle ved mistanke om diagnostisk falskt positive anti-p41 IgM-prøvesvar.

Konklusjon

Påvising av anti-p41 IgM-antistoff i serum utan utvikling av anti-p41 IgG-antistoff kan

Konsentrasjon av spesifikt antistoff



Figur 1 Ved infeksjon er det vanleg at pasienten fyrst utviklar IgM- og deretter IgG-antistoff mot infeksjose agensar. Ein konkluderer derfor ofte med at påvist IgM-antistoff mot ein mikrobe (grøn fase) tyder på aktuell infeksjon i tidleg fase. Dersom ein påviser både IgM- og IgG-antistoff mot agens (oransje fase), vert dette utlagt som at infeksjonen har vart minst to veker, kanskje lenger. Ved påvising av IgG, men ikkje IgM mot agens (gul fase) kan dette vere teikn på at infeksjonen har vart over lengre tid, at pasienten sitt immunsystem har fjerna den infeksjose agensen og at det vi påviser er eit minne om at pasienten ein gong tidlegare har hatt ein infeksjon, eller at pasienten har fått ein ny infeksjon. Det kan vere vanskeleg å avgjere om pasientar med berre IgG-antistoff har ei diagnostisk reelt positiv prøve (aktuell infeksjon) eller ei diagnostisk falskt positiv prøve (gamal infeksjon). I slike tilfelle vil ny prøve etter 2–3 veker ofte vere nødvendig for å vurdere endring av antistoffkonsentrasjon og -reaktivitet

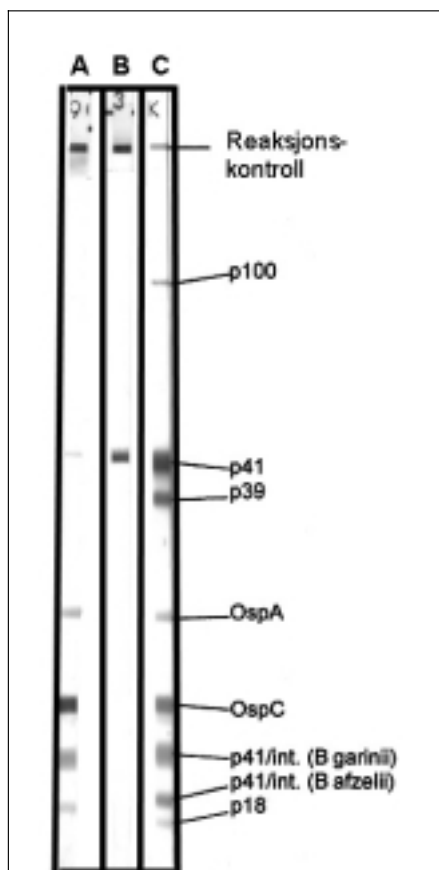
altså ha tre tydingar: Anten at pasienten har aktuell infeksjon, at antistoffa er naturleg førekommande og dermed uttrykker moglege naturleg immunitet mot *B burgdorferi* eller at antistoffa er kryssreagerande antistoff mot andre mikrobar. Det kan vere vanskeleg å tolke eit slikt prøvesvar, og for å unngå over- og feildiagnostisering av borreliose bør serologiske testar berre nyttast til å stadfeste eller eventuelt avkrefte ein klinisk basert diagnostisk hypotese, ikkje til å stille diagnosen borreliose.

Ved vårt laboratorium undersøker vi med immunoblot når anti-p41 IgM er positiv for andre gong og anti-p41 IgG framleis er negativ, når anti-p41 IgM-ELISA er negativ, men rekvirenten har sterk mistanke om infeksjon, eller når konsentrasjonen av anti-p41 IgM er høg. Sidan resultatata frå testane ikkje let seg tolke utan å ta med kliniske symptom, er det ved serologisk diagnostikk av mistenkt borreliose svært viktig med god kommunikasjon mellom klinikar og laboratorielege. I tillegg er det viktig at klinikaren set testresultatet inn i ein samanheng med dei kliniske manifestasjonane og med sjukdomsprevalensen i det geografiske området pasienten kjem frå før behandling vert vurdert (10, 12).

Ein lyt vere svært varsam når ein tolkar serologiske resultat, og det å behandle ein pasient med tvilsame kliniske funn berre på grunnlag av positiv IgM-serologi er ikkje tilrådeleg. Dersom ein likevel behandlar og pasienten ikkje blir betre, får behandlaren fort eit forklåringsproblem. Har pasienten då ein behandlingsresistent borreliose – korleis skal legen eventuelt få verifisert eller avkrefte denne hypotesen? Eller skal ein søke alternative ikkje-borrelia relaterte forklåringar på symptoma – korleis forklarar legen då til pasienten at han likevel ikkje hadde borreliose?

Litteratur

1. Jentum PA, Mehl R, Hasseltvedt V, Bjark P. Lyme-borreliose. Tidsskr Nor Lægeforen 1994; 114: 1968–73.
2. Ulvestad E. Feilbruk av diagnostiske laboratorietester – et beslutningsanalytisk perspektiv. Tidsskr Nor Lægeforen 2000; 120: 2294–8.
3. Eldøen G, Vik ISS, Vik E, Midgard R. Lyme-nevroboreliose i Møre og Romsdal. Tidsskr Nor Lægeforen 2001; 121: 2008–11.
4. Hoddevik GM, Jenum PA. Metodekatalog. Diagnostiske rutinetester i virologi og bakteriologisk serologi ved medisinske laboratorier. Oslo: Statens institutt for folkehelse, 1999.
5. Ulvestad E, Kanestrøm A, Sønsteby LJ, Jureen R, Omland T, Edvardsen B et al. Diagnostic and biological significance of anti-p41 IgM antibodies against *Borrelia burgdorferi*. Scand J Immunol 2001; 53: 416–21.
6. Guerineau AL, Dhote R, Christiann F, Rayet P, Assou MV. Differentiation between early and late complicated Lyme borreliosis by specific IgG avidity. Lancet 1999; 354: 1096–7.
7. Coleman JL, Benach JL. Identification and characterization of an endoflagellar antigen of *Borrelia burgdorferi*. J Clin Invest 1989; 84: 322–30.
8. Boes M, Prodeus AP, Schmidt T, Carroll MC,



Figur 2 Immunoblot som viser IgM-reaktivitet mot rekombinant framstilte antigen frå *B burgdorferi*. Antigena er immobilisert på ein teststrimmel. Ved infeksjonar dannar verten oftast antistoff mot fleire ulike antigen. Strimmel A viser mønsteret hos ei 54 år gamal kvinne som vart bitt av ein flått 14 dagar før prøvetaking. Ho har IgM-antistoff mot fleire ulike antigen. Ho hadde ikkje IgG-antistoff, og svaret er derfor utlagt som nyleg infeksjon. På strimmel B er serum frå ein 37 år gammal mann testa. Han hadde uspesifikke symptom og ukarakteristisk utslett. ELISA viste anti-p41 IgM-antistoff i moderat nivå, men ikkje IgG-antistoff. Immunoblot viser reaksjon berre mot p41 flagellantigenet, og det er derfor ikkje serologisk støtte for at pasienten har infeksjon. Strimmel C er eit positivt testserum og viser alle dei rekombinante antigena

- Chen J. A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. J Exp Med 1998; 188: 2381–6.
9. Hofstad H, Matre R, Nyland H, Ulvestad E. Bannwarth's syndrome: serum and CSF IgG antibodies against *Borrelia burgdorferi* examined by ELISA. Acta Neurol Scand 1987; 75: 37–45.
 10. Tugwell P, Dennis DT, Weinstein A, Wells G, Shea B, Nichol G et al. Laboratory evaluation in the diagnosis of Lyme disease. Ann Intern Med 1997; 127: 1109–23.
 11. Robertson J, Guy E, Andrews N, Wilske B, Anda P, Granstrom M et al. A European multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of Lyme borreliosis. J Clin Microbiol 2000; 38: 2097–102.
 12. Ulvestad E. Økende bruk av laboratorietester – en kontrollerbar prosess? Tidsskr Nor Lægeforen 2000; 120: 2315–9.

○