

De waarde van laboratoriumdiagnostiek bij neuroborreliose

Afsluitende scriptie
Klinische Chemie

Ing. AM Bolderdijk
Technische Universiteit Eindhoven
Faculteit Biomedische Technologie
December 2005

Inhoudsopgave

1. Inleiding	3
2. Lyme-borreliose	4
2.1. Teken	4
2.2. De stadia en symptomen van Lyme-borreliose	5
2.2.1. Eerste stadium: lokale vroege infectie	5
2.2.2. Tweede stadium: gedissemineerde infectie	5
2.2.3. Derde stadium: Chronische Lyme-borreliose	6
2.3. Diagnose van Lyme-borreliose	7
3. Antilichamen testen	10
3.1. ELISA in theorie	11
3.2. Western blot in theorie	11
3.3. ELISA in praktijk	12
3.4. Western blot in praktijk	14
3.5. Recombinant VlsE	16
4. Waarde laboratoriumdiagnostiek bij neuroborreliose	17
5. Conclusie	22
6. Referenties	23

1. Inleiding

Onderzoeksvraag van deze scriptie luidt:

Wat is de waarde van de laboratoriumdiagnostiek bij neuroborreliose?

Volgens de richtlijn Lyme-Borreliose, van het Kwaliteitsinstituut voor de Gezondheidszorg CBO, 2004 ^[1] is chronische neuroborreliose een zeer zeldzame voorkomende aandoening, waarbij altijd sprake is van aanwezigheid van antistoffen in het bloed in combinatie met intrathecaal antistofproductie en veelal lymfocyttaire pleiocytose.

De patiënten met verdenking op chronische neuroborreliose wordt aanbevolen om antistoffen tegen *Borrelia burgdorferi* in het bloed en de liquor cerebrospinalis te bepalen (pagina 57, aanbeveling 26). Verder wordt gesteld dat bij neuroborreliose veelal lymfocyttaire pleiocytose en een al dan niet een verhoogd eiwitgehalte aanwezig is.

Deze scriptie verdiept zich in de bovenstaande aanbeveling van het CBO. Er wordt verder vermeld dat dit dient te gebeuren met ELISA, IFA en western blot. Voor de eerste twee wordt een specificiteit voor IgG opgegeven van 80 tot 95%, hetgeen betekent dat een gedeelte van de patiënten een foutieve diagnose krijgt. Over de sensitiviteit wordt in de richtlijn niet gesproken.

Er wordt ook geen methode genoemd hoe dit onderzoek dient te gebeuren, zodat aangenomen mag worden dat men gebruik maakt van commerciële testkits of van een eigen methode.

De diagnose Lyme-borreliose dient gesteld te worden op basis van de klinische gegevens en het bloedonderzoek dient ter ondersteuning hiervan.

Bij het stellen van de diagnose neuroborreliose dienen intrathecale antistoffen aangetoond te worden, dit gebeurt met de zelfde methodes als voor het serum. Indien deze intrathecale antistoffen niet worden aangetoond, dan is de diagnose dus niet neuroborreliose en wordt een andere behandeling toegepast. Omdat de diagnose berust op testresultaten is van belang te weten hoe nauwkeurig deze onderzoeksmethoden zijn om zodoende de waarde voor de diagnostiek te kunnen aangeven.

Allereerst zal in hoofdstuk 2 Lyme-borreliose in het algemeen behandeld worden.

Hierbij wordt ingegaan op het krijgen van de infectie, het diagnostiseren en de verschillende stadia waarin Lyme-borreliose is ingedeeld. In hoofdstuk 3 wordt ingegaan op de antilichaamtesten die bij Lyme-borreliose en dus ook bij neuroborreliose worden gebruikt. Hoofdstuk 4 gaat dieper in op de onderzoeksvraag. Uiteindelijk zal de conclusie volgen in hoofdstuk 5.

AM Bolderdijk, december 2005

2. Lyme-borreliose

2.1. Teken

Lyme-borreliose is een infectieziekte die wordt veroorzaakt door de bacterie *Borrelia burgdorferi*. In Europa wordt *Borrelia burgdorferi* overgebracht door de *Ixodus ricinus*, de schapenteek. Tevens is aangetoond dat de ziekte van de moeder aan het ongeboren kind kan worden overgedragen. Daarnaast bestaan volgens verschillende wetenschappers sterke aanwijzingen dat de *Borrelia burgdorferi* ook seksueel overdraagbaar zou zijn. Dit temeer daar de *Borrelia* bacterie een spirocheet is evenals de bacterie *Treponema pallidum* die syfilis veroorzaakt. Lyme-borreliose is ook wel bekend als de ziekte van Lyme, vernoemd naar het plaatsje Old Lyme in Connecticut (V.S.) waar de ziekte in de zeventiger jaren is (her-)ontdekt.

De teek die het meest in Europa voorkomt, de *Ixodus ricinus*, is een "drie gastheren teek". Dit betekent dat zij in elk van haar ontwikkelingsstadia een nieuwe gastheer zoekt. De teek ontwikkelt zich door middel van vervelling van larve tot nimf en vervolgens tot volwassen teek. De eitjes worden meestal op muizen, die in ±40% van de gevallen met *Borrelia* geïnfecteerd zijn, of andere kleine knaagdieren gelegd. Bij de eerste bloedmaaltijd kan de larve dus geïnfecteerd raken met de *Borrelia* bacterie om deze bij zijn volgende bloedmaaltijden over te dragen aan andere gastheren, zoals vogels, huisdieren maar ook mensen. Besmetting van de eitjes en dus de larve komt maar zelden voor, hoewel transovariale overdracht wel aangetoond is. Bij de volwassen teek nuttigt alleen het vrouwtje nog een bloedmaaltijd alvorens zij haar eitjes legt. De nimfen zijn waarschijnlijk het belangrijkste voor het overbrengen van ziekten op de mens. Zij zijn beduidend kleiner dan de volwassen teek en daardoor moeilijker op te merken. Ook zijn in de lente en zomer meer nimfen dan volwassen teken.

Het percentage besmette teken kan van plaats tot plaats en van jaar tot jaar sterk wisselen. Gegevens over het besmettingspercentage zijn daarom slechts van beperkte waarde. Zo is in België 23% van de teken geïnfecteerd met *Borrelia burgdorferi* en in het Siebengebirge (Duitsland) gemiddeld 14%. Volgens een studie van het RIVM uit 1998 waren 13% van de teken, verzameld in de Flevopolder, besmet met *Borrelia*. Een studie gedaan in 2003 naar de besmetting van muizen met *Borrelia* in de Amsterdamse Waterleidingduinen en de Hoge Veluwe laat een infectiepercentage zien van resp. 48% en 31%. Volgens het zelfde RIVM is het aantal tekenbeten in de periode 1995 tot 2001 verdubbeld van 6500 naar 13000.

Tot de familie van de *Borrelia burgdorferi* bacterie, officieel *Borrelia burgdorferi sensu lato*, behoren de *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana* en *B. lusitana*. Van de eerste drie is bekend dat ze humaan pathogeen zijn, van de laatste twee is de klinische relevantie nog niet geheel duidelijk.

In Amerika komt alleen *B. burgdorferi s.s.* voor, terwijl in Europa een sterke toename te zien is van *B. valaisiana* en *B. garinii*. Voor Nederland zijn volgens Nohlmans et al. de teken voor 46% met *B. burgdorferi s.s.*, voor 30% met *B. garinii*, voor 3% met *B. afzelii* en voor 21% met onbekende *B.b* genospecies besmet.

Uit verschillende studies blijkt dat de verschillende genospecies verschillende pathogenese en verschillende antibiotica resistentie in vitro hebben en niet door alle immunotesten worden gedetecteerd. Deze verschillen zorgen voor zowel bij de diagnose als bij de behandeling voor problemen.

Naast dat de teek een vector is voor de *Borrelia* kunnen ook andere infectieziekten door een tekenbeet veroorzaakt worden zoals TBEV (FSME), Ehrlichiose, Rickettsiose, Bartonella en Babesiose. Een RIVM studie laat zien dat in 70% van de teken DNA aanwezig is van de Bartonella bacterie. Hoewel exacte gegevens over deze co-infecties bij patiënten in Nederland ontbreken is het oplopen van een co-infectie door een tekenbeet niet uit te sluiten tijdens vakanties of reizen in andere landen.

2.2. De stadia en symptomen van Lyme-borreliose

Net als syfilis verloopt Lyme-borreliose in verschillende stadia. De ziekteverschijnselen worden in drie stadia ingedeeld, hoewel er overlap tussen de stadia kan zijn en ook een stadium overgeslagen kan worden. Door gebrek aan kennis vindt vaak een misdiagnose plaats met betrekking tot het juiste stadium, wat tot onjuiste behandeling kan leiden aangezien men vervolgens zoals voorgeschreven het overeenkomstige stadium behandelt.

2.2.1. Eerste stadium: lokale vroege infectie

Enkele dagen tot weken (gemiddeld 17 dagen) na de tekenbeet verschijnt er een rode ringvormige huiduitslag het erythema migrans (EM) dat zich centrifugaal uitbreidt. Het EM is groter dan 5 cm in diameter (mediaan 12-20 cm) en kan zelfs meer dan 25 cm worden. Variaties van het EM komen ook voor, zoals een zwarte of heldere kern, blaarvorming, multipel EM, jeuk, branderig of een pijnlijk gevoel. Een ophelderend centrum treedt bij 75% van de patiënten in Europa op en gevoel van pijn, branderig of jeuk komt in 30-59% voor. De voorkeurslocatie van het EM is de romp, benen, oksels of liezen.

In de acute fase kan ook een lymfadenitis benigna cutis (borrelia pseudolymfoom) optreden. Dit is een paarsrode subacute nodulus op de plaats van de beet of op afstand, bijvoorbeeld op oorschelp, oorlel, tepel, neus of scrotum.

Het EM geneest meestal spontaan maar kan na enige tijd terugkeren. Echter bij een groot aantal patiënten treedt geen EM op. De literatuur geeft daar verschillende cijfers over, maar algemeen wordt aangenomen dat in ongeveer 60% van de patiënten een EM optreedt. Vaak blijft echter een EM onopgemerkt omdat het geen pijn veroorzaakt en op een niet direct zichtbare plaats zit.

De diagnose is niet altijd eenvoudig en vaak wordt een EM beoordeeld als insectensteek, ringworm, cellulitis of een andere dermatologische aandoening. Als een typische EM wordt geconstateerd is er vrijwel zeker sprake van Lyme-borreliose en is een serologisch onderzoek niet meer nodig voor het stellen van de diagnose.

2.2.2. Tweede stadium: gedissemineerde infectie

In dit stadium is de Borrelia bacterie door het gehele lichaam verspreid en heeft elk orgaan bereikt. Vaak wordt in definities over dit stadium gezegd, dat dit na enkele weken tot maanden, maar binnen één jaar plaats vindt. Echter, de disseminatie is van patiënt tot patiënt verschillend en houdt zich niet aan vastgestelde tijden. Bij de disseminatie speelt het genotype van de bacterie waarschijnlijk ook nog een rol. De bacterie nestelt zich in de verschillende organen en de verschillende genotypen hebben hun eigen voorkeur voor een bepaalde locatie. Zo worden de volgende associaties gemaakt: B. burgdorferi s.s. wordt vaker gevonden in de gewrichten, B. garinii in het centrale zenuwstelsel (CZS) en B. afzelii manifesteert vaker met dermatologische verschijnselen. Dit betekent echter niet dat deze genotypen zich uitsluitend daarmee manifesteren. Er zijn ook onderzoekers die beweren dat nog voordat de bacterie zich manifesteert als EM, deze al in het CZS aanwezig is.

Belangrijke verschijnselen zijn, hoewel die van mild tot zeer ernstig kunnen variëren en als een multisysteemziekte voorkomen, spierpijnen en gewrichtpijnen, hoofd/nekpijn, lage rugpijnen, vermoeidheid, nachtelijk zweten, neuritiden, verhoogde rustpols, hartruisen, tachycardie, evenwichtsproblemen, sensorische problemen, cognitieve stoornissen, gehoorproblemen, temperatuursensaties enzovoorts. Het blijkt dat de helft van de patiënten met een gedissemineerde infectie geen tekenbeet of EM heeft opgemerkt, waardoor kan het voorkomen dat de ziekteverschijnselen niet direct met een Borrelia burgdorferi infectie in relatie worden gebracht.

Neuroborreliose

In dit stadium kunnen de volgende aandoeningen zich voor doen: meningitis, meningoradiculitis Bannwarth syndroom, perifere faciale parese, Lyme carditis, Lyme arthritis, orchitis, uveitis, panofthalmitis, hepatitis, myositis, plexusneuritis, mononeuritis, encefalitis, cerebrale vasculitis, tinteling en doof gevoel in de ledematen zoals het carpale tunnel syndroom en myelitis.

Bij verdenking op neuroborreliose wordt in de regel naast onderzoek naar antilichamen in het bloed ook gezocht naar antilichamen het CSF (liquor cerebrospinalis). Volgens verschillende bronnen zijn antilichamen zowel in de vroege fase als latere fase niet altijd aantoonbaar en negatieve bevindingen sluiten een neuroborreliose dus niet uit.

2.2.3. Derde stadium: Chronische Lyme-borreliose

Bij een ziekte duur van meer dan een jaar kan gesproken worden van chronische Lyme-borreliose, echter een duidelijke grens tussen het 2e en 3e stadium is er niet. Tot de symptomen behoren Lyme-arthritis, chronische encefalitis of encefalomyelitis, cerebrale vasculitis, myositis, polyneuropathie, motorneuronziekten, keratitis, sclerodermie circumscripta, morphaea, dermatomyositis en cardiomyopathie. Er zijn sterke aanwijzingen dat Lyme-borreliose naarmate de infectie langer duurt steeds meer de kenmerken van een chronische multisysteemziekte vertoont. Naast de specifieke verschijnselen in verschillende orgaansystemen staan bij de chronische vorm van de ziekte de algemene, aspecifieke klachten op de voorgrond. Deze klachten bestaan onder andere uit griepachtige verschijnselen, chronische vermoeidheid, hoofdpijn, voorbijgaande temperatuursverhoging van enkele uren, transpireren, wisselende pijn in spieren, pezen en gewrichten (zonder objectieve locale ontstekingsverschijnselen).

ACA

Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) is een uiting van late Lyme-borreliose en ontstaat vele maanden of zelfs jaren na de infecterende beet. Het eerste stadium is de inflammatie, waarbij de huid ontstoken en blauwrood van kleur met lichte zwelling is, later treedt het atrofische stadium op en wordt de huid sigarettenpapier dun. Meestal komt dit voor op de ledematen waarvan in 70% op de benen. De veroorzaker is in de meeste gevallen *B. afzelii*.

Post-Lyme syndroom

Deze aandoening is beschreven door Steere et al. en uit zich met blijvende symptomen na een antibiotica behandeling. Volgens Steere et al.^[16] zijn voor de blijvende verschijnselen, die niet veroorzaakt worden door de *Borrelia* infectie, een auto-immune reactie en een moleculaire mimicry verantwoordelijk. Een bewijs voor deze theorie is echter niet geleverd. Andere wetenschappers hebben met studies aangetoond dat de *Borrelia* bacterie na een antibioticabehandeling nog aanwezig is en dat er daarom sprake is van een persisterende infectie die verder met antibiotica behandeld dient te worden.

Chronische neuroborreliose

Borrelia burgdorferi kan het gehele zenuwstelsel aantasten en daarom is het klinische spectrum zeer veelzijdig. Patiënten ontwikkelen meningitis, radiculoneuritis en craniale neurooptie. Bij volwassenen is het meest voorkomend het Garin-Bujadoux-Bannwarth syndroom, terwijl volgens Cristen et al.^[17] bij kinderen 80% van de neuroborreliose tot uiting komt als een acute faciale parese. Een mogelijke verklaring voor dit aantal bij kinderen, is waarschijnlijk dat kinderen vaak gebeten worden op het hoofd of in de hals/nek omgeving. Matige hoofdpijn is een belangrijk symptoom.

Radiculaire pijn treedt volgens Lisper et al.^[18] bij 40% van de Lyme-patiënten en het is bij 86% van de patiënten met neuroborreliose de eerste klacht en treedt na ongeveer vier tot zes weken na de tekenbeet op. De pijnen zijn vooral in het nek/schouder gedeelte en lumbaal met uitstraling naar de ledematen.

Bij patiënten met het Bannwarth syndroom wordt bij 60% uitval van de hersenzenuwen met uitzondering van de N. olfactorius gevonden. In 80% van de gevallen waarbij de hersenzenuwen betrokken zijn gaat het om de N. facialis, een bilaterale parese komt in 11% van de neuroborreliosepatiënten voor^[19].

2.3. Diagnose van Lyme-borreliose

Lyme-borreliose is een multisysteemziekte en een differentiaal diagnostiek is dan ook noodzakelijk. Hoewel er buiten het EM geen specifieke symptomen voor de Lyme-borreliose zijn, is de combinatie van de symptomen en de anamnese de basis voor de diagnose.

Daar er geen "gouden standaard" bestaat voor het aantonen van Lyme-borreliose en omdat de huidige bloedtesten een zeer verschillende betrouwbaarheid hebben, moeten de resultaten van deze testen dan ook gezien worden als een ondersteuning van de voorlopige diagnose en niet ter vervanging daarvan (FDA^[20]).

De diagnose zal in het algemeen gebaseerd zijn op:

- een anamnese met een tekenbeet in het verleden, hoewel uit onderzoek blijkt dat slechts de helft van de patiënten zich dit herinnert;
- het klinische ziektebeeld met de combinatie van symptomen;
- het serologisch aantonen van *Borrelia burgdorferi* antilichamen.

Doordat bij Lyme-borreliose echter vele organen kunnen zijn aangedaan, bestaat de kans dat symptomen als EM, lymfocytose, ACA, faciale parese, Bannwarthsyndroom en arthrititis verkeerd gediagnosticeerd worden. Het stellen van een diagnose wordt nog moeilijker bij symptomen als carditis, myositis. Daarbij komt dat er lange latente fasen kunnen zijn, net als bij syfilis, waarbij exacerbaties optreden.

Ook afwezigheid van symptomen van een bepaald orgaan sluiten een infectie ervan niet uit. Er is absoluut geen voorspelbare klinische volgorde bij de ziekte van Lyme. Sommige symptomen treden bij patiënten niet op of zijn verlaat met maanden en soms wel jaren. Het is bekend, dat patiënten jarenlang klachtenvrij waren totdat er zich een traumatische ervaring (stress, verwonding, ongeval, of psychisch voorval) voordeed, waarna de symptomen zich manifesteerden. De klachten kunnen heviger worden in golfbewegingen van drie tot vier weken. Bij vrouwen loopt dit vaak synchroon met de menstruatie. Variatie treedt ook op gedurende de dag, waarbij stijfheid van de gewrichten en een niet helder hoofd vaak 's ochtends bij het opstaan het hevigst zijn.

Onderzoek bij muizen heeft aangetoond dat de *Borrelia* bacterie al binnen 12 uur in de hersenen is. Als disseminatie zo snel plaats vindt, via weefsel migratie en bloedcirculatie, dan is benoeming van de ziekte naar stadia, conform de chronologische verschijnende klachten, irrelevant.

In het geval van een EM als gevolg van een tekenbeet is verder onderzoek overbodig en kan meteen begonnen worden met de antibiotica behandeling. In het vroege stadium worden er geen antilichamen aangetoond, het immuunsysteem zou verlaat reageren, zodat een test in de eerste drie weken niet zinvol is. In een recent doorgevoerde rondvraag onder artsen in een endemisch gebied in Frankrijk was echter 50% van hen van mening dat voor de diagnose een serologische bevestiging vereist was^[21].

Daar slechts 50% van de patiënten een EM ontwikkelt en 45% zich een tekenbeet kan herinneren^[22], komen patiënten zonder deze verschijnselen pas veel later met hun klachten bij de arts. Vooral deze patiënten leggen vaak een lange weg af, langs verschillende specialisten, voordat de juiste diagnose gesteld is. De diagnose is op basis van de combinatie van de verschijnselen en de anamnese te maken.

Verder aanvullend onderzoek omvat het volgende:

Bacteriekweek

De bacteriekweek vindt alleen plaats in speciaal geoutilleerde laboratoria. Het is uiterst moeilijk om spirochetes te kweken en het is tot op heden nog niet gelukt om *Treponema pallidum* (de spirocheet die syfilis veroorzaakt) in vitro te kweken. Bij de *Borrelia* duurt het kweken, vanwege de lange generatietijd, erg lang. Omdat bij *Borrelia burgdorferi* de genen voor biochemische reacties afwezig zijn, is er weefsel voor in vitro kweek noodzakelijk. Het is dan ook niet gebruikelijk om een kweek te laten doorvoeren.

Microscopisch onderzoek

Microscopisch onderzoek wordt eigenlijk alleen gedaan bij moeilijke dermatologische verschijnselen. Hierbij komt histopathologisch onderzoek met eventuele spirochetenkleuring dan in aanmerking. Een direct microscopisch onderzoek van bloed bij Lyme-borreliose wordt niet gedaan in tegenstelling tot bij "relapsing fever" veroorzaakt door *Borrelia recurrentis*. Het RIVM^[23] adviseert bij relapsing fever een donkerveld microscopisch onderzoek als een bevestigende test. In een druppel bloed onder donkerveld microscoop is heel goed de spirocheet te zien, hoewel de bevestiging of het hier om een *Borrelia burgdorferi* gaat niet gemaakt kan worden.

Enzyme immunoassay (EIA)

EIA maakt een differentiatie mogelijk tussen de IgM en IgG antilichamen welke van diagnostische waarde is. De methode van onderzoek zijn niet gestandaardiseerd en de testen van de derde generaties hebben de voorkeur.

Immunofluorescence assay (IFA)

De IFA test wordt gebruikt voor het aantonen van IgM en IgG. Er zijn verschillende ziekenhuizen die deze test toepassen. De gevoeligheid ligt ongeveer bij die van de EIA van de tweede generatie. Voor de doorvoering van de IFA test zijn echter goed getrainde technici noodzakelijk.

ELISA en Western Blot

De ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) en de western blot test worden als antilichamenbepalingen doorgevoerd ter ondersteuning van de diagnose. Echter een onderscheid tussen een eerder doorgemaakte infectie en een actieve infectie kan niet gemaakt worden. Een opvolgende test na enige maanden kan daar soms duidelijkheid in brengen als titerverandering en/of antigenvariatie is opgetreden. Helaas is de immuunrespons bij de Lyme-borreliose niet altijd volgens het karakteristieke verloop zoals bij andere infectieziekten. Een aantoonbaar immuunrespons van IgM volgt meestal na ongeveer drie weken na het begin van de infectie. Na ongeveer zes weken treft men eveneens IgG antilichamen aan, zodat zij meestal in het tweede stadium aanwezig zijn. In het late stadium van Lyme-borreliose is meestal alleen het IgG aanwezig, het IgM is dan afwezig.

De antilichamen bepaling is een indirecte methode, niet de bacterie maar de door het immuunsysteem geproduceerde antilichamen worden hiermee bepaald. Bij deze bepaling kan het door verschillende oorzaken tot een fout negatief resultaat komen. In de eerste weken van de infectie worden geen antilichamen aangetoond vanwege het lage gehalte aan antilichamen.

Er worden ook alleen maar vrije antilichamen aangetoond en niet antilichamencomplexen. Dit kan betekenen dat iemand met een sterke antilichamenrespons, maar met weinig vrije antilichamen, eigenlijk een ernstige infectie heeft, maar negatief bevonden wordt.

Met de western blot test kan de specifieke activiteit van de antilichamen in verschillende banden aangetoond worden. Voor een positieve test moeten er meestal een aantal specifieke banden positief zijn. Bij IgM zijn dit er minstens twee en bij IgG minstens vijf.

In het algemeen wordt het twee-testprotocol doorgevoerd, wat inhoudt dat eerst een ELISA test als screeningtest wordt door gevoerd en als deze positief is, wordt er een western blot test gedaan als bevestiging.

LUAT

De LUAT Lyme urine antigentest baseert op het aantonen van Borrelia proteïne in de urine. De methode is niet officieel erkend en schijnt veel fout positieven te geven. De test wordt vooral in de VS gebruikt. Recente varianten hiervan zijn de LDA Lyme DOT-BLOT Assay wat direct het Borrelia antigeen aantoonst en de RWB Reverse western blot als antigenen test^[26]. Er liggen alleen nog maar in-house gegevens voor waarin de LDA 60% sensitiviteit vertoonde.

PCR

De onderzoeksmethode berust op het aantonen van DNA door middel van polymerase chain reaction (PCR). De onderzoeksmethode maakt hierbij geen onderscheid tussen DNA van een levende Borrelia of van een dode. Nucleïnezuur amplificatie technieken (NAT) zijn zeer specifiek. Doordat er geen standaardisatie van de methode met betrekking tot monster preparatie en het gebruik van primers is, lopen de resultaten sterk uit één. Voor het doorvoeren van deze techniek zijn speciale laboratoria nodig met speciaal opgeleide technici.

LTT

De Lymfocyten Transformatie Test (LTT) bepaalt in tegenstelling tot de ELISA en western blot niet het humorale maar het cellulaire immuunrespons. Deze test is evenals de ELISA en western blot geen directe bepaling van een infectie en kan daarom ook niet definitief een Lyme-borreliose aantonen.

Lumbaalpunctie

Volgens de CBO richtlijnen^[1] moet een lumbaalpunctie met een onderzoek op Borrelia intrathecale antilichamen en een celgehalte bepaling worden doorgevoerd voor de bevestiging van neuroborreliose. Om een onderscheid te kunnen maken of de gevonden antilichamen in het CSF ontstaan zijn, dan wel door de bloedschermbarrière (BHB) gelekt zijn, wordt een antilichamenindex bepaald. Hierbij wordt het gehalte aan antilichamen bepaald zowel in het serum als in het CSF. Als deze index groter is dan twee dan is er een duidelijke verhoging in het CSF. Als vervolgens pleiocytose en/of een verhoogd albumine gehalte wordt aangetoond dan is er sprake van neuroborreliose.

Voor neuroborreliose moet volgens de CBO richtlijnen dus voldaan zijn aan de criteria:

- antilichamen tegen Borrelia in het CSF;
- veelal lymfocytair pleiocytose positief en
- een al dan niet een verhoogd albumine gehalte.

3. Antilichamen testen

Lyme-borreliose is een klinische diagnose, bij een EM als gevolg van een tekenbeet. Verder onderzoek dan niet noodzakelijk. Echter in vele gevallen is het niet zo eenduidig. Als de patiënt zich geen tekenbeet herinnert en bovendien geen EM heeft gehad of dit al lang terug ligt, dan zal de arts ter ondersteuning van zijn vermoedelijke diagnose een bloedtest laten uitvoeren.

Aangezien het direct aantonen van de bacterie door middel van een kweek niet mogelijk is, zo'n onderzoek zou weken tot maanden duren, wordt overgegaan tot een indirecte methode. Bij deze indirecte methode worden de antilichamen tegen de *Borrelia burgdorferi* bacterie aangetoond.

Immunoglobulinen (afgekort Ig) of antilichamen, zijn eiwitten, die na contact van het organisme met een antigeen worden geproduceerd en als antistoffen in het bloed, weefselvloeistoffen en lichaamssecreten (o.a. speeksel, traanvocht, neusslijm) aanwezig zijn. Ze zorgen voor de humorale immuniteit en worden ingedeeld in vijf klassen: IgA, IgD, IgE, IgG en IgM. Deze worden allemaal aangemaakt door B-lymfocyten, maar onder verschillende omstandigheden:

- IgA zit vooral in de lichaamssecreten.
- IgD komt voornamelijk voor als receptor op het membraanoppervlak van B-lymfocyten.
- IgE zit op de slijmvliezen en zit meestal vast op basofiele granulocyten, die histamine produceren bij binden aan antigenen.
- IgG komt overeen met 80% van het antilichaamgehalte van het bloed. Bij de secundaire immuunrespons wordt overgeschakeld op de aanmaak van IgG. Het speelt een rol bij de bescherming van de foetus omdat het de placenta kan passeren en is ook een belangrijk antilichaam bij de afweer tegen bacteriën en virussen.
- IgM wordt als eerste antilichaam in de immuniteitsreactie gevormd en is vooral betrokken bij reacties tegen bacteriën en virussen. Na enkele dagen tot weken wordt vervolgens IgG geproduceerd.

Op een vereenvoudigde manier kan de antilichamedetectie als volgt worden voorgesteld. De borrelia bacterie heeft aan de buitenzijde van de celwand bepaalde eiwitten, de "Outer surface protein" (Osp) of antigenen genaamd. Er zijn veel verschillende antigenen, er zijn er die zich op de achtergrond houden en er zijn er die zich nadrukkelijk manifesteren, de zogenaamde dominante antigenen. Het immuunsysteem herkent de bacterie aan de antigenen wanneer deze het lichaam binnendringt en produceert dan antilichamen tegen deze antigenen. De antilichamen binden specifiek aan de antigenen en er ontstaan immuuncomplexen, die door de fagocyten herkend en vernietigd worden. Door dit afsterven zullen er minder bacteriën zichtbaar zijn voor het immuunsysteem, waardoor de productie van antilichamen afneemt. In het begin van de infectie zullen er dus veel antigenen zijn, maar weinig antilichamen. Vervolgens vormen de geproduceerde antilichamen immuuncomplexen met de in overvloed aanwezige antigenen, zodat er geen vrije antilichamen meer aanwezig zijn.

De belangrijkste immunologische testen die gebruikt worden voor het aantonen van borrelia-antilichamen zijn de EIA (enzyme immunoassay) en de western blot. De eerste is een semi-kwantitatieve test, waarbij gekeken wordt of er antilichamen tegen *Borrelia* voorkomen in het serum of CSF. De tweede is een kwalitatieve test waarbij differentiatie plaatsvindt van de verschillende antilichamen.

Een negatieve antilichamentest geeft dan ook slechts aan dat op het moment van de monstername geen vrije antilichamen boven het detectie niveau konden worden aangetoond in het monster met de betreffende methode. Volgens de FDA^[20] moet een negatieve antilichamentest niet gebruikt worden om een infectie met *Borrelia burgdorferi* uit te sluiten als oorzaak voor de ziekte.

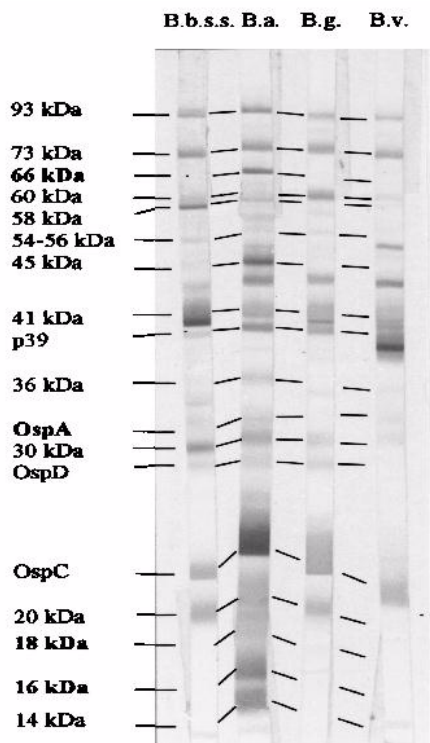
3.1. ELISA in theorie

Bij Lyme-borreliose is de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) test de eerste test die wordt uitgevoerd. Hierbij gaat men er van uit dat wanneer een patiënt een Lyme-borreliose infectie heeft, immuunsysteem hiertegen antilichamen heeft gemaakt. Door het samenbrengen van het serum of CSF van de patiënt met de antigenen van de *Borrelia burgdorferi* zullen er immuuncomplexen gevormd worden, welke men vervolgens door kleuring zichtbaar kan maken.

Op een microtiterplaat fixeert men een suspensie van kapotgemaakte *Borrelia burgdorferi* bacteriën. Men brengt dit in contact met een monster van het serum of CSF en als hierin antilichamen aanwezig zijn dan zullen deze zich hechten aan de antigenen en immuuncomplexen vormen. De ongebonden antilichamen worden hierna van de plaat gespoeld. Nu voegt met een tweede antilichaam toe, dat aan het eerst koppelt. Ook nu worden weer alle ongebonden antilichamen verwijderend. Het tweede antilichaam is een enzym, dat na toevoeging van een kleurstof zichtbaar wordt. De intensiteit van deze kleuring kan gemeten worden en is een maat voor de hoeveelheid antilichamen in het monster. Boven een bepaalde grenswaarde wordt het monster als positief beoordeeld.

3.2. Western blot in theorie

Op de bacteriecel kunnen verschillende antigenen voorkomen, waartegen ook verschillende antilichamen worden aangemaakt. De western blot test scheidt deze antilichamen naar hun molecuulmassa.



Op een plaat van polyacrylamide brengt men een gesonificeerde bacteriesuspensie aan van de *Borrelia burgdorferi* stam waarna de antigenen door middel van SDS-page elektroforese gescheiden worden. De door met elektroforese gescheiden antigenen worden nu overgebracht (blotting) op een nitrocellulose membraan en gefixeerd. Hierna wordt deze strip in contact gebracht met het verdunde serum waarin de antilichamen zich bevinden. Deze hechten zich vervolgens aan de antigenen op de blotstrip, waarna een secundair antilichaam met enzym wordt toegevoegd en vervolgens een kleurstofbehandeling die de complexen zichtbaar maken. Deze verschijnen als een band op de plaat en door gelijktijdig een monster met bekende monoklonale antilichamen mee te laten lopen, weet men wat de banden voorstellen. De duidelijkheid van de banden in een bepaalde verdunning geven een beperkt inzicht in de onderlinge concentraties van de antilichamen aanwezig in het monster.

Figuur 1: Voorbeeld van een immunoblot (IgG)

De antigenen hebben verschillende namen zoals, OspA, OspB, OspC, flagelline enzovoorts. De daarbij horende antilichamen duidt men aan met de letter 'p' van proteïne en een cijfer wat de molecuulmassa aangeeft in kiloDalton (kD). Zo is het antilichaam van OspA het p31 kD, van OspB is het p34 kD, van OspC is het p23 kD en het antilichaam van flagelline is het p41 kD. Nu is flagelline een aspecifiek antigeen en het kan voorkomen dat antilichamen aangemaakt voor andere infecties hiermee een verbinding aangaan, bijvoorbeeld de antilichamen van EBV of CMV. Dit wordt een kruisreactie genoemd. Echter de antilichamen p18, p22-23 (OspC), p31 (OspA) en p34 (OspB), p39 en p83/93 kunnen uitsluitend aan Borrelia-antigenen gekoppeld worden en zijn dus zeer specifiek.

3.3. ELISA in praktijk

Het gebruik van de ELISA is niet op de eerste plaats vanwege de gevoeligheid, maar meer om het gemak en de kostenoverweging.

Bij de ELISA kunnen zich de volgende problemen voordoen die betrekking hebben op de sensitiviteit en de specificiteit. De sensitiviteit is het percentage van juist geteste Lyme-patiënten en de specificiteit is het percentage van juiste geteste gezonde personen.

Aangezien elke positieve of twijfelachtige ELISA bevestigd moet met de western blot, probeert men de ELISA een zo hoog mogelijke specificiteit te geven. Blijkt namelijk achteraf dat de western blot negatief is, dan was deze test eigenlijk onnodig als de specificiteit van de ELISA hoger was geweest. Daar een western blot ongeveer twee keer zo duur is als een ELISA zal men de specificiteit van de ELISA dus zo hoog mogelijk maken om de kosten van een overbodige test te besparen. Echter een hoge specificiteit gaat ten koste van de sensitiviteit, deze wordt daardoor lager.

De borrelia is, voor zover bekend, de meest gecompliceerde bacterie die we op het moment kennen. De veranderlijkheid van deze bacterie is geen toeval maar genetisch ingebouwd. Zodra het immuunsysteem specifieke antilichamen heeft gemaakt tegen de antigenen, vindt een verandering van de antigenenexpressie plaats om te kunnen overleven. Dit fenomeen van antigenenvariatie kennen we ook van sommige anderen bacteriën en dit mechanisme is waarschijnlijk verantwoordelijk voor het recurrerende karakter van de ziekte.

De antigenvariatie speelt natuurlijk ook een probleem voor het maken van de uitgangssuspensie voor de test. Er moeten immers wel corresponderende antigenen aanwezig zijn om met de antilichamen een binding te veroorzaken en om zo een positief resultaat te geven.

In Europa komen ten minste drie verschillende humaan pathogene Borrelia genospecies voor: *B. burgdorferi*, *B. garinii* en *B. afzelii*. Deze drie genospecies hebben een verschillende antigenenexpressie en zelfs in één genospecie is er verschil in antigenen. Zo zijn er acht verschillende OspA serotypen en meer dan 20 verschillende OspC's. Hierbij laat *B. garinii*, het in België^[27] (53% van de geïnfecteerde teken) meest voorkomende serotype, de grootste heterogeniteit zien.

Eigenlijk zou het serum van de patiënt met alle serotypen getest moeten worden, daar men immers niet weet met welke stam de patiënt geïnfecteerd is. In de routine wordt de meest voorkomende stam genomen in de test. De EUCALB^[2] adviseert dat een test geschikt dient te zijn voor de stammen die in het endemische gebied van de patiënt voorkomen. Voor Nederland zou dit op zijn minst vier genospecies^[25] betekenen. Norman et al.^[28] stelden vast dat, door het gebruik van de *B. garinii* stam in plaats van *Borrelia burgdorferi* s.s. in een onderzoek in België, een groter aantal positieven gevonden werd. Ook Ornstein et al.^[29] adviseren het gebruik van een locale stam vanwege de expressie van verschillende gehalten aan immunodominante antigenen in verschillende serotypen. Het is echter bekend dat er niet alleen grote verschillen zijn

tussen Noord-Amerika en Europa maar dat er ook grote verschillen zijn binnen Europa met betrekking tot het voorkomen van de verschillende stammen.

Uit onderzoek van Donta^[24] blijkt dat bij 52% van de patiënten een negatieve ELISA voorkomt met een positieve western blot. Als de criteria worden aangehouden om alleen een western blot na een positieve ELISA te doen, dan worden op deze manier patiënten negatief bevonden die een positieve western blot zouden kunnen hebben. Een beter protocol zou zijn, om bij verdacht van de Lyme-ziekte altijd zowel de ELISA als de western blot door te voeren. Echter ook deze combinatie is verre van ideaal vanwege de beperkte sensitiviteit van beide testen.

Volgens een onderzoek van Goossens et al.^[13] ligt de sensitiviteit van 15 commerciële Borrelia antigenen kits bij de ELISA voor IgM tussen 35 en 92%, voor IgG in vroege Lyme van 31-69%, voor IgG in late Lyme bij 54-92% en voor de WB bij 46-50%.

Voor het uitvoeren van de ELISA is het mogelijk om gesonificeerde Borrelia bacteriecellen als hele cellysaten te gebruiken voor de uitgangssuspensie. Het voordeel hiervan is dat een groot aantal verschillende antigenen aanwezig zijn waardoor de sensitiviteit hoog is. De specificiteit is echter nogal laag, waardoor veel foutpositieven gevonden worden die vervolgens opnieuw bevestigd moeten worden. Een ander nadeel kan zijn dat de stammen in vitro andere antigenen produceren dan in vivo. Het werken met hele cellysaten geeft dus een hoge sensitiviteit maar vereist grote vakkennis.

In de meeste gevallen zal gebruikt worden gemaakt van commerciële testkits. Deze zijn of samengesteld uit gereinigde hele cellysaten of recombinanten antigenen of een combinatie van beide. Het voordeel is dat men een juiste standaard van zuiverheid kan maken en dat men een mengsel van recombinanten kan maken waaruit de antigenen die voor kruisreacties zorgen zijn weggelaten. Echter niet alle antigenen zijn als recombinant te maken, daardoor is de kans aanwezig dat eventuele antilichamen niet gebonden worden omdat het corresponderende antigeen niet aanwezig is. Hierdoor zou de test dus foutnegatief kunnen zijn.

Een reëel probleem van de antilichamentest is dat alleen vrije antilichamen aangetoond kunnen worden. Een groot misverstand is dat lage titers een beperkte infectie weerspiegelen. Lage of negatieve antilichamen titers duiden bij een infectie erop dat de antilichamen 'geconsumeerd' zijn en dat levende bacteriën de overhand hebben of dat het immuunsysteem geen of onvoldoende antilichamen aanmaakt. Tylewska et al.^[10] vonden dat patiënten met levende Borrelia bacteriën in het serum geen vrije antilichamen hadden.

Eveneens bestaan er seronegatieve patiënten, wat betekent dat deze mensen geen antilichamen produceren maar wel een actieve infectie hebben. Dit kan veroorzaakt worden door het gebruik van antibiotica gedurende de ziekte of steroïden die het immuunsysteem onderdrukken. In een studie van Donta^[43] bleek dat 20% van de patiënten seronegatief was.

Hardin et al.^[30] beschreven reeds in 1979 circulerende immuuncomplexen in Lyme-borreliose, die hoofdzakelijk voorkwamen in patiënten met een actieve infectie. Een onderzoek op deze manier kan namelijk niet alleen in een vroeg stadium, waarbij alleen complexen aanwezig zijn, antilichamen aantonen, maar tevens kan een onderscheid gemaakt worden tussen een serologisch litteken en een actieve infectie. Brunner et al.^[31] komen tot vergelijkbare resultaten door gebruik te maken van PEG (polyethyleen glycol) neerslagen die immuuncomplexen bevatten. Op deze wijze konden antilichamen aangetoond worden, die niet als vrije antilichamen aanwezig waren, wat normaal tot een negatieve ELISA zou hebben geleid.

3.4. Western blot in praktijk

De western blot wordt gebruikt als conformatietest na een positieve ELISA. In de Dearborn meeting in 1994 bereikten functionarissen van overheidsinstellingen als CDC en ASTPHLD consensus over de criteria voor de interpretatie van de WB. Deze criteria zijn gebaseerd op de studies van Dressler et al.^[32] en van Engstrom et al.^[33]. Om aan de voorwaarde van een positieve WB te voldoen, gaat men uit van het gebruik van de B. burgdorferi stam (B31, 297 en 2591) en is het noodzakelijk dat voor een positieve IgM ten minste twee banden positief zijn van de volgende drie; p23, p39 en p41 kDa, waarbij de p23 band het OspC vertegenwoordigt.

Voor een positieve IgG moeten er ten minste vijf banden positief zijn van de volgende tien banden; 18-, 23-, 28-, 30-, 39-, 41-, 45-, 58-, 66-, en 93 kDa. De CDC vermeldt uitdrukkelijk dat deze criteria bedoeld zijn voor de diagnose van Lyme-borreliose voor "public health surveillance" rapportage doeleinden. Echter, deze criteria zijn overgenomen door medici als basis voor de diagnose voor Lyme-borreliose in de dagelijkse praktijk, waarvoor ze nooit bedoeld waren.

De ILADS heeft duidelijke kritiek op deze door de CDC gehanteerde criteria en heeft hierover een "position paper" gepubliceerd. Veel wetenschappers zijn het eveneens niet eens met deze criteria en vinden dat deze willekeurig gekozen zijn om de volgende redenen.

Ten eerste berust de studie van Dressler et al. slechts op patiënten die een EM en geen artritis noch neuroborreliose hadden en die slechts voor een periode van vier maanden werden gevolgd. Bij Engstrom waren alleen vroege Lyme-patiënten geselecteerd.

Ten tweede gebruikte Dressler de stam B. burgdorferi sensu stricto G39/40 en niet de door de CDC voorgeschreven stammen B. burgdorferi s.s. B31, 297, 2591. Engstrom gebruikte wel de B. burgdorferi sensu stricto 297 voor zijn IgM criteria.

Ten derde werden de hoogspecifieke banden p31 OspA en p34 OspB niet opgenomen in de criteria, omdat volgens Dressler ze niet belangrijk zijn, daar ze zelden voorkomen en alleen in late gevallen van borreliose. Juist in chronische patiënten zijn het zeer specifieke antilichamen tegen B. burgdorferi.

Voor zover nu bekend zijn er drie humaan pathogene genospecies van Borrelia burgdorferi s.l. in Europa tw. B. burgdorferi s.s., B. garinii en B. afzelli en deze zijn nog verder onder te verdelen in verschillende serotypen gebaseerd op de verscheidenheid van de Osp's. Zo zijn er acht verschillende OspA's en meer dan 20 verschillende OspC's. Zo is volgens Marconi et al.^[34] voor het B. garinii OspA serotype 4 stam een duidelijke correlatie met neuroborreliose in Europa. Hoewel dit serotype voornamelijk geïsoleerd is uit CSF van neuroborreliose patiënten, was het tot op heden niet mogelijk deze stam direct uit de teek te cultiveren. De B.garinii OspA 4 stam schijnt een sterk potentiaal te hebben voor disseminatie en een groot tropisme (groeirespons) voor het centrale zenuwstelsel in vergelijking met andere OspA serotypen. Gezien de associatie tussen dit serotype B. garinii OspA 4 en neuroborreliose en het binnendringen in het centrale zenuwstelsel is het mogelijk dat dit serotype een hogere pathogeniteit heeft dan de andere OspA serotypen. Deze heterogeniteit van de Osp serotypen zorgt voor de nodige complicaties bij het standaardiseren van de methode.

Volgens Hauser et al.^[35] kunnen de criteria van de CDC die opgesteld zijn voor surveillance doeleinden in de U.S. niet in Europa toegepast worden omdat daar alleen B. burgdorferi s.s. voorkomt. De criteria moeten refereren aan de borrelia stam waarvoor zij ontwikkeld zijn. Criteria gebaseerd op ten minste twee reactieve banden van een voorgestelde combinatie zijn meer betrouwbaar dan een voorschrift dat slechts één band vereist. Echter een tweebanden eis kan leiden tot duidelijk verlies aan sensitiviteit.

In Europa is er geografisch een grote verscheidenheid voor wat betreft het voorkomen van de verschillende genospecies, met volgens Reed een significante antigenenvariatie binnen elk genospecies. Dit kan tot onvoorspelbare reactiviteit met de te onderzoeken patiëntensera.

In een studie van Robertson et al.^[36] dat werd uitgevoerd als onderdeel van EUCALB, heeft men geprobeerd om tot een standaardisatie van de western blot voor Europa te komen. Een standaardisatie van een immunoblot methode voor de diagnose van LB vereist een overeenstemming voor het gebruik van de stam, voor de preparatie van de antigenen en het protocol.

Het is onwaarschijnlijk dat deze benadering bruikbaar is in Europa, omdat Lyme-borreliose niet hetzelfde is in alle gebieden in Europa vanwege de stamverschillen. De conclusie is dat men bij de WB de stam moet gebruiken die prevalent is in het endemische gebied. Volgens Norman et al.^[28] werden met zo'n test waarbij een lokale stam werd gebruikt een hoger aantal positieven gevonden dan met een test met de B31 stam. Door het gebruik van een lokale B. afzelii stam kon Jovicic et al.^[37] eveneens de sensitiviteit van de test verhogen.

In een studie van Nohlmans et al.^[38] werden de verschillende genospecies onderzocht van B. burgdorferi s.l. die in Nederland voorkomen. Het werd duidelijk dat er een grote variabiliteit bestaat betreffende de antigenen bij de verschillende genospecies.

Uit het bovenstaande wordt al meteen duidelijk welke beperkingen de commerciële WB heeft. Ideaal zou zijn om de hele cellysaten van alle drie de genospecies te gebruiken echter is de test dan niet meer af te lezen. Daarom wordt meestal één genospecies gebruikt of een mengsel van recombinant antigenen.

Net zoals bij de ELISA moet men bij de WB voor een aantal parameters kiezen. Men wil een zo hoog mogelijke specificiteit van ten minste 98% wat ten koste gaat van de sensitiviteit. Volgens de WAO/CDC richtlijn 1995/S141 moet de specificiteit van een conformatietest 98% zijn.

Voor Europa zijn geen criteria voor de western blot van kracht vanwege de grote verscheidenheid van de gebruikte testen en het probleem van de heterogeniteit van de borrelia genospecies in verschillende geografische gebieden. De EUCALB verwijst naar de aanbeveling MIQ12: Lyme Borreliosis, Quality Standards for the Microbiological Diagnosis of Infectious Diseases van de German Society for Hygiene and Microbiology^[7].

De MIQ criteria voor een positieve western blot zijn de volgende:

- Hele cellysaat blot met PKo stam, B.afzelii.
IgG positief als ≥ 2 banden van de volgende aanwezig zijn: p83/100, p58, p43, p39, p30, OspC, p21, Osp17, p14
IgM is positief als ≥ 1 band van de volgende aanwezig is: p41 (duidelijk), p39, OspC, Osp17
- Recombinant antigeen blot IgG positief als ≥ 2 banden van de volgende aanwezig zijn: p83/100, p58, p39, OspC, p41int*, Osp17. IgM: positief als ≥ 1 band van de volgende aanwezig is; p39, OspC, p41int, Osp17 of OspC alleen en duidelijk.
p41flagellin met MM 14kDa

De bovenstaande criteria voor de hele cellysaten methode gelden alleen bij gebruik van de PKo B. afzelii stam, die het OspC en p17 immunodominant uitdrukken, daar waar andere stammen deze in vitro niet laten zien. Volgens Wilske et al.^[39] kunnen de twee-band criteria hier gebruikt worden zonder al te veel verlies van sensitiviteit in tegenstelling tot het gebruik van de B. burgdorferi s.s. stammen en de B. garinii PBI stam.

Volgens de criteria van de MiQ12. worden de banden p41, p31 (OspA) en p34 (OspB) ook hier niet meegeteld wat volgens Hilton et al.^[40] tot een onderdiagnose leidt. Het p41 kan kruisreacties geven, maar het p31 en p34 zijn specifieke antilichamen die vooral in late Lyme voorkomen. Sommige LLMD's (Lyme literate MD) beoordelen een western blot positief als er slechts één specifieke band aanwezig is.

3.5. Recombinant VlsE

Op zoek naar meer sensitieve methoden voor de bepaling van antilichamen tegen *B. burgdorferi* heeft men de recombinanten test ontwikkeld. Recombinanten zijn specifieke antigenen die door genenmanipulatie gecultiveerd worden in andere bacteriën b.v. *E. coli*. De *E. coli* bacterie is dus een soort draagmoeder in dit geval.

Door op deze manier antigenen te maken kan men een zeer constante kwaliteit garanderen en in het uitgangsmengsel van zowel de ELISA als de WB die antigenen weglaten die mogelijk voor kruisreacties zorgen.

Om de testen specifiek te maken heeft men gezocht naar die antigenen die uitsluitend bij *Borrelia burgdorferi* voorkomen en die immunodominant zijn. Verschillende wetenschappers en producenten komen met verschillende recombinanten. Er is echter geen consensus wat nu de meest specifieke en meest sensitieve proteïnen zijn en hoe deze het best gebruikt kunnen worden in combinaties om een zo goed mogelijke onderscheidende test te verkrijgen. Zo gebruikten Hunfeld et al.^[41] een combinatie van recombinant p100, OspC, p18 van *B. afzelii* en p41 van *B. garinii* en *B. afzelii* stam PKo. In totaal werden 226 serummonsters van Lyme patiënten in de verschillende stadia onderzocht. De specificiteit van deze RE recombinant ELISA bepaald in 1107 gezonde bloeddonoren en 275 serummonsters van patiënten met andere ziekten was 94% voor IgG en 91% voor IgM. De sensitiviteit was 67-95% voor de verschillende Lymestadia. In een vervolgonderzoek met 394 routine monsters werd met de RE een sensitiviteit behaald van 81,1% voor IgG en 86,5% voor IgM, de specificiteit was respectievelijk 98,5% en 93%. De hele cellysaten ELISA behaalde een specificiteit van 97% voor IgG en 92,4% voor IgM.

Het voordeel is dat een recombinanten blot eenvoudiger af te lezen is, daar waar de hele cellysaten immunoblots moeilijk zijn. De recombinanten blot is in het bijzonder geschikt wanneer grote aantallen van sera onderzocht dienen te worden.

De meeste recente ontwikkeling is een combinatie met het recombinant VlsE (variable surface antigen Vmp-like sequence) en de zgn. truncated recombinant-antigenen waarbij de delen die voor kruisreacties zorgen zijn weggelaten b.v. intern flagelline p41 kD.

Wilske et al. stelden een combinatie van de eerder gebruikte recombinanten met de toevoeging van VlsE en het decorin bindend proteïne A, DbpA van *B. garinii* voor. Een recente ELISA variatie is de C6 ELISA, een peptide enzyme-immunosorbent assay gebaseerd op een 26-mer synthetische peptide (C6) met de IR6 sequentie. Liang et al.^[42] toont met deze C6 Elisa in de drie stadia van Lyme, EM, gedissemineerde en late Lyme een sensitiviteit voor deze Elisa van 74%, 85 tot 90% en 100% respectievelijk aan en een specificiteit van 100%.

4. Waarde laboratoriumdiagnostiek bij neuroborreliose

Volgens de richtlijn Lyme-Borreliose, van het Kwaliteitsinstituut voor de Gezondheidszorg CBO, 2004 ^[1] is chronische neuroborreliose een zeer zeldzame voorkomende aandoening, waarbij altijd sprake is van aanwezigheid van antistoffen in het bloed in combinatie met intrathecaal antistofproductie en veelal lymfocyttaire pleiocytose.

De patiënten met verdenking op chronische neuroborreliose wordt aanbevolen om antistoffen tegen *Borrelia burgdorferi* in het bloed en de liquor cerebrospinalis te bepalen. (pagina 57, aanbeveling 26). Verder wordt gesteld dat bij neuroborreliose veelal lymfocyttaire pleiocytose en een al dan niet een verhoogd eiwitgehalte aanwezig is.

De aanwezigheid van antilichamen moet zowel in serum als in CSF bepaald worden om er zeker van te zijn dat de antilichamen intrathecaal geproduceerd zijn en niet door de bloed-hersenbarrière (BHB) zijn geëkt. Volgens de EUCALB^[2] / MiQ 12: Lyme borreliosis^[7] richtlijnen dient voor een significante verhoging van het aantal antilichamen in het CSF ten opzichte van serum, en daarmee duidende op intrathecale productie, de antilichaam index (AI) ten minste groter te zijn dan twee. De AI wordt hier als volgt berekend:

$$AI = \frac{EIA \text{ units in CSF}}{EIA \text{ units in serum}}$$

Hierbij staat EIA units voor enzyme immunoassay units, waarmee hier het aantal Lyme-borreliose specifieke antilichamen wordt bedoeld. Deze kunnen kwantitatief bepaald worden. Het serum en CSF moeten gelijk verdund worden, zodat de verdunning een meting geeft in het lineaire deel van de standaard curve.

De diagnose voor neuroborreliose berust hier dus op de uitslag van de immunologische test. Echter de diagnose van Lyme-borreliose moet volgens de CBO richtlijn op de klinische gegevens berusten en is de bloedtest slechts een hulpmiddel vanwege de onnauwkeurigheid van de testen. Voor het vaststellen van neuroborreliose worden echter dezelfde testen gebruikt voor de bepaling van antilichamen in het serum en CSF.

De CBO aanbeveling is gebaseerd op de volgende vijf referenties:

- Hansen K, Lebech AM.
The clinical and epidemiological profile of Lyme neuroborreliosis in Denmark 1985-1990. A prospective study of 187 patients with *Borrelia burgdorferi* specific intrathecal antibody production.
Brain 1992;15:399-423.
- EUCALB 2002. Internet: <http://vie.dis.strath.ac.uk/vie/LymeEU/index.htm>.
- Ackermann R, Rehse-Kupper B, Gollmer E, Schmidt R.
Chronic neurologic manifestations of erythema migrans borreliosis.
Ann NY Acad Sci 1988;539:16-23.
- Logigian EL, Steere AC.
Clinical and electrophysiologic findings in chronic neuropathy of Lyme disease.
*Neurology*1992;42:303-11.
- Logigian EL, Kaplan RF, Steere AC.
Chronic neurologic manifestations of Lyme disease.
N Engl J Med 1990;323(21):1438-44.

Logisch zou zijn dat de aangegeven AI waarde van ≥ 2 gekoppeld zou zijn aan een voorgeschreven methode. Dit is echter niet het geval en daarom is het interessant om te weten hoe de bepaling in de verschillende referenties gedaan werd.

Hansen^[3] hanteert een eigen methode voor de antilichaambepaling die gebaseerd is op het flagelline p41 van de *Borrelia afzelii* DK1.

Zowel in de Amerikaanse CDC richtlijnen als de Duitse MiQ wordt het p41 in de WB niet meegeteld (voor Amerika alleen p 41 *B.burgdorferi* s.s.), omdat dit antigeen niet specifiek is voor *Borrelia burgdorferi* en veelal kruisreactie geeft. Hansen hanteert verder geen berekening van tenminste twee, maar de AI wordt bepaald volgens:

$$AI = \frac{OD-CSF}{OD-serum} \cdot (OD-CSF - OD-serum)$$

OD staat hier voor Optical Density en is een maat voor de hoeveelheid antilichamen. Er wordt aangenomen dat intrathecaal synthese van antilichamen heeft plaatsgevonden wanneer het netto OD-verschil tussen CSF en serum groter is dan drie maal de standaarddeviatie. In dit geval worden intrathecale antilichamen aangetoond wanneer de $AI \geq 0,3$ is.

Volgens deze methode is bij 100% patiënten in de gerefereerde studie het CSF positief bevonden, hetgeen dus de diagnose neuroborreliose betekent. Op deze studie baseert de CBO dus haar aanbeveling. Echter in een eerdere studie van Hansen et al.^[44] uit 1991 kwamen zij tot andere resultaten. Bij 100 neuroborreliose patiënten hadden 84% een IgG en 57% een IgM positief resultaat in het serum en 79% een positieve IgG en 55% een positieve IgM in het CSF. Tevens was één serummonster en waren twee CSF monsters van twee patiënten slechts licht verhoogd IgG (0,16-0,27) dus kleiner de grenswaarde van 0,3.

Ackermann et al.^[4] gebruikten eveneens een eigen ELISA methode gebaseerd op de *Borrelia garinii* stam. Zij vonden bij alle patiënten met neurologische symptomen een hoger gehalte aan antilichamen in de liquor. Hij maakt echter geen gebruik van de $AI \geq 2$ maar geeft slechts aan dat het gehalte antilichamen in het CSF hoger is dan in het serum.

Logigian^[5] deed een lumbaalpunctie bij 20 patiënten met Lyme-borreliose en chronische perifere neuropathie. Al deze patiënten hadden immunologisch bewijs van blootstelling aan *Borrelia burgdorferi* en geen andere aanduidbare oorzaak van neuropathie. Neuropathie en encefalopathie kwamen bij 17 van deze patiënten voor en van deze 17 had 76% een abnormale CSF analyse: 47% had een verhoogde eiwitconcentratie, 41% bewijs van intrathecaal antilichaam synthese en slechts in één geval (5,9%) had pleiocytose in het CSF plaatsgevonden.

In de tweede studie van Logigian^[6] waar de CBO richtlijn naar refereert, komt hij tot de volgende gegevens. De studie werd gedaan met 27 patiënten, waarbij gedacht werd dat hun neurologische abnormaliteit veroorzaakt werden door een *Borrelia burgdorferi*. Allen hadden voordien aanwijzingen voor Lyme-borreliose, hadden neurologische symptomen voor minstens drie maanden waar geen andere oorzaak voor was en allen hadden bewijs van humorale of cellulaire immuniteit tegen *Borrelia burgdorferi*. Hiervan hadden 24 patiënten encefalopathie, waarbij 21 een verhoogde IgG antilichaamrespons tegen *Borrelia burgdorferi* in het serum. Bij 46% was er sprake van intrathecaal antilichaam synthese en een verhoogde eiwit concentratie in het CSF kwam ook bij 46% voor. Pleiocytose in het CSF kwam bij één patiënt voor.

Twee van bovenstaande referenties komen dus niet tot de conclusie dat bij neuroborreliose altijd intrathecale antilichamen aanwezig zijn. Bovendien worden bij de verschillende referenties verschillende detectiemethoden en verschillende *Borrelia burgdorferi* stammen gebruikt.

De EUCALB geeft geen methode van onderzoek aan, maar wel de berekening van $AI \geq 2$ en verwijst naar de MiQ.12 2000^[7]. De Duitse MiQ12 2000 geeft een grenswaarde van ≥ 2 aan als duidelijk significant dat er intrathecale antilichamen zijn geproduceerd De waarde van ≥ 2 is echter willekeurig gekozen omwille van de

specificiteit. Immers een AI van >1 en zelfs van <1 zou kunnen voldoen, indien men bedenkt dat hier niet de bacterie maar de vrije antilichamen bepaald wordt. Een AI van <1 laat zich echter wel bepalen met ELISA, maar differentieert hierbij niet tussen autochtone en geëkte antilichamen.

De MiQ en de EUCALB geven geen methode aan voor de bepaling van antilichamen tegen *B. burgdorferi* maar stellen dat er commerciële ELISA testen verkrijgbaar zijn op basis van het flagelline. Een commerciële test die ook door Hansen gebruikt werd, is die op basis van het flagelline 41kDa van *B. burgdorferi* s.s. van DAKO uit Denemarken. In een onderzoek van Oksi et al.^[8] werden drie ELISA kits met elkaar vergeleken. Het betrof hier een ELISA gebaseerd op gesonificeerde *B. burgdorferi* B31, een kit voor het aantonen van de antilichamen tegen het 41kDa flagellin van *B. burgdorferi* van DAKO Denemarken en een kit tegen het recombinant p39 van General Biometrics. Alleen cultuur- of PCR positieve patiënten bevonden zich in de studie en de volgende resultaten werden behaald: een sensitiviteit voor het gesonificeerde antigeen van 78%, een sensitiviteit van 41,5% voor het 41kDa flagellin en 14,6% voor het p39 eiwit. De specificiteit was resp. 89,2%, 86,5% en 94,6%

De Amerikaanse CDC richtlijn^[9] geeft dan ook voor de diagnose van neuroborreliose aan, dat gezien de verschillende resultaten een antilichaambepaling in het CSF niet zinvol is voor de diagnose van neuroborreliose. In een studie van Coyle et al.^[45] hadden 35 patiënten antigenen OspA van *B. burgdorferi* in het CSF, maar kon slechts bij 43% ook antilichamen worden aangetoond in het CSF. De CDC ziet neuroborreliose dan ook als een klinische diagnose.

Indien zoals gesteld in de CBO richtlijn bij neuroborreliose altijd intrathecale antilichamen aanwezig zijn, kan men de volgende vragen stellen.

Betekent dit dat alle neuroborreliose patiënten dezelfde immuunreactie hebben? Zeer waarschijnlijk is dat niet. Vooral bij co-infecties en immuundeficiëntie is dit niet het geval. Ook medicijn gebruik zoals corticosteroiden kunnen het immuunsysteem onderdrukken.

Brorson^[11] stelde pleomorfisme vast naar cystvormen van *Borrelia* bacteriën zodra deze in een ongunstig milieu kwamen. *Borrelia* bacteriën in vitro in het CSF gebracht veranderde binnen 24 uur in cystvormen. Deze cystvormen hebben geen antigenen presentatie waardoor geen immuunrespons volgt. Bracht men deze cystvormen in een gunstig kweekmilieu, dan muteerden de bacteriën terug. Er zijn ook patiënten die geen antilichamen produceren en Donta^[43] stelde vast dat 20% van de patiënten seronegatief waren in zijn studie.

Betekent dit dat er bij neuroborreliose altijd een hoger gehalte aan vrije antilichamen in het CSF dan in het serum aanwezig is? Zeer waarschijnlijk niet, omdat ook lagere gehalten kunnen voorkomen, maar voor het gemak van het uitsluiten van antilichaamlekkage door de bloedhersenbarrière hanteert men de regel dat het meer moet zijn dan in het serum. De vraag is dan tevens waarom voor een grenswaarde van ≥ 2 wordt gekozen. Door de grenswaarde niet bij ≥ 1 maar bij ≥ 2 te leggen, wordt de specificiteit van de methode verhoogd maar de sensitiviteit verlaagd.

In een zeer recent uitgevoerde studie van Lakos et al.^[46] gebruikt men een andere methode om vast te stellen of er sprake is van intrathecale antilichamen bij neuroborreliose. Men doet geen ELISA van het serum en CSF, maar een western blot test en vergelijkt de bandpatronen, een verschil in bandpatronen tussen het serum en CSF duidt op intrathecale synthese van antilichamen. Op deze manier sluit men de berekening van de AI uit. In dit geval met de western blot kan men een autochtone immuunreactie aantonen, zelfs als de relatieve hoeveelheid van specifieke IgG antilichamen in het CSF en het serum ongeveer gelijk zijn en de berekeningsmethode faalt om een specifieke intrathecale synthese aan te tonen.

Betekent dit dat er altijd vrije antilichamen aanwezig zijn bij neuroborreliose patiënten? Zeer waarschijnlijk niet. In een studie van Tylewska et al.^[10] stelden ze vast dat mensen met levende spirochetes vaak geen vrije antilichamen bezitten. Door middel van PCR en kweek konden zij *Borrelia* aantonen in serum en CSF bij patiënten die geen aantoonbare antilichamen bezaten. Vaak komen antilichamen voor als complexen en kunnen dan niet gedetecteerd worden. Schutzer et al.^[47] toonden aan dat van 11 patiënten met een EM op het moment van de test, 10 patiënten specifieke antilichaam complexen tegen *Borrelia burgdorferi* of recombinant OspA hadden gevormd. Vrij IgM tegen OspA kwam slechts in de helft van de gevallen voor. Maraspin et al.^[48] vonden bij een groep patiënten met multiple erythema migrans in 31% afwijkingen van het CSF, waarbij 7,5% lymfocyttaire pleiocytose had, 26% een verhoogd eiwitgehalte en 4% de productie van intrathecale antilichamen.

Betekent dit dat indien er vrije antilichamen aanwezig zijn, deze dan ook altijd met iedere methode en door elk laboratorium worden aangetoond? Dit is eveneens zeer onwaarschijnlijk omdat er verschillende factoren zijn die een negatief resultaat kunnen veroorzaken zoals;

- Een recente infectie, nog geen immuunrespons;
- Antilichamen komen als immuuncomplexen voor;
- Spirochetes zijn ingekapseld, geen antigenenexpressie zichtbaar;
- Spirochetes zijn diep in het weefsel en niet zichtbaar voor het immuunsysteem;
- Alleen CWD vormen zijn aanwezig;
- De passende antigenen zijn niet in het testmengsel;
- Antigenenvariabiliteit;
- Recente antibioticakuur;
- Recente anti-inflammatoire behandeling;
- Andere oorzaken voor immuunsuppressie;
- Laboratorium met onvoldoende vaardigheid voor Lyme-borreliose testen;
- Laboratoriumtest met verkeerde stam niet overeenkomend met het endemisch gebied;
- Patiënt heeft andere stam dan test, infectie opgelopen in ander gebied;
- Cut-off te hoog gezet;
- Gebruik van slechte sjablonen, niet alle relevante banden aanwezig;
- Verdunning te hoog gezet;
- Testen zijn niet sensitief en specifiek genoeg;
- Gebruik van criteria voor beoordeling.

Doordat er geen standaardisatie van methoden is, leidt dit tot gebruik van ELISA methoden die uitgaan van verschillende genospecies of wel verschillende antigenen mengsels. Omdat er geen wettelijke eisen gesteld worden aan dit soort testen kan zowel de sensitiviteit als de specificiteit van test tot test zeer verschillend zijn.

In de verschillende ringonderzoeken waarbij laboratoria getest werden laten de resultaten een slechte prestatie zien.

In een eerste ringonderzoek gedaan door Bakken et al.^[12] resulteerde dat slechts 45% van de deelnemende laboratoria de serummonster juist bepaalde op antilichamen tegen *B. burgdorferi*. In een vervolgstudie gedurende drie jaar met 516 laboratoria was de specificiteit van de Lyme-borreliose testen gedaald van $\pm 95\%$ naar $\pm 81\%$. De sensitiviteit fluctueerde hierbij tussen de 93 en 75%.

In een studie geven Hunfeld et al.^[49] aan dat in een ringtest met tussen de 226 en 337 laboratoria de nauwkeurigheid van de methode voor de ELISA tussen de 13 en 98% lag. De conclusie van deze studie was dat fabrikanten van kits verplicht moeten worden een meer gedetailleerde klinische evaluatie te doen van hun kits voordat ze hun product op de markt brengen. Tevens dienen ze hun gepubliceerde evaluatie gegevens bekend te maken aan de gebruikers van zulke testkits.

Gezien de behaalde resultaten in deze studie vinden zij dat verdere standaardisatie van de Lyme-borreliose serologie niet alleen wenselijk, maar dringend noodzakelijk is.

Bovendien moeten er strengere criteria voor de validatie van de beschikbare testkits toegepast worden.

Er zijn ongeveer 25 verschillende commerciële kits. In een onderzoek van Goossens et al.^[13] aan de Universiteit van Maastricht werden vijftien verschillende commerciële kits voor het aantonen van antilichamen tegen *Borrelia* met elkaar vergeleken. De test werd gebruikt voor de verschillende Lyme-borreliose stadia met een sensitiviteit voor de ELISA IgM in vroege Lyme van 31 tot 81% en in late Lyme van 46 tot 69%. De specificiteit in de controlegroep was 89 tot 75%. De resultaten voor de IgG sensitiviteit waren voor late Lyme tussen de 54 en 92% en voor de vroege Lyme tussen de 31 en 69%. De specificiteit van de IgG lag tussen de 84 en 98%. Aan de gestelde eisen waaraan een ELISA screeningstest moet voldoen m.b.t. de specificiteit van 95% voldeden slechts drie kits van de acht, waarbij voor deze drie kits de sensitiviteit lag tussen de 46 en 77%.

Voor de geteste commerciële western blot testen was de maximale sensitiviteit voor IgM in vroege Lyme en IgG in late Lyme resp. 50 en 46%.

Recente studies met commerciële kits van de nieuwe generatie met recombinanten laten helaas nog duidelijke tekortkomingen zien.

In een vergelijkend onderzoek van twee ELISA en drie western blot testen komen Marangoni et al.^[14] tot de volgende gegevens. De Anti-Borrelia plus VlsE ELISA IgG had in het slechtste geval een sensitiviteit van 56,6% en de Quick ELISA C6 (deze test maakt geen onderscheid tussen IgM en IgG) een sensitiviteit van 33,3%. De specificiteit voor de Anti-Borrelia plus VlsE ELISA was 98,5% voor IgG en 78,5% voor IgM, die voor de Quick ELISA C6 bedroeg 98,5%.

Bij de geteste western blot kits had de Euroline-WB IgG een sensitiviteit van 68,3% en de Qualicode B IgG een sensitiviteit van slechts 26,6%. De specificiteit voor de Qualicode B was 100% en voor de Euroline-WG IgG 80%.

In een tweede studie van Marangoni et al.^[15] werden drie verschillende ELISA methoden met elkaar vergeleken bij vroege Lyme. De sensitiviteit was als volgt; Enzygnost IgM 70,5%, Quick ELISA C6 *Borrelia* 62,1%, recomWell *Borrelia* IgM 55,7%, recomWell *Borrelia* IgG 57,9% en Enzygnost *Borreliosis* IgG 36,8%

5. Conclusie

Uit de literatuurstudie kan geconcludeerd worden dat niet altijd aantoonbare vrije antilichamen in de liquor aanwezig zijn bij neuroborreliose patiënten.

De commerciële testkits laten een grote verscheidenheid zien aan sensitiviteit en specificiteit.

Door de bovenstaande tekortkomingen is er een reële kans dat patiënten met neuroborreliose op basis van de testuitslag een verkeerde diagnose krijgen.

De literatuurstudie laat zien, dat met de huidige tests de waarde van de laboratoriumdiagnostiek bij neuroborreliose van beperkte waarde is en dat het misschien beter is, zoals de CDC voorstelt, dat van een dergelijke test wordt afgezien en dat de diagnose van neuroborreliose gesteld wordt op basis van klinische gegevens.

De CBO richtlijn is voor de diagnose van neuroborreliose te rigide. Verder onderzoek naar andere merkers zou gewenst zijn voor een betrouwbare diagnostiek bij neuroborreliose.

6. Referenties

1. CBO Richtlijn Lyme-borrelieose. Internet: <http://www.cbo.nl/product/richtlijnen/folder20021023121843/lymebor2004.pdf?>
2. EUCALB 2002. Internet: <http://vie.dis.strath.ac.uk/vie/LymeEU/index.htm>
3. Hansen K, Lebech A.
The clinical and epidemiological profile of Lyme neuroborreliosis in Denmark 1985-1990. A prospective study of 187 patients with *Borrelia burgdorferi* specific intrathecal antibody production.
Brain 1992;15:399-423
4. Ackermann R, Rehse-Kupper B, Gollmer E, Schmidt R.
Chronic neurologic manifestations of erythema migrans borreliosis.
Ann N Y Acad Sci 1988;539:16-23.
5. Logigian EL, Steere AC.
Clinical and electrophysiologic findings in chronic neuropathy of Lyme disease. *Neurology*1992;42:303-11.
6. Logigian EL, Kaplan RF, Steere AC.
Chronic neurologic manifestations of Lyme disease.
N Engl J Med 1990;323(21):1438-44.
7. MiQ 12 2000. Internet: <http://pollux.mpk.med.uni-muenchen.de/alpha1/nrz-borrelia>
8. Oski J, Uksila J, Marjamäki M, Nikoskelainen
Antibodies against Whole Sonicated *Borrelia burgdorferi* Spirochetes, 41-Kilodalton Flagellin, and P39 Protein in Patients with PCR- or Culture-Proven Late Lyme Borreliosis
Journal of Clinical Microbiology, Sept 1995, p. 2260-2264.
9. CDC richtlijn. Internet: <http://www.annals.org/cgi/content/full/127/12/1109>
10. Tylewska-Wierzbanowska S, Chmielewski T.
Limitation of serological testing for Lyme borreliose: Evaluation of ELISA and Western blot in comparison with PCR and culture methods.
Wien Klin Wochenschr (2002) 114/13-14: 601-605.
11. Brorson O, Brorson SH.
In vitro conversion of *Borrelia burgdorferi* to cystic forms in spinal fluid, and transformation to mobile spirochetes by incubation in BSK-H medium.
Infection. 1998 May-Jun;26(3):144-50.
12. Bakken LL, Callister SM, Wand PJ, Schell RF.
Interlaboratory comparison of test results for detection of Lyme disease by 516 participants in the Wisconsin State Laboratory of Hygiene/College of American pathologists proficiency testing program.
Journal of Clinical Microbiology, Mar. 1997, p. 537-543
13. Goossens HAT, Van den Bogaard AE, Nohlmans MKE.
Evaluation of fifteen commercially available serological tests for diagnosis of Lyme Borreliosis.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis (1999) 18:551-560.
14. Marangoni A, Sparacino M, Mondardini V, Cavrini F, Storni E, Donati M, Cevenini R, Sambri V.
Comparative evaluation of two enzyme linked immunosorbent assay methods and three Western Blot methods for the diagnosis of culture-confirmed early Lyme Borreliosis in Italy.
The New Microbiologica, 28, 27-33, 2005.
15. Marangoni A, Sparacino M, Cavrini F, Storni E, Mondardini V, Sambri V, Cevenini R.
Comparative evaluation of three different ELISA methods for the diagnosis of early culture-confirmed Lyme disease in Italy.
Journal of Medical Microbiology (2005), 54, 1-8.
16. Akin E, Aversa J, Steere AC.
Expression of adhesion molecules in synovia of patients with treatment-resistant lyme arthritis.
Infect Immun. 2001 Mar;69(3):1774-80.
17. Hobusch D, Christen HJ, Huppertz HI, Noack R.
Diagnostik und Therapie der Lyme-Borreliose im Kindesalter
Monatsschr Kinderheilkd 1999, 147:800-805.

18. Lipsker D, Hansmann Y, Limbach F, Clerc C, Tranchant C, Grunenberger F, Caro-Sampara F, Attali P, Frey M, Kubina M, Piemont Y, Sibilia J, Jaulhac B; GEELY Study Group. Study Group for Lyme Borreliosis. Disease expression of Lyme borreliosis in northeastern France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001 Apr;20(4):225-30.
19. Clark JR, Carlson RD, Sasaki CT, Pachner AR, Steere AC. Facial paralysis in Lyme disease. *Laryngoscope*. 1985 Nov;95(11):1341-5
20. FDA. Internet: <http://www.fda.gov/medbull/summer99/lyme.html>
21. Lieber M'bomeyo A, Hedelin G, Lipsker D. The level of knowledge of general practitioners regarding the early phase of Lyme borreliosis. Survey conducted among 106 general practitioners *Presse Med*. 2003 Nov 22;32(37 Pt 1):1734-6.
22. Kuiper H, Cairo I, Van Dam A, De Jongh B, Ramselaar T, Spanjaard L, Dankert J. Solitary erythema migrans: a clinical, laboratory and epidemiological study of 77 Dutch patients. *Br J Dermatol*. 1994 Apr;130(4):466-72.
23. RIVM. Internet: <http://www.rivm.nl/infectieziektenbulletin/bul97/abstrvvi.htm>
24. Donta ST. Late and chronic Lyme disease *Med Clin North Am* 2002 Mar;86(2):341-9, vii.
25. Dressler F, Ackermann R, Steere AC. Antibody responses to the three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* in European Lyme borreliosis. *J Infect Dis*. 1994 Feb;169(2):313-8.
26. IGeneX, Inc. Internet: <http://www.igenex.com/lymeset4.htm>
27. Misonne M, Van Impe G, Hoet PP. Genetic Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in *Ixodes ricinus* Ticks Collected in Belgium *Journal of Clinical Microbiology*, Nov. 1998, p. 3352-3354 Vol. 36, No. 11
28. Norman GL, Antig JM, Bigaigon G, Hogrefe WR. Serodiagnosis of Lyme Borreliosis by *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto, *B. garinii*, and *B. afzelii* Western Blots (Immunoblots) *Journal of Clinical Microbiology*, July 1996, p. 1732-1738 Vol. 34, No. 7
29. Ornstein K, Berglund J, Nilsson I, Norrby R, Bergström S. Characterization of Lyme Borreliosis Isolates from Patients with Erythema Migrans and Neuroborreliosis in Southern Sweden *Journal of Clinical Microbiology*, Apr. 2001, p. 1294-1298 Vol. 39, No. 4
30. Hardin JA, Walker LC, Steere AC, Trumble TC, Tung KSK, Williams Jr. RC, Ruddy S, Malawista SE. Circulating Immune Complexes in Lyme Arthritis. *J. Clin. Invest*. Volume 63 March 1979 468-477
31. Brunner M, Sigal LH. Use of Serum Immune Complexes in a New Test That Accurately Confirms Early Lyme Disease and Active Infection with *Borrelia burgdorferi* *Journal of Clinical Microbiology*, Sept. 2001, p. 3213-3221 Vol. 39, No. 9
32. Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J Infect Dis*. 1993 Feb;167(2):392-400.
33. Engstrom SM, Shoop E, Johnson RC. Immunoblot Interpretation Criteria for Serodiagnosis of Early Lyme Disease *Journal of Clinical Microbiology*, Feb. 1995, p. 419-427
34. Marconi RT, Hohenberger S, Jauris-Heipke S, Schulte-Spechtel U, Lavoie CP, Rößler D, Wilske B. Genetic Analysis of *Borrelia garinii* OspA Serotype 4 Strains Associated with Neuroborreliosis: Evidence for Extensive Genetic Homogeneity *Journal of Clinical Microbiology*, Dec. 1999, p. 3965-3970 Vol. 37, No. 12

35. Hauser U, Lehnert G, Lobentanzer R, Wilske B
Interpretation criteria for standardized Western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato
Journal of Clinical Microbiology, Jun 1997, 1433-1444, Vol 35, No. 6
36. Robertson J, Guy E, Andrews N, Wilske B, Anda P, Granström M, Hauser U, Moosmann Y, Sambri V, Schellekens J, Stanek G, Gray J.
A European Multicenter Study of Immunoblotting in Serodiagnosis of Lyme Borreliosis
Journal of Clinical Microbiology, June 2000, p. 2097-2102, Vol. 38, No. 6
37. Jovicic VLj, Grego EM, Lako BL, Ristic BM, Lepsanovic ZA, Stajkovic NT.
Improved serodiagnosis of early Lyme borreliosis: immunoblot with local *Borrelia afzelii* strain.
APMIS. 2003 Nov;111(11):1053-9.
38. Nohlmans LMKE, De Boer R, Van den Bogaard AEJM, Van Boven CPA.
Genotypic and Phenotypic Analysis of *Borrelia burgdorferi* Isolates from The Netherlands
Journal of Clinical Microbiology, Jan. 1995, p. 119-125 Vol. 33, No. 1
39. Wilske B, Hauser U, Lehnert G, Jauris-Heipke S.
Genospecies and their influence on immunoblot results.
Wien Klin Wochenschr. 1998 Dec 23;110(24):882-5.
40. Hilton E, Devoti J, Sood S.
Recommendation To Include *OspA* and *OspB* in the New Immunoblotting Criteria for Serodiagnosis of Lyme Disease
Journal of Clinical Microbiology, June 1996, p. 1353-1354 Vol. 34, No. 6
41. Hunfeld K, Ernst M, Zachary P, Jaulhac B, Sonneborn H, Brade V.
Development and laboratory evaluation of a new recombinant ELISA for the serodiagnosis of Lyme disease
Wien Klin Wochenschr (2002) 114/13-14: 580-585
42. Liang FT, Steere AC, Marques AR, Johnson BJB, Miller JN, Philipp 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*
Dec. 1999, p. 3990-3996 Vol. 37, No. 12
43. Donta ST.
Tetracycline therapy for chronic Lyme disease.
Clin Infect Dis. 1997 Jul;25 Suppl 1:S52-6.
44. Hansen K, Lebech A.
Lyme Neuroborreliosis: A new sensitive diagnostic assay for intrathecal synthesis of *Borrelia burgdorferi*-specific immunoglobulin G, A, and M.
Ann. Neurol 1991;30:197-205
45. Coyle PK, Schutzer SE, Deng Z, Krupp LB, Belman AL, Benach JL, Luft BJ.
Detection of *Borrelia burgdorferi*-specific antigen in antibody-negative cerebrospinal fluid in neurologic Lyme disease.
Neurology. 1995 Nov;45(11):2010-5.
46. Lakos A, Ferenczi E, Komoly S, Granström M
Different B-cell populations are responsible for the peripheral and intrathecal antibody production in neuroborreliosis.
International Immunology, Vol 17, No 12, p. 1631-1637
47. Schutzer SE, Coyle PK, Dunn JJ, Luft BJ, Brunner M.
Early specific antibody response to *OspA* in Lyme disease.
J. Clin. Invest. Volume 94, July 1994, 454-457
48. Maraspin V, Cimperman J, Lotrič-Furlan S, Ružić-Sabljić E, Jurca T.
Cerebrospinal fluid findings in adult patients with multiple erythema migrans.
Wien Klin Wochenschr (2002) 114/13-14: 505-509
49. Hunfeld KP, Stanek G, Straube E, Hagedorn HJ, Schorner C, Muhlschlegel F, Brade V.
Quality of Lyme disease serology. Lessons from the German Proficiency Testing Program 1999-2001. A preliminary report.
Wien Klin Wochenschr. 2002 Jul 31;114(13-14):591-600.

Tevens zijn de volgende website's geraadpleegd:

- www.borreliose.nl
- www.lymemed.nl
- www.wikipedia.nl
- www.biology.arizona.edu
- www.saag.nl
- www.keac.nl
- www.biology.arizona.edu
- http://www.pasteur.fr/recherche/borrelia/Bb_strains_alphabetic.html