

NEDERLANDS TIJDSCHRIFT VOOR  
**MEDISCHE MICROBIOLOGIE**



Thema: Borrelia

Malariaonderzoek in Mali

Het genoom ligt op straat

Aankondiging Najaarsvergadering NVMM/VIZ

## Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie

Het Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie is het officiële orgaan van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM). Het doel van het tijdschrift is de lezers te informeren over ontwikkelingen betreffende het vakgebied. In het tijdschrift worden zowel fundamentele als klinische aspecten van de medische microbiologie belicht. Daarnaast biedt het plaats voor promoties e.d., nieuws over evenementen en mededelingen uit de (werkgroepen van de) vereniging.

### NVMM-secretariaat

Postbus 21020, 8900 JA Leeuwarden  
Tel. (058) 293 94 95  
Fax (058) 293 92 00  
E-mail: nvmm@knmg.nl  
Internet: www.nvmm.nl

### Hoofredactie

Dr. G. Andriess, dr. C.W. Ang

### Redactie

Mw. dr. I.A.J.M. Bakker-Woudenberg,  
dr. E. Boel, dr. A. Fleer,  
mw. dr. E. Heikens, mw. T. Herremans,  
mw. drs. M. Jager, dr. J.A. Kaan,  
dr. J.S. Kalpoe, dr. J.F.G.M. Meis,  
dr. M. Van Rijn, dr. C. Vink,  
dr. H.F.L. Wertheim

### Redactiesecretariaat

Van Zuiden Communications B.V.  
Mw. M.S. Kapteyn-Brus  
Tel. (0172) 476191, e-mail:  
kapteyn@vanzuidencommunications.nl

### Advertentie-exploitatie

Van Zuiden Communications B.V.  
Dhr. D. Mackay  
Tel. (0172) 47 61 91

### Oplage en frequentie

900 exemplaren, 4 x per jaar

### Abonnementen

Gratis voor leden van de NVMM en leden van de VIZ.  
Niet-leden NVMM of VIZ in Nederland: € 55,- per jaar  
Buiten Nederland, in Europa: 77,- per jaar  
Losse nummers: 12,50  
Opgave abonnementen:  
Tel. (0172) 47 61 91



© 2012, Van Zuiden Communications B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vervoerd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enige andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever. Uitgever en redactie verklaren dat deze uitgave op zorgvuldige wijze en naar beste weten is samengesteld; evenwel kunnen uitgever en redactie op geen enkele wijze instaan voor de juistheid of volledigheid van de informatie. Uitgever en redactie aanvaarden dan ook geen enkele aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die het gevolg is van bedoelde informatie. Gebruikers van deze uitgave wordt met nadruk aangeraden deze informatie niet geïsoleerd te gebruiken, maar af te gaan op hun professionele kennis en ervaring en de te gebruiken informatie te controleren.

### Algemene voorwaarden

Op alle aanbiedingen, offertes en overeenkomsten van Van Zuiden Communications B.V. zijn van toepassing de voorwaarden die zijn gedeponeerd bij de Kamer van Koophandel te Leiden.

ISSN 0929-0176



# Inhoud

<b>Van de redactie</b>	95
<b>Transmissieroute</b>	97
<i>E. Bowles</i>	
<b>Artikelen</b>	
Interferon-gamma – centrale speler in de beschermende afweer tegen malaria	98
<i>M.B.B. Mc Call</i>	
<b>Thema: Borrelia</b>	
Lymediagnostiek, een gezamenlijke inspanning is vereist	104
<i>H. Bijlmer</i>	
Interlaboratoriumvariatie van de serologie voor de ziekte van Lyme in Nederland	105
<i>N.D. van Burgel, A.H. Brandenburg, B. Meijer, F. Verduyn Lunel, M. Nabuurs-Franssen, F.F. Stelma, C.W. Ang, A.P. van Dam, H.A. Bijlmer namens het Consensusberaad Lyme</i>	
Nationale vergelijking van serologische assays voor het aantonen van Borrelia-antistoffen	111
<i>C.W. Ang, A.H. Brandenburg, N.D. van Burgel, H.A. Bijlmer, T. Herremans, F.F. Stelma, F. Verduyn Lunel, A.P. van Dam, namens het Consensusberaad Lyme</i>	
Borrelia-serologie in de Nederlandse situatie: interpretatie van testuitslagen en ontwikkelingen	120
<i>C.W. Ang, N.D. van Burgel</i>	
Diagnostische (on)mogelijkheden bij Borrelia-infecties	126
<i>C.W. Ang</i>	
Detectie van Borrelia burgdorferi s.l.-specifieke immuuncomplexen in patiënten met erythema migrans en neuroborreliose	130
<i>F.J.H.B. van Nunen, H. Sprong, A. Hofhuis, H.A. Bijlmer, T. Herremans</i>	
<b>Verenigingsnieuws</b>	
Wetenschappelijke Najaarsvergadering NVMM en VIZ	134
<i>CBG</i>	
Pseudomonas-behandeling bij cystic-fibrosepatiënten. Oude stoffen in een nieuw jasje	135
<i>B. Voordouw, A. Vollaard, R. Bijleveld</i>	
<b>Ingezonden</b>	
Het genoom ligt op straat	137
<i>J. Kaan</i>	
Cursusaankondiging	138
Promoties en oratie	139
Agenda	140

Foto omslag: Loes van Damme (l.h.vandamme@erasmusmc.nl) en Hans den Boer (j.denboer@erasmusmc.nl)  
Erasmus MC, Afdeling Medische Microbiologie & Infectieziekten,  
Postbus 2040, 3000 CA, Rotterdam.

## Borrelia: tweespalt of consensus?

In deze uitgave van het *Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie (NTMM)* staat *Borrelia* min of meer centraal. Het reviewproces bij deze artikelen was nogal een 'uitdaging': vrijwel alle Nederlandse *Borrelia*-experts waren op een of andere wijze betrokken bij het stand komen van deze artikelen en konden dus niet als 'onafhankelijk reviewer' worden aangemerkt. Dit werd verder gecompliceerd doordat mijn collega-hoofdredacteur één van deze experts is. De uitdaging was dus om collega's 'uit het veld' op te sporen die enigszins toegepaste '*Borrelia*-ervaring' hebben en dan maar hopen dat men gelegenheid heeft om de taak van reviewer op zich te nemen. Om ook binnen de redactie 'onafhankelijkheidsissues' te voorkomen was vooraf afgesproken dat mijn collega hoofdredacteur geen enkele rol zou spelen in het regisseren van het reviewproces. Gaandeweg realiseer je weer hoe beladen het onderwerp *Borrelia* is. De meningen over diagnose en behandeling van *Borrelia* lopen niet alleen in Nederland uiteen, maar ook in de VS is sprake van ouderwetse tweespalt. Zelf ben ik geen expert op *Borrelia*-terrein, maar zoekend op internet kom je er al snel achter: in de VS heb je de IDSA (Infectious Diseases Society of America) versus de ILADS (International Lyme And Associated Diseases Society). De CDC verwijst naar de IDSA en lijkt daarmee de meest

gezaghebbende richtlijn te hebben. Het bijzondere is echter dat zowel de IDSA als de ILADS organisaties zijn die bestaan uit medici. Het is dus niet een verschil van mening tussen een professionele wetenschappelijke organisatie en een patiëntenvereniging, maar binnen de eigen beroepsgroep. Hoewel er tot nu toe in Nederland sprake was van één formele Lyme-richtlijn (CBO), is op internet het wantrouwen snel te vinden: de Nederlandse Vereniging voor Lyme patiënten stelt op haar website letterlijk: "Het kan zinvol zijn om meerdere laboratoria te proberen vanwege vaak wisselende testuitslagen." Het is niet moeilijk je voor te stellen dat patiënten, maar ook medici, dit gebrek aan consensus opmerken en in verwarring achterblijven. Het is dus niet alleen van belang dat er één wetenschappelijke discussie gevoerd wordt door alle *Borrelia*-experts (met één richtlijn als resultaat), maar het moet bovendien voor iedereen duidelijk zijn wie de gezaghebbende experts zijn. Dat laatste is misschien wel het belangrijkste in de huidige wikipediawereld. Hopelijk draagt het NTMM op een positieve manier bij aan deze discussie.

Veel leesplezier,  
Gunnar Andriessse, hoofdredacteur

# Big is Beautiful?

E. Bowles

Schaalvergroting is het gesprek van de dag in microbiologisch Nederland. Volgens sommigen heeft Nederland maar vijf microbiologische laboratoria nodig. Diagnostiek moet goedkoper en sneller. Zal het ook lukken om de kwaliteit beter te krijgen? Of op zijn minst te zorgen dat die niet slechter wordt? En hoe ziet infectiepreventie eruit als de diagnostiek wordt gedaan in een laboratorium ver weg van de kliniek?

Een enkele keer vind je een onverwachte MRSA in een klinische kweek van een patiënt die al weken in het ziekenhuis ligt, die op vier verschillende afdelingen is verpleegd, die tweemaal is geopereerd en ook nog een paar nachties op IC heeft doorgebracht. Eenieder die zich weleens met contactonderzoeken heeft beziggehouden, voelt bij zo'n verhaal de hoofdpijn al opkomen.

In de loop van een aantal maanden hadden we in ons ziekenhuis een paar van zulke patiënten. De Deskundigen Infectie Preventie (DIP's) gingen aan de slag om alle contacten te traceren en de thuissituatie in kaart te brengen. Het viel op dat de contactonderzoeken steeds naar verpleeghuizen leidden. In onze regio zijn een heleboel verpleeghuizen, en steeds ging het om een ander huis.

Zo'n verpleeghuis werd op de hoogte gesteld. Het startte in overleg met ons en de GGD een contactonderzoek en de dragers werden door de verpleeghuisarts al dan niet behandeld. Enkele bewoners en medewerkers doken meerdere malen op in contactonderzoeken van verschillende inpatiënten in verschillende verpleeghuizen.

De Nederlandse verpleeghuizen zijn al jaren geleden de weg van schaalvergroting ingeslagen. Vele zelfstandige verpleeg- en verzorgingshuizen zijn inmiddels gezamenlijk ondergebracht in zorggroepen met gedeeld management. Dat scheelt een boel bestuurders, directeuren en managers. Bovendien kunnen personeel en bewoners makkelijk tussen de verschillende locaties heen en weer geschoven worden. Handig om flexibel te zijn in tijden van economische recessie.

Maar wat gebeurt er als er een uitbraak is die zich over verschillende locaties uitstrekt? Wie coördineert het contactonderzoek? Wie zorgt ervoor dat de medewerker die op de ene locatie MRSA heeft opgelopen niet gewoon op de andere locatie weer aan het werk gaat? Wie zorgt dat de bewoners gedecontamineerd worden? En de medewerkers? Wie houdt de contactlijst bij? Wat is de rol van de GGD hierin?

Gaandeweg werd ons duidelijk dat bij het management van de verpleeghuizen de coördinatie en het overzicht ontbrak.

In een groot overleg waarbij het management van de zorggroep, de GGD en onze afdeling Medische Microbiologie en Infectiepreventie aanwezig waren hebben we de omvang van het probleem geschetst.

De zorggroep was onder de indruk en heeft de kwestie zeer voortvarend opgepakt. Ze hebben een extern infectiepreventiebureau ingeschakeld om het probleem in kaart te brengen en de verschillende locaties één voor één schoon te verklaren.

In de tussentijd hebben wij als afdeling Microbiologie en Infectiepreventie in overleg met de ziekenhuisdirectie en de Raad van Bestuur besloten het ziekenhuis te behoeden voor nog meer tijd- en geldverslindende contactonderzoeken. Sinds enkele weken worden alle verpleeghuisbewoners die worden opgenomen aan de poort gescreend op MRSA en ESBL. In de paar weken dat we dat nu doen, hebben we al drie contactonderzoeken moeten starten. Door ons nieuwe beleid komen we er nu al binnen één of enkele dagen na opname achter, zodat de omvang van het contactonderzoek – en daarmee de mate van hoofdpijn – beperkt kan blijven.

Hoe zal dit straks gaan als er nog maar vijf microbiologische laboratoria in Nederland zijn? Wie signaleert dan dat er ergens misschien een probleem is? Wie houdt het overzicht van de contactonderzoeken? Hoe geeft de arts-microbioloog op afstand functioneel leiding aan de infectiepreventie, zoals in ons beroepsprofiel staat?

Big kan Beautiful zijn, als er maar oog blijft voor korte lijnen.

De Transmissieroute wordt voortgezet door Maarten Scholing, arts-microbioloog in het Onze Lieve Vrouwen Gasthuis in Amsterdam.

Correspondentieadres: E.C. Bowles, arts-microbioloog, Gelre Ziekenhuizen, Apeldoorn en Zutphen, e-mail: e.bowles@gelre.nl



# Interferon-gamma – centrale speler in de beschermende afweer tegen malaria

M.B.B. McCall

## Samenvatting

Een effectief vaccin tegen malaria is hoognodig, maar de ontwikkeling hiervan wordt vertraagd door ons onvolledig begrip van immuniteit tegen deze ziekte. In dit artikel wordt bewijs beschreven voor de centrale rol van de cellulaire cytokine interferon-gamma (IFN $\gamma$ ) in de beschermende afweer tegen de belangrijkste verwekker, *Plasmodium falciparum*. Dit werd onderzocht in twee tamelijk unieke settings: in veldstudies naar interetnische verschillen in vatbaarheid voor malaria en in het Gecontroleerde Humane Malaria-infectie (CHMI) -model. Veldstudies in ruraal Mali toonden aan dat de relatieve weerstand voor malaria van de Fulani-stam is gecorreleerd is met tienvoudig sterkere IFN $\gamma$ -responsen tegen *P. falciparum*, maar niet tegen andere humane pathogenen, dan bij de minder beschermde Dogon-stam.

CHMI's zijn een krachtig instrument voor het beantwoorden van onder meer basaal-immunologische vraagstellingen. Door vrijwilligers drie keer onder chloroquineprofyaxe bloot te stellen aan *P. falciparum*-geïnfecteerd muggen, bleken ze vervolgens zonder profylaxe volledig beschermd tegen een nieuwe infectie. Deze bescherming ging niet gepaard met antilichamen, maar wel met prominente cellulaire responsen bestaande uit IFN $\gamma$ -productie door zowel klassieke  $\alpha\beta$ T-cellen als  $\gamma\delta$ T-cellen en NK-cellen.

Gezamenlijk bepleiten deze bevindingen de inductie van sterke IFN $\gamma$ -responsen als een belangrijke doelstelling voor een succesvol malariavaccin.

## Trefwoorden

Malaria, *Plasmodium falciparum*, interferon-gamma

## Inleiding

Malaria wordt veroorzaakt door protozoa van het geslacht Plasmodium, waarvan de soort *P. falciparum* veruit de meeste dodelijke slachtoffers (> 600.000 per jaar) eist.<sup>1</sup> Met de komst, begin 21<sup>e</sup> eeuw, van betrouwbaardere preventie (insecticidegeïmpregneerde bednetten), diagnostiek (rapid diagnostic tests) en behandeling (artemisininegebaseerde combinatie therapie (ACT)), is de mortaliteit ten gevolge van malaria wereldwijd drastisch

gedaald.<sup>2</sup> Dat laat onverlet dat grote delen van de wereld, vooral Sub-Sahara Afrika, nog altijd (even) zwaar lijden onder het juk van deze ziekte. Daarbij komt nog dat oprukkende resistentie tegen ACT en insecticiden het behaalde resultaat in de toekomst teniet kunnen doen.<sup>3</sup>

Voor de verdere controle van malaria zijn dus additionele strategieën nodig, waarvan een effectief vaccin het belangrijkste zou zijn. Dat hiermee slechts langzaam vordering wordt gemaakt, heeft gedeeltelijk te maken met onze gebrekkige kennis van wat beschermende afweer tegen malaria eigenlijk inhoudt. In hoogendemische gebieden zoals tropisch Afrika, maken kinderen vanaf hun tweede levensjaar namelijk verschillende malaria-infecties per jaar door.<sup>4</sup> Als zij de eerste twee jaar overleven, is de kans dat ze bij een toekomstige infectie zullen overlijden ten gevolge van malaria afgenomen tot vrijwel nul. Na het doormaken van nog weer enkele infecties, wijkt langzaam ook het risico op ernstige vormen van de ziekte, zoals cerebrale malaria. Op den duur ontstaat er een situatie waarbij oudere kinderen bij een infectie alleen milde symptomen vertonen en (jong) volwassenen soms helemaal geen klachten hebben, hoewel er wel parasieten in hun bloedbaan aangetoond kunnen worden.<sup>5</sup> Dit verschijnsel wordt 'klinische semi-immuniteit' genoemd. Om de situatie nog ingewikkelder te maken, kan het (cellulaire) immuunsysteem zelf ook bijdragen aan de pathofysiologie van de ziekte, bijvoorbeeld bij cerebrale malaria.<sup>6</sup>

Om beter inzicht te krijgen in het gedrag van het cellulaire immuunsysteem bij malaria, bestudeerden wij dit probleem vanuit twee tamelijk bijzondere perspectieven (zie hieronder). Daarbij focusten wij in het bijzonder op de rol van de cytokine interferon-gamma (IFN $\gamma$ ), een centrale speler in het cellulaire afweersysteem. IFN $\gamma$  wordt geproduceerd door geactiveerde CD4<sup>+</sup>- en CD8<sup>+</sup>-T-cellen, maar ook door bijvoorbeeld NK-cellen en  $\gamma\delta$ T-cellen. Het heeft

Correspondentieadres: M.B.B. McCall, afdeling Medische Microbiologie & Infectieziekten, Erasmus MC, Postbus 2040, 3000 CA Rotterdam, e-mail: m.mccall@erasmusmc.nl

een sterk activerende werking op het immuunsysteem, vooral op monocyten/macrofagen; daarnaast stuurt het het immuunsysteem in de richting van een Th1-type-respons.<sup>7</sup> Een belangrijke rol voor IFN $\gamma$  in de afweer tegen malaria wordt gesuggereerd door onder meer muisexperimenten,<sup>8,9</sup> maar haar rol bij humane infecties staat nog ter discussie.

### Veldstudies

Een unieke ingang om op zoek te gaan naar beschermende immunologische factoren, is het bestuderen van interetnische verschillen in vatbaarheid voor malaria. De Fulani is een van oorsprong nomadische Noord-Afrikaanse bevolkingsgroep, die zich inmiddels gesetteld heeft in verschillende landen van de Sahel. Overal waar De Fulani wonen, lijken ze minder vatbaar te zijn voor malaria dan omwonende bevolkingsgroepen.<sup>10-12</sup>

Die verminderde vatbaarheid uit zich in een lagere incidentie van (klinische) malaria-episodes onder Fulani van alle leeftijden, evenals een lagere prevalentie van (asymptomatische) parasitaemie.<sup>10-11</sup> Voor zover is na te gaan, ligt de basis voor deze verminderde vatbaarheid noch in gedragsmatig factoren,<sup>11</sup> noch in 'klassieke' genetische factoren als sikkelceldragerschap of andere hemoglobi-nopathiën.<sup>13</sup> Wel is door onder meer het team van onze collega's aan de universiteit van Bamako (Mali) aangetoond dat de Fulani sterkere antilichaam (IgG)-responsen bezitten tegen de malariaparasiet, dan de naburige Dogon, hetgeen wijst op een immunologisch verschil.<sup>14,15</sup> Om dit verder uit te zoeken, besloten wij de cellulaire afweer, met name de IFN $\gamma$ -respons, van de Fulani in kaart te brengen.<sup>16</sup> In de loop van twee regen- en twee droge seizoenen verzamelden wij perifeer bloed mononucleaire cellen (PBMC's) van Fulani en Dogon woonachtig in de Dogon-vallei van Mali, die we vervolgens opwerkten in het dichtstbijzijnde laboratorium in het provincie-stadje Bandiagara – een hele onderneming, aangezien de Fulani/Dogon-dorpjes op minimaal drie uur rijden lagen over een zand/keiweg (figuur 1). Deze PBMC's stelden wij *in vitro* bloot aan malariaparasieten en na 24 uur incubatie maten we IFN $\gamma$  en andere cytokineproductie door middel van ELISA. De resultaten waren zwart-wit (figuur 2A): Fulani bleken een tienvoudig sterkere cellulaire (IFN $\gamma$ ) respons te maken tegen malariaparasieten dan de Dogon. Ook op individueel niveau bleek de sterkte van de IFN $\gamma$ -respons (invers) te correleren met de hoogte van eventuele parasitemie. Het meest merkwaardig was nog dat deze sterkere IFN $\gamma$ -capaciteit van de Fulani zich beperkte tot responsen tegen de malariaparasiet: tegen een panel van andere (bacteriële, mycobacteriële en fungale) pathogenen verschilden de Fulani en Dogon niet in hun respons (figuur 2B).

Zo lijkt de IFN $\gamma$ -respons zowel op bevolkings- als individueel niveau te correleren met onderdrukking van malariaparasitemie. De volgende stap wordt om uit te

Figuur 1. Veldonderzoek in Mali



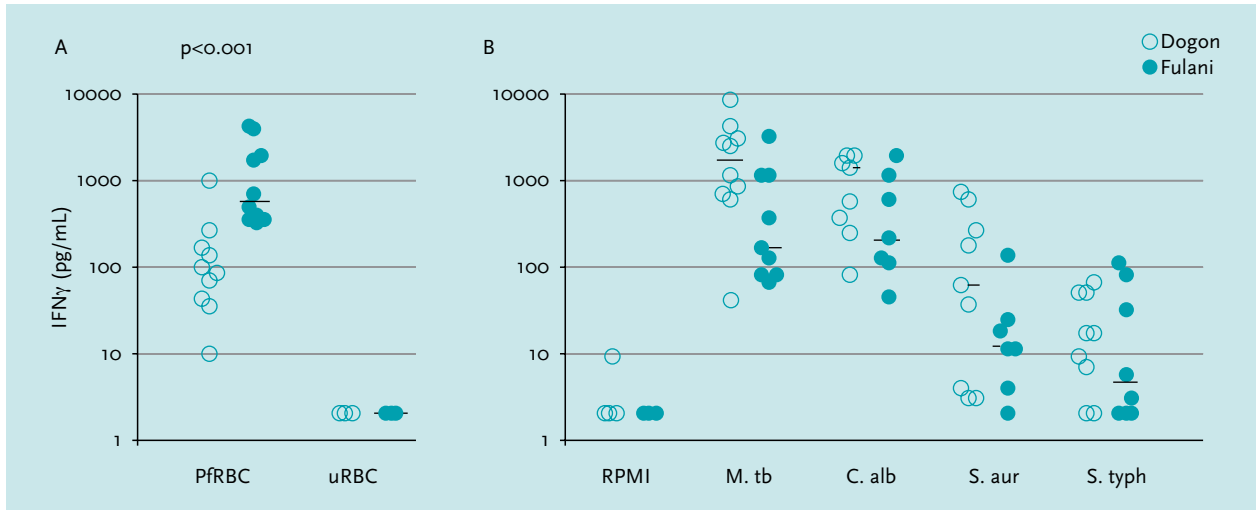
A. Uitzicht over Dogon-vallei. B. Laboratorium in Bandiagara. C. Fulani-jongens. D. Fulani-hut. E. Dogon-kinderen. F. Dogon-graanschuur.

zoeken welke genetische factor aan dit frappante verschil ten grondslag ligt; hiervoor zijn micro-array experimenten in de planning. De betreurenswaardige huidige crisis in Mali heeft die plannen voorlopig echter even in de wacht gezet.

### Gecontroleerde humane malaria-infecties

Omdat individuele natuurlijke infecties onder bevolkingen in endemische gebieden moeilijk prospectief te volgen zijn en aan allerlei versturende factoren onderhevig blijven, is het behulpzaam om een experimenteel model te hebben waarin nauwkeurig omschreven malaria-infecties van begin tot eind te volgen zijn. Hoewel er dierenmodellen voor malaria bestaan, voornamelijk muizenmodellen, kunnen de resultaten hiervan helaas niet altijd even gemakkelijk naar menselijke ziekte geëxtrapoleerd worden. Gelukkig beschikt het malaria-onderzoek over een waardevol experimenteel 'gereedschap': gecontroleerde humane malaria-infecties (CHMI's). Hierbij worden (malarianaïeve) vrijwilligers blootgesteld aan *P. falciparum*-malaria door steken van geïnfecteerde Anopheles-muggen die in een laboratorium zijn gekweekt; zodra bij de vrijwilligers de eerste malariaparasieten aantoonbaar zijn in het bloed met behulp van dikke druppelonderzoek, worden zij curatief behandeld met gangbare antimalariamiddelen. De reden dat CHMI's überhaupt mogelijk zijn, komt doordat malaria, in tegenstelling tot bijvoorbeeld tuberculose of hiv, een acute (infectie)ziekte is met een bestaande kortdurende en effectieve behandeling. CHMI's worden behalve in Nijmegen, ook in Oxford en in de V.S. gebruikt voor malariaonderzoek. Inmiddels is er veel ervaring met CHMI's opgedaan en is bewezen dat het een betrouwbaar, veilig onderzoek betreft.<sup>17</sup> De allereerste ervaringen met CHMI's werd zelfs ruim 100 jaar geleden opgedaan, toen in het preantibiotisch tijdperk malaria-infecties

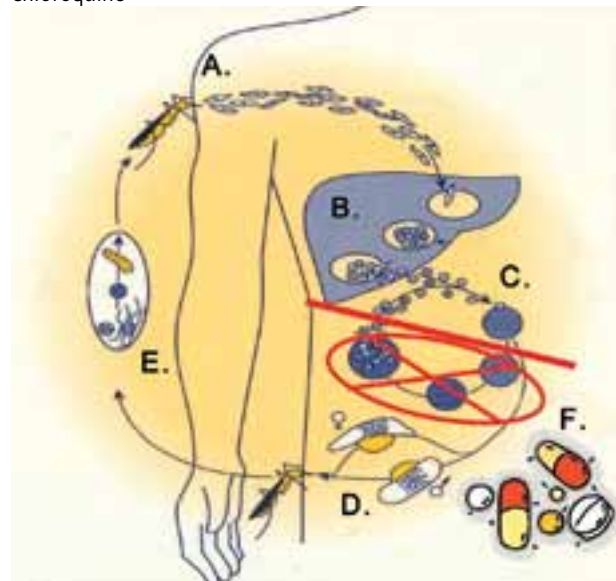
**Figuur 2.** IFN $\gamma$ -respons van Fulani en Dogon op malariaparasieten en andere pathogenen



Perifeer bloed mononucleaire cellen van een tiental Dogon (witte cirkels) en Fulani (zwarte cirkels) werden *in vitro* gestimuleerd met A. *Plasmodium falciparum*-geïnfecteerde rode bloedcellen (PfrBC) of ongeïnfecteerde rode bloedcellen (uRBC) of B. kweekmedium (RPMI), *Mycobacterium tuberculosis* (M. tb), *Candida albicans* (C. alb), *Staphylococcus aureus* (S. aur) of *Salmonella typhi* (S. typh). Na 24 uur werden kweek supernatanten geoogst en werd hierin IFN $\gamma$ -productie gemeten door middel van ELISA. De getoonde data weerspiegelen individuele waarden van Dogon en Fulani; de horizontale streep vormt de mediaan.

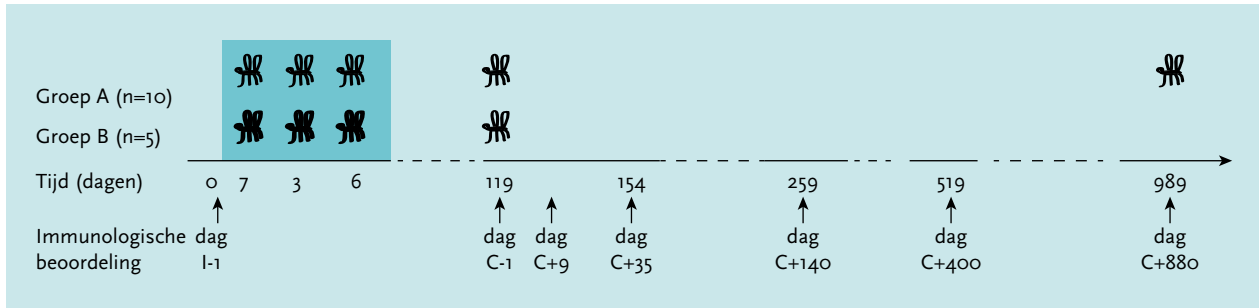
werden toegepast in de behandeling van neurolues. De Oostenrijkse arts Julius Wagner-Jauregg won voor dit werk in 1927 zelfs de Nobelprijs! Tegenwoordig worden CHMI's vooral gebruikt om fundamentele kennis op te doen van de pathofysiologie van en de afweer tegen vroege malaria-infecties en om nieuwe malariavaccins te testen. Vooral de laatste toepassing blijkt een zeer (kosten)effectieve tussenstap tussen preklinische dierenmodellen en dure/langdurige veldstudies onder endemische bevolkingen. Om te onderzoeken hoeveel immuniteit nu werkelijk opgebouwd wordt bij het doormaken van een malaria-infectie, bedachten collega's in Nijmegen de volgende proef.<sup>18</sup> Vijftien malaria-ervaren vrijwilligers werden gerekruteerd en kregen drie maanden lang een standaard profylactische dosis chloroquine (CQ). CQ is een middel dat de pathogene bloedstadia van malariaparasieten doodt, maar geen effect heeft op de onschuldige tussenvormen in de lever (figuur 3). Tien van de vrijwilligers (groep A) werden in die tijd drie keer (eens per maand) blootgesteld aan de beten van *P. falciparum*-geïnfecteerde muggen. Bij deze vrijwilligers kwamen dus malariaparasieten in het lichaam, die zich vervolgens door de gehele leverfase ontwikkelden, maar bij het vrijkomen in het bloed ten slotte afstierven; daardoor werden de vrijwilligers tijdens deze 'immunisatie' fase ook niet ziek. De vijf andere vrijwilligers (groep B) werden op dezelfde momenten blootgesteld aan de beten van evenveel ongeïnfecteerde muggen (figuur 4). De studie verliep dubbelblind: noch de vrijwilligers noch de arts-onderzoekers wisten aan welke muggen de vrijwilligers blootgesteld werden – dat wisten alleen de medewerkers van het muggenlab.

**Figuur 3.** Levenscyclus van malariaparasieten en effect van chloroquine



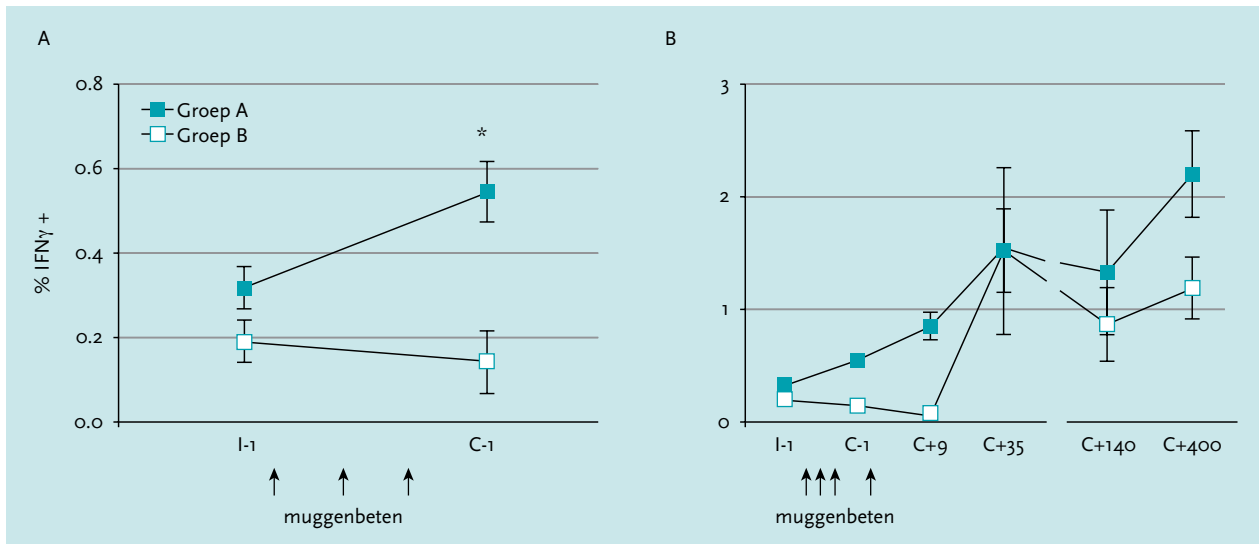
A. Bij het nemen van een bloedmaal brengt een geïnfecteerd vrouwelijke Anophelesmug onopzettelijk malariaparasieten in de huid van de gastheer. B. Deze sporozöietvormen migreren naar de lever, waar ze gedurende  $\pm$  zeven dagen uitrijpen en vermenigvuldigen, zonder symptomen te veroorzaken. C. Na het vrijkomen uit de lever invaderen merozöietvormen rode bloedcellen, waarin ze zich in cycli van 48-72 uur exponentieel vermenigvuldigen. Het is deze aseksuele cyclus die alle pathologie en klinische symptomen van malaria veroorzaakt. D. Enkele merozöieten ontwikkelen zich tot seksuele stadia (gametocyten), die vervolgens door een andere voedende Anophelesmug opgenomen kunnen worden. E. In de muggenmaag fuseren de mannelijke en vrouwelijke gametocyten en ontwikkelen zich verder tot nieuwe sporozöieten. F. Het antimalariamiddel chloroquine (CQ) doodt rijpe aseksuele (bloedstadium) malariaparasieten, maar heeft geen effect op sporozöieten of leverstadia.

**Figuur 4.** Tijdschema van klinische humane malaria-infectie



Vijftien vrijwilligers kregen drie maanden lang standaard chloroquine (CQ) profylaxe (grijze balk). Tijdens die periode werden tien vrijwilligers (groep A) driemaal geïmmuniseerd door blootstelling aan beten van geïnficeerde Anophelesmuggen (zwart ingekleurd); vijf andere vrijwilligers (groep B) werden alleen driemaal blootgesteld aan ongeïnficeerde muggenbeten (niet ingekleurd). Een maand na het stoppen van de CQ werden alle 15 vrijwilligers (nogmaals) blootgesteld aan de beten van geïnficeerde muggen ('challenge'). Tweeënhalf jaar na de oorspronkelijke challenge werden zes van de tien groep-A-vrijwilligers opnieuw blootgesteld aan geïnficeerde muggenbeten. Op de aangegeven dagen werden bij de vrijwilligers cellulaire immunoresponsen tegen de malariaparasiet gemeten.

**Figuur 5.** IFN $\gamma$ -respons van deelnemers aan een gecontroleerde humane malaria-infectie op malariaparasieten in verloop van de tijd



A. Groep-A-vrijwilligers (zwarte vierkanten, n=10) werden driemaal blootgesteld aan beten van *P. falciparum*-geïnficeerde Anophelesmuggen; groep-B-vrijwilligers (witte vierkanten, n=5) werden alleen blootgesteld aan beten van ongeïnficeerde muggen. Gedurende deze periode kregen alle 15 vrijwilligers CQ-profylaxe. B. Een maand na het stoppen van de CQ werden de vrijwilligers (opnieuw) blootgesteld aan geïnficeerde muggenbeten ('challenge'). Perifeer bloed mononucleaire cellen van de vrijwilligers werden op de aangegeven dagen verzameld en *in vitro* gestimuleerd met *P. falciparum*-geïnficeerde rode bloedcellen. Na 24 uur werden de PBMC's geoogst en werd het percentage lymfocyten dat IFN $\gamma$  produceerde gemeten door middel van flowcytometrie. De getoonde data weerspiegelen gemiddelde waarden ( $\pm$  SEM) van groep-A- en groep-B-vrijwilligers, gecorrigeerd voor achtergrond (responsen tegen ongeïnficeerde rode bloedcellen). I: immunisatie; C: challenge.

Na drie maanden werd de CQ stopgezet en werd een maand gewacht totdat al het geneesmiddel uit het lichaam verdwenen was. Toen werden alle 15 vrijwilligers (opnieuw) blootgesteld aan de beten van malariageïnficeerde muggen (de 'challenge'). De vijf groep-B-'controle'-vrijwilligers bleken vervolgens allemaal een malaria-infectie te ontwikkelen die in het bloed detecteerbaar was, samen met klachten passend bij malaria; zij werden vervolgens behandeld met antimalariamiddelen en genazen restloos. Van de tien 'geïmmuniseerde' groep-A-vrijwil-

ligers, ontwikkelde enigszins tot onze verbazing na de muggenbeten echter niemand klachten van malaria of zelfs detecteerbare parasieten in het bloed. Zij waren door de eerdere blootstellingen allemaal volledig immuun geworden voor de challenge-infectie. Dit resultaat leek rechtstreeks in strijd met het dogma dat afweer tegen malaria zich zeer langzaam ontwikkelt en dan nog slechts partieel is.

Om te ontdekken wat nu bij deze vrijwilligers de bescherming bood, werden hun immunoresponsen



onderzocht. Humorale (antilichaam)responsen tegen de malariaparasiet bleken zich slechts zwakjes en niet eens bij alle beschermde groep-A-vrijwilligers ontwikkeld te hebben. Daarentegen had de 'immunisatie' bij alle tien vrijwilligers sterke cellulaire responsen opgewekt, die we op een soortgelijke manier konden meten als bij de studie-deelnemers in Mali (figuur 5A). Naast IFN $\gamma$  bleken deze PBMC's ook de cytokines IL-2 en TNF $\alpha$  te produceren. Zulke 'pluripotente' lymfocyten staan erom bekend dat ze zeer potente afweercellen zijn.<sup>19,20</sup> Ook bij malarianaïeve vrijwilligers blijkt IFN $\gamma$  dus een centrale rol te spelen in de afweer tegen malaria. De reden dat zulke relatief sterke immuunresponsen werden geïnduceerd, heeft er waarschijnlijk mee te maken dat het immuunsysteem van de vrijwilligers wel blootgesteld werd aan de leverstadia van de parasiet, maar niet aan de bloedstadia – waarvan bekend is dat ze een immuunsuppressief effect kunnen uitoefenen.<sup>21,22</sup>

Ten slotte onderzochten we nog hoe lang deze cellulaire immuunresponsen bij de vrijwilligers bleven bestaan – een ander deel van het dogma over malaria beweert namelijk dat afweer tegen de ziekte zeer snel verloren gaat in afwezigheid van doorlopende blootstelling. Wederom tot onze verbazing bleek dat de IFN $\gamma$ -responsen bij de beschermde vrijwilligers ruim anderhalf jaar na de challenge nog onverminderd aanwezig waren (figuur 5B). Merkwaardigerwijs bleek deze 'recall'-respons voortgebracht te worden door niet alleen klassieke geheugen  $\alpha\beta$ T-cellen, maar ook door als onveranderlijk beschouwde  $\gamma\delta$ T-cellen en zelfs NK-cellen.<sup>23-24</sup> Dat deze responsen nog steeds functioneel waren, bleek toen we zes van de groep-A-vrijwilligers opnieuw blootstelden aan geïnfecteerde muggenbeten: vier van de zes waren tweeënhalve jaar na de oorspronkelijke challenge nog steeds volledig steriel beschermd tegen infectie, de andere twee toonden een grote mate van bescherming, maar ontwikkelden uiteindelijk toch parasieten in het bloed.<sup>25</sup>

Vervolgstudies zijn intussen gaande om te onderzoeken of de vrijwilligers ook beschermd zijn tegen heterologe malaria-infecties en of de CQ-profylaxe een immuunmodulatorische rol kan hebben gespeeld.

### Perspectief

Zowel uit het veldonderzoek als uit de studies met malarianaïeve vrijwilligers komt de centrale rol van IFN $\gamma$  in de afweer tegen malaria prominent naar voren.<sup>26</sup> Dit inzicht wordt nu gebruikt om een vaccin tegen malaria te ontwikkelen. In navolging van de vrijwilligersstudie wordt er samen met collega's in Leiden en de Verenigde Staten gewerkt aan een vaccin bestaande uit levend-verzwakte parasieten. Dat verzwakken kan gebeuren hetzij door bestraling van de parasieten, hetzij door ze genetisch te manipuleren; het uiteindelijk effect van die verzwakking blijft gelijk – na binnendringen in het menselijk lichaam

ontwikkelen de parasieten zich wel in de lever, maar bereiken ze nooit het bloed. Hierdoor wordt een even sterke beschermende IFN $\gamma$ -immuunrespons opgewekt als bij de oorspronkelijke groep-A-vrijwilligers, is de bedoeling.

Naast enkele praktische problemen met het vaccin die moeten worden opgelost voordat het grootschalig in gebruik kan worden genomen, blijft een fundamentele vraag nog onbeantwoord: waarom ontwikkelen zulke beschermende IFN $\gamma$ -responsen zich niet onder natuurlijke omstandigheden in endemische populaties? De twee hypothesen hierover, namelijk i) dat het immuunsysteem van zuigelingen en peuters bij eerste blootstelling aan malaria-infectie onvoldoende rijp is om zulke beschermende responsen op te bouwen,<sup>27</sup> of ii) dat de blootstelling aan chronische parasitemie (wat bij endemische kinderen vaak voorkomt) een immuunsuppressief effect heeft,<sup>22</sup> moeten nog in verdere veldstudies en experimentele modellen uitgeplozen worden.

Het feit alleen al dat bescherming tegen malaria kennelijk veel gemakkelijker te induceren is dan ooit eerder gedacht, tezamen met de ontrafeling van de rol van één van de centrale immunologische factoren in die bescherming – IFN $\gamma$  -, biedt perspectief dat een effectief vaccin tegen malaria op korte termijn ontwikkeld kan worden en in de toekomst nog vele gevallen van malaria kan voorkomen.

### Verklaring

Dit artikel beschrijft resultaten van onderzoek in het kader van het promotietraject van de auteur aan het UMC St Radboud, Nijmegen, onder supervisie van prof. R.W. Sauerwein en prof. M.G. Netea. Alle data zijn eerder gepubliceerd in peer-reviewed internationale vakbladen.

### Dankbetuiging

De resultaten beschreven in dit artikel zijn tot stand gekomen onder de supervisie van promotores R. Sauerwein en M. Netea, maar tevens die van onder anderen A. v.d. Ven en R. Hermsen. Mede-promovendi onder wie J. Hopman, B. Ferwerda, M. Roestenberg, A. Teirlinck en I. Ploemen hebben substantieel bijgedragen aan dit werk, dat voornamelijk werd uitgevoerd op de laboratoria Medische Parasitologie en Algemene Interne Geneeskunde van het UMC St Radboud. Het veldwerk werd gefaciliteerd door het Malaria Research & Training Centre aan de Universiteit van Bamako, Mali, onder leiding van O. Doumbo en in samenwerking met de onderzoeksgroep van M. Troye-Blomberg aan de Universiteit van Stockholm.

### Financiering

Dit onderzoek werd mede mogelijk gemaakt door een EU FP6 Network of Excellence (BioMalPar) fellowship en door Stichting Dioraphte.

## Summary

An effective vaccine against malaria is sorely needed, but the development hereof is hampered by our incomplete understanding of immunity against this disease. This article describes evidence for the central role of interferon-gamma (IFN $\gamma$ ) in protective immunity against its most important causative organism, *Plasmodium falciparum*. This was studied in two fairly unique settings: in field studies addressing interethnic differences in susceptibility to malaria and in the Controlled Human Malaria (CHMI) model.

Field studies in rural Mali demonstrated that the relative resistance of the Fulani tribe to malaria is correlated with 10-fold stronger IFN $\gamma$ -responses against *P. falciparum*, but not against other human pathogens, than those of the Dogon tribe.

CHMI's are a powerful instrument for answering amongst others fundamental immunological questions. By exposing volunteers thrice to *P. falciparum*-infected mosquitoes whilst under chloroquine prophylaxis, these volunteers subsequently proved to be completely protected against a new infection without prophylaxis. This protection was not accompanied by antibodies, but instead by prominent cellular responses consisting of IFN $\gamma$  production by classic  $\alpha\beta$ T cells in addition to  $\gamma\delta$ T and NK cells.

Together these findings advocate for the induction of strong IFN $\gamma$  responses as an important goal for a successful malaria vaccine.

## References

- World Health Organization. World malaria report 2011. Geneva: World Health Organization; 2011.
- O'Meara WP, Mangeni JN, Steketee R, Greenwood B. Changes in the burden of malaria in sub-Saharan Africa. *Lancet Infect Dis*. 2010;10:545-5.
- Dondorp AM, Yeung S, White L, Nguon C, Day NP, Socheat D, et al. Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8:272-80.
- Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2005;434:214-7.
- Marsh K, Kinyanjui S. Immune effector mechanisms in malaria. *Parasite Immunol*. 2006;28:51-60.
- van der Heyde HC, Nolan J, Combes V, Gramaglia I, Grau GE. A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol*. 2006;22:503-8.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004;75:163-89.
- Doolan DL, Martinez-Alier N. Immune response to pre-erythrocytic stages of malaria parasites. *Curr Mol Med*. 2006;6:169-85.
- Good MF, Xu H, Wykes M, Engwerda CR. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:69-99.
- Dolo A, Modiano D, Maiga B, Daou M, Dolo G, Guindo H, et al. Difference in susceptibility to malaria between two sympatric ethnic groups in Mali. *Am J Trop Med Hyg*. 2005;72:243-8.
- Modiano D, Petrarca V, Sirima BS, Nebie I, Diallo D, Esposito F, et al. Different response to *Plasmodium falciparum* malaria in west African sympatric ethnic groups. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:13206-11.
- Pandey JP, Nasr A, Rocca KM, Troy-Blomberg M, ElGhazali G. Significant differences in GM allotype frequencies between two sympatric tribes with markedly differential susceptibility to malaria. *Parasite Immunol*. 2007;29:267-9.
- Modiano D, Luoni G, Sirima BS, Lanfrancotti A, Petrarca V, Cruciani F, et al. The lower susceptibility to *Plasmodium falciparum* malaria of Fulani of Burkina Faso (west Africa) is associated with low frequencies of classic malaria-resistance genes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001;95:149-52.
- Bolad A, Farouk SE, Israelsson E, Dolo A, Doumbo OK, Nebie I, et al. Distinct interethnic differences in immunoglobulin G class/subclass and immunoglobulin M antibody responses to malaria antigens but not in immunoglobulin G responses to nonmalarial antigens in sympatric tribes living in West Africa. *Scand J Immunol*. 2005;61:380-6.
- Farouk SE, Dolo A, Bereczky S, Kouriba B, Maiga B, Farnert A, et al. Different antibody- and cytokine-mediated responses to *Plasmodium falciparum* parasite in two sympatric ethnic tribes living in Mali. *Microbes Infect*. 2005;7:110-7.
- McCall MB, Hopman J, Daou M, Maiga B, Dara V, Ploemen I, et al. Early interferon-gamma response against *Plasmodium falciparum* correlates with interethnic differences in susceptibility to parasitemia between sympatric Fulani and Dogon in Mali. *J Infect Dis*. 2010;201:142-52.
- Epstein JE, Rao S, Williams F, Freilich D, Luke T, Sedegah M, et al. Safety and clinical outcome of experimental challenge of human volunteers with *Plasmodium falciparum*-infected mosquitoes: an update. *J Infect Dis*. 2007;196:145-54.
- Roestenberg M, McCall M, Hopman J, Wiersma J, Luty AJ, van Gemert GJ, et al. Protection against a malaria challenge by sporozoite inoculation. *N Engl J Med*. 2009;361:468-77.
- Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, Lindsay RW, Davey DF, Flynn BJ, et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med*. 2007;13:843-50.
- Precopio ML, Betts MR, Parrino J, Price DA, Gostick E, Ambrozak DR, et al. Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. *J Exp Med*. 2007;204:1405-16.
- Orjih AU. Acute malaria prolongs susceptibility of mice to *Plasmodium berghei* sporozoite infection. *Clin Exp Immunol*. 1985;61:67-71.
- Bejon P, Mwacharo J, Kai O, Todryk S, Keating S, Lowe B, et al. The induction and persistence of T cell IFN-gamma responses after vaccination or natural exposure is suppressed by *Plasmodium falciparum*. *J Immunol*. 2007;179:4193-201.
- McCall MB, Roestenberg M, Ploemen I, Teirlinck A, Hopman J, de Mast Q, et al. Memory-like IFN-gamma response by NK cells following malaria infection reveals the crucial role of T cells in NK cell activation by *P. falciparum*. *Eur J Immunol*. 2010;40:3472-7.
- Teirlinck AC, McCall MB, Roestenberg M, Scholzen A, Woestenenk R, de Mast Q, et al. Longevity and composition of cellular immune responses following experimental *Plasmodium falciparum* malaria infection in humans. *PLoS Pathog*. 2011;7:e1002389.
- Roestenberg M, Teirlinck AC, McCall MB, Teelen K, Makamdop KN, Wiersma J, et al. Long-term protection against malaria after experimental sporozoite inoculation: an open-label follow-up study. *Lancet*. 2011;377:1770-6.
- McCall MB, Sauerwein RW. Interferon-gamma--central mediator of protective immune responses against the pre-erythrocytic and blood stage of malaria. *J Leukoc Biol*. 2010.
- Baird JK, Masbar S, Basri H, Tirtokusumo S, Subianto B, Hoffman SL. Age-dependent susceptibility to severe disease with primary exposure to *Plasmodium falciparum*. *J Infect Dis*. 1998;178:592-5.

# Lymediagnostiek, een gezamenlijke inspanning is vereist

H. Bijlmer

Lyme is één van de infectieziekten die niet alleen de behandelaar, diagnosticus en wetenschapper boeien, maar die ook de aandacht heeft van de patiënt. Zozeer zelfs dat de laatste categorie zich heeft verenigd in een platform met het doel de diagnostiek en behandeling van Lyme te verbeteren. In een brede coalitie, mede onder politieke stimulans samengesteld, hebben deze partijen in het CBO Consensus getracht met elkaar tot een gezamenlijk standpunt te komen, vooralsnog zonder resultaat. De trage voortgang van het CBO Consensus Lyme is de aanleiding geweest om in een kleinere, alleen uit arts-microbiologen bestaande groep, aangevuld met een infectioloog, een epidemioloog en twee wetenschappers uit het CIb-RIVM, de laboratoriumdiagnostiek van Lyme te bespreken, met het doel te komen tot een Nederlandse consensus in de laboratoriumdiagnostiek van Lyme: het 'Consensus Beraad Laboratorium Diagnostiek Lyme'. De resultaten van dit overleg worden gepubliceerd in dit themanummer van het NTMM.

Het scala van (on-)mogelijkheden wordt gereviewd met een visie op de stappen erna. Daarnaast worden de resultaten gerapporteerd van één van de mogelijke verbeteringen in Lymediagnostiek, het aantonen van immuuncomplexen. Die mogelijkheid blijkt vooralsnog niet de grote sprong voorwaarts te zijn. De door de verschillende laboratoria gebruikte testen zijn naast elkaar gezet; er is aangegeven wat de test meet en waar, bij goed omschreven Lymeziektebeelden, de sterke en zwakke punten van de test zichtbaar zijn. Het was niet de verwachting dat er één 'beste' test uit zou rollen en dat is ook gebleken, gebruikmakend van de collecties patiëntmaterialen uit de respectievelijke Consensuslaboratoria. Een grotere collectie is er waarschijnlijk in Nederland niet te vinden en daarmee wordt ook aangegeven wat de limieten zijn van de 'eigen ervaring'. De resultaten worden beschreven van een rondzending van serummonsters aan de laboratoria van de leden van het Consensus Beraad Lyme Diagnostiek. Er zijn

meerdere wegen die naar Rome leiden, en in het overgrote deel van de monsters van patiënten met goed omschreven ziektebeelden wordt een respons gezien. Tot slot wordt de 'Nederlandse situatie' beschreven met een interpretatie van testuitslagen en de komende ontwikkelingen. Lymediagnostiek is geen afgesloten hoofdstuk.

Het is duidelijk dat sommige vragen in groter verband benaderd moeten worden. Het Consensus Beraad Laboratorium Diagnostiek Lyme heeft zich aangemeld bij het ECDC om in samenwerking met het Nederlandse Cochrane Instituut en in samenspraak met enkele Europese experts, op gestructureerde wijze de literatuur op het gebied van Lyme-laboratoriumdiagnostiek te reviewen. Een gezamenlijke inspanning blijkt toch heel goed uit te kunnen vallen.

Het Consensus Beraad Lyme bestaat uit de volgende personen (op alfabetische volgorde):

- Wim Ang, VUmc, Amsterdam
- Hanneke Berkhout, Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen
- Henk Bijlmer, RIVM, Bilthoven
- Afke Brandenburg, Izore, Centrum Infectieziekten Friesland, Leeuwarden
- Nathalie van Burgel, HagaZiekenhuis, Den Haag
- Alje van Dam, OLVG/Streeklaboratorium GGD, Amsterdam
- Tineke Herremans, RIVM, Bilthoven
- Joppe Hovius, AMC, Amsterdam
- Bart Meijer, St. Lucas Ziekenhuis, Winschoten
- Daan Notermans, RIVM, Bilthoven
- Wilfrid van Pelt, RIVM, Bilthoven
- Joop Schellekens, Laboratorium voor Infectieziekten, Groningen
- Hein Sprong, RIVM, Bilthoven
- Foekje Stelma, UMCN, Nijmegen
- Frans Verduyn Lunel, UMCU, Utrecht

Correspondentieadres: H. A. Bijlmer, Voorzitter Consensus Beraad Lyme Laboratorium Diagnostiek, e-mail: [henk.bijlmer@rivm.nl](mailto:henk.bijlmer@rivm.nl)

# Interlaboratoriumvariatie van de serologie voor de ziekte van Lyme in Nederland

T. Herremans, N.D. van Burgel, A.H. Brandenburg, B. Meijer, F. Verduyn Lunel, M. Nabuurs-Franssen, F.F. Stelma, C.W. Ang, A.P. van Dam, H.A. Bijlmer namens het Consensusberaad Lyme

## Samenvatting

Serologie is een belangrijk hulpmiddel bij de diagnose van de ziekte van Lyme. Er zijn in Nederland vele verschillende testen op de markt, waaronder meerdere ELISA's en Immunoblots die in verschillende combinaties worden toegepast. Met een rondzending werd geprobeerd een indruk te krijgen in hoe de verschillende *Borrelia*-testen zich ten opzichte van elkaar verhouden en de mogelijke invloed hiervan op interlaboratoriumvariatie. In totaal werden 25 sera van goed gedefinieerde Lyme-patiënten met een vroege of een late infectie en controle sera onderzocht. In de negen deelnemende laboratoria werden vijf verschillende screenings- en vijf verschillende confirmatieassays gebruikt in acht verschillende combinaties. De kwalitatieve en kwantitatieve resultaten tussen laboratoria die dezelfde testen gebruikten, vertoonden weinig interlaboratoriumvariatie. Echter kwalitatieve verschillen in de eindconclusie werden veroorzaakt door het gebruik van verschillende immunoassays en combinaties daarvan. Discrepancies in conclusies werden gevonden bij 3/6 patiënten in de vroege fase en bij 1/2 patiënten met een niet door Lyme veroorzaakte artritis. Bij patiënten in de late fase en bij volledig naïeve personen werden géén discrepanties in de definitieve uitslag gerapporteerd. Verschillen in eindconclusie tussen laboratoria is onwenselijk. Beter standaardisatie van de Lyme-serologie tussen de laboratoria onderling kan hopelijk de inter-laboratoria verschillen verkleinen.

## Trefwoorden

Ziekte van Lyme, *Borrelia*, serologie, ELISA, Immunoblot

## Inleiding

Erythema migrans (EM) is het enige klinische specifieke kenmerk dat de diagnose van de ziekte van Lyme bevestigt zonder laboratoriumbevestiging.<sup>1</sup> Bij alle andere uitingsvormen van de ziekte van Lyme is serologie de belangrijkste diagnostische methode, zoals onder andere weergegeven in de CBO-richtlijn Lyme-borreliose<sup>2</sup> en de Amerikaanse richtlijn van de Infectious Disease Society of America.<sup>3</sup> Serologie heeft echter ook een aantal beperkingen. Zo kan deze vroeg in de infectie nog negatief

zijn als de productie van antistoffen nog niet goed op gang is gekomen.<sup>4</sup> Daarnaast bewijst de aanwezigheid van antistoffen wel dat iemand ooit contact heeft gehad met *Borrelia burgdorferi*, de verwekker van de ziekte van Lyme, maar niet of een infectie nog werkelijk actief is.<sup>5</sup>

In een inventarisatie naar de microbiologische diagnostiek in Nederland in 2007 gaven 57 laboratoria aan serologie voor Lyme-borreliose te verrichten.<sup>6</sup> In veel gevallen wordt een positieve eerste screening antistofftest (veelal ELISA) geconfirmeerd met een Immunoblot, zoals geadviseerd in richtlijnen.<sup>2,3,7</sup> Er zijn verschillende serologische testen op de markt, waaronder meerdere ELISA's en Immunoblots, waarin natieve antigenen, recombinant antigenen en soms een combinatie hiervan worden gebruikt. Hierdoor is er ook een groot aantal verschillende combinaties van testen in de verschillende laboratoria in gebruik, met inherent daaraan mogelijke verschillen in eindresultaat. Er lijkt behoefte aan meer standaardisatie van de gebruikte serologische diagnostische testen en de interpretatie van die uitslagen.

In de nu gangbare rondzendingen in Nederland van de Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratoriumdiagnostiek (SKML) is er één jaarlijkse rondzending voor syfilis/Lyme-serologie van vier sera. Dit is vrij beperkt om inzicht te krijgen in de vergelijkbaarheid van uitslagen van verschillende testen en teststrategieën die worden gebruikt op verschillende laboratoria. Om een beter inzicht te krijgen is het wenselijk de resultaten en interpretatie van die resultaten van de laboratoria te vergelijken. Hierbij is het noodzakelijk sera te gebruiken van patiënten met een goed gedefinieerd ziektebeeld.

H.A. Bijlmer, namens het Consensusberaad Lyme, RIVM, Centre for Infectious Disease Control, Bilthoven; N.D. van Burgel, LUMC, Leiden; A.H. Brandenburg, Izore, Leeuwarden; B. Meijer, Laboratorium voor Infectieziekten, Groningen; F. Verduyn Lunel, UMCU, Utrecht; M. Nabuurs-Franssen, UMCN, Nijmegen/Canisius Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen; F. Stelma, UMCN, Nijmegen; C.W. Ang, VUmc, Amsterdam; A.P. van Dam, OLVG, Amsterdam, GGD Streeklaboratorium, Amsterdam.  
Correspondentieadres: T. Herremans, RIVM, Centre for Infectious Disease Control, Bilthoven, e-mail: tineke.herremans@rivm.nl.



Het Consensusberaad Lyme is een samenwerkingsgroep op initiatief van het RIVM in samenwerking met de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM), van medisch microbiologische laboratoria met interesse in de ziekte van Lyme. Op 30 november 2010 heeft het Consensusberaad Lyme besloten tot een eerste uitgebreidere onderlinge serologierondzending onder de bij het Consensusberaad betrokken laboratoria. Hiermee werd geprobeerd om een eerste indruk te krijgen in hoe de verschillende in gebruik zijnde *Borrelia*-testen zich ten opzichte van elkaar en tussen de deelnemende laboratoria onderling verhouden.

## Materiaal en methoden

### Deelnemende laboratoria en de gebruikte serologische methoden

In totaal hebben negen laboratoria deelgenomen aan deze eerste rondzending: LUMC Leiden, Izore Leeuwarden, OLVG Amsterdam, RIVM Bilthoven, UMC St Radboud Nijmegen, CWZ Nijmegen, Lvl Groningen, UMC Utrecht, VUmc Amsterdam. Alle laboratoria maken gebruik van commercieel verkrijgbare assays (tabel 1). Als screeningstest werden gebruikt: C6-peptide ELISA (Immunitics) driemaal, Enzygnost IgM en IgG ELISA (Siemens) driemaal, Serion ELISA Classic (Virion) eenmaal, Liaison (Diasorin) eenmaal, Vidas IgTotaal (Biomérieux) eenmaal. De meest toegepaste Immunoblot was de recomLine (Mikrogen) driemaal. Van de Virotech Immunoblot werden twee verschillende versies gebruikt de Europeline (tweemaal) en de line blot (eenmaal). De Euroimmuunblot werd in één laboratorium toegepast. De verschillende testen maken gebruik van vele verschillende combinaties van (deels overeenkomstige) antigenen.

Tabel 1. Deelnemers en gebruikte testen en test combinaties.

Laboratorium	Screeningstest	Bevestigingstest
1	VIDAS	Mikrogen recomline + C6
2	Liaison	Mikrogen recomline + C6
3	Serion/Verion	Euroimmuun
4	Siemens / Enzygnost	Virotech Europeline blot
5	Siemens / Enzygnost	Virotech line blot
6	Siemens / Enzygnost	Mikrogen recomline
7	C6 Immunitics	Virotech Europeline blot
8	C6 Immunitics	Mikrogen recomline
9	C6 Immunitics	Mikrogen recomline
		In house blot
Aantal testen	5	5

Een laboratorium dat screening verricht met de VIDAS, stuurt positieve sera normaal gesproken door naar het RIVM voor verdere serologische confirmatie. Het RIVM voert standaard op alle ontvangen sera zowel de C6 ELISA als IgG en IgM recomLine blot (Mikrogen) uit en maakte voor deze evaluatie naast de commerciële Immunoblot tevens gebruik van de oude in house Immunoblot met een natief antigeen, die niet meer in de diagnostiek wordt gebruikt. Alle testen werden uitgevoerd en geïnterpreteerd volgens het voorschrift van de fabrikant. Binnen de negen deelnemende laboratoria werden acht verschillende combinaties van screenings- en confirmatietesten gebruikt.

### Samenstelling van het serumpanel

Sera van patiënten met de ziekte van Lyme werden aangeleverd door vier van de deelnemende laboratoria (Izore, UMCU, Lvl en het RIVM). De diagnose werd als bevestigd beschouwd bij een positieve PCR in gewrichtsvocht, huidbiopt of liquor, afhankelijk van de klinische presentatie van de ziekte en eenmaal een passende histologie op een huidbiopt bij een ACA. Daarnaast werd bij het vaststellen van een seroconversie bij het initieel uitvoerende laboratorium de diagnose als bevestigd beschouwd. Het panel bestond uit sera van patiënten met EM (n=5), ACA (n=2), neuroborreliose (n=1), en Lyme arthritis (n=7). Als controlesera werden sera van drie bloeddonoren en twee patiënten met niet door *Borrelia* veroorzaakte arthritis mee genomen. In totaal bestond het panel uit 25 serummonsters. Twintig sera als hierboven benoemd en een verdunningreeks van een van de ACA-patiënten (n=5).

## Resultaten

### Resultaten van de bloeddonoren

In alle laboratoria werden de drie bloeddonoren IgG en IgM negatief getest voor *Borrelia*-antistoffen als een reactieve screeningstest gevolgd werd door confirmatie met Immunoblot (figuur 1). In elk van de drie bloeddonoren werd eenmaal een IgG als grenswaarde gerapporteerd door drie verschillende laboratoria met drie verschillende testen. Eenmaal werd een grenswaarde gevonden in een bloeddonor met de Enzygnost ELISA, de twee andere laboratoria die deze test ook uitvoerden, scoorden negatief. Een tweede bloeddonor had een grenswaarde in de Euroimmuunblot en een derde donor in de Virotech Europeline blot op basis van aanwezigheid van respectievelijk een positief p25 en VlsE bandje.

### Resultaten van de non-Lyme artritispatiënten

Er werden twee sera van non-Lyme artritispatiënten, als moeilijke, mogelijk kruisreagerende sera meegenomen in het panel. In totaal werd door één deelnemer een non-Lymepatiënt foutief als positief afgegeven (figuur 1). In de screenings-EIA's werd eenmaal een Enzygnost IgG en

**Figuur 1.** Eindconclusie van patiëntensera op basis van IgM en/of IgG-reactiviteit na confirmatie mbv de Immunoblot van een positieve screeningstest per deelnemend laboratorium.

ACA 1									
ACA 2									
Lyme artritis 1									
Lyme artritis 2									
Lyme artritis 3									
Lyme artritis 4									
Lyme artritis 5									
Lyme artritis 6									
Lyme artritis 7									
Neuroborreliose									
EM 1									
EM 2									
EM 3									
EM 4									
EM 5									
non Lyme artritis 1									
non Lyme artritis 2									
Bloeddonor 1									
Bloeddonor 2									
Bloeddonor 3									
Screeningstest	Vidas	Liason	Serion	Enzyg.	Enzyg.	Enzyg.	C6	C6	C6
Immunoblot	Mikro + C6		Euroim.	Viro E.	Viro L.	Mikro	Viro E	Mikro	Mikro
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Deelnemend laboratorium								



IgM ELISA als positief gerapporteerd en eenmaal als een grenswaarde. In de Immunoblots scoorde de Virotech Europeline blot een grenswaarde in beide non-Lymepatiënten (figuur 2). De Virotech-Line blot scoorde in één serum positief, resulterend in het als foutief positief afgeven van dit serum.

#### Resultaten van de erythema-migranspatiënten

In totaal werden sera van vijf EM-patiënten meegenomen in de studie. Bij drie patiënten was de eindconclusie na confirmatie identiek bij alle deelnemers. Bij twee van de vijf geteste EM-patiënten werden wel discrepanties gevonden in de gerapporteerde kwalitatieve einduitslagen op basis van IgM en/of IgG reactiviteit (figuur 1). EM-patiënt 1 werd door alle deelnemers als eindconclusie negatief

beoordeeld (serum afgenomen voor seroconversie). Echter grenswaarde voor IgG werden wel gezien in deze patiënt met de IgG Euroimmuunblot en met de Enzygnost IgG ELISA. Bij twee andere EM-patiënten 3 en 5 was de eindconclusie positief in alle laboratoria op basis van IgM en/of IgG reactiviteit. De RIVM in house Immunoblot scoorde negatief in alle EM-patiënten. De EM-patiënten 2 en 4 vertoonden de discrepanties in de eindconclusie. Patiënt 2 werd door 7/9 labs als positief en patiënt 4 door 1/9 labs als positief gerapporteerd (figuur 1). In EM-patiënt 2 werd alleen IgM *Borrelia*-specifieke antistoffen gedetecteerd met de Euroimmuunblot en de Virotech Europeline blot. De IgG-respons werd in de screening gemist met de Serion en VIDAS ELISA (figuur 2). In EM-patiënt 4 was de C6 ELISA, Enzygnost en de VIDAS het vaakst negatief (figuur 2).

Figuur 2. IgM- en IgG-resultaten van de meest discrepante uitslagen.



### Resultaat van de neuroborreliosepatiënt

In het serum van de neuroborreliosepatiënt; een patiënt met een facialisparesis, een vroeg systemische infectie, werden ook discrepanties gerapporteerd. Het serum werd door vijf laboratoria als positief beoordeeld, door twee laboratoria als een grenswaarde en door de resterende twee als negatief (figuur 1). De verschillende gebruikte IgM-screeningsassays waren alle reactief. Dit signaal werd geconfirmeerd in de IgM-blots van Virotech en Euroimmuun, maar niet in de Mikrogen IgM-line blot en de RIVM in house blot (figuur 2). Met de Serion ELISA werd als enige geen IgG-antistoffen aangetoond. Ook confirmatie van deze patiënt in de IgG blot gaf discrepanties. De Euroimmuun blot was de enige IgG-confirmatietest die positief scoorde. Beide Virotechblots werden als een grenswaarde beoordeeld in alle uitvoerende laboratoria en de Mikrogen IgG-blot was grenswaarde in één van de drie laboratoria (figuur 2).

### Resultaten van de artritispatiënten

In de zeven Lyme-artritispatiënten werden in alle IgG-screeningstesten *Borrelia*-specifieke antistoffen aangetroffen. Alleen in de VIDAS werd bij een patiënt een grenswaarde uitslag gemeld. Bij alle Lyme-artritispatiënten werden deze antistoffen ook bevestigd in alle blots, met uitzondering van patiënten 1 en 4, waar de Virotech blot een, respectievelijk drie keer een grenswaarde resultaat aangaf (figuur 1). Ook de RIVM in-house blot, die door het RIVM extra was meegenomen, miste deze twee patiënten.

### Resultaten van de ACA-patiënten

Zonder uitzondering werden de twee ACA-patiënten door alle laboratoria als positief beoordeeld zowel in de screeningstesten als de confirmatietesten. Van één ACA-patiënt werd een verdunningsreeks meegenomen in de rondzending. In de resultaten van de verdunningsreeks waren alle screeningstesten nog positief in de hoogste verdunning.

### Vergelijking kwantitatieve resultaten

De kwantitatieve resultaten tussen de laboratoria onderling die dezelfde ELISA's en Immunoblots gebruikten, vertoonden over alle onderzochte sera weinig interlaboratoriumvariatie. In de resultaten van de Immunoblotuitslagen werden over het algemeen dezelfde bandjes gerapporteerd met weinig variatie. In vergelijking met de Immunoblot van Mikrogen werden vaker grenswaarden gerapporteerd met zowel de Euroimmuun- als de beide Virotechblots.

### Discussie

Serologie is een belangrijk hulpmiddel bij de diagnose van de ziekte van Lyme. De laboratoria in Nederland hebben verschillende commercieel verkrijgbare testen in gebruik die in vele verschillende combinaties worden

ingezet. Eerder werd gevonden dat verschillen tussen testen mogelijk kunnen leiden tot verschillende gerapporteerde resultaten.<sup>8</sup> Probleem in betreffende studie was echter dat sera van minder goed klinisch gedocumenteerde patiënten gebruikt werden, waardoor het onmogelijk was om te zeggen of het om specificiteit in testen ging ofwel om een sensitiviteitsprobleem.<sup>9</sup>

Met een rondzending van goed gedefinieerde sera werd in het huidige onderzoek geprobeerd om een eerste indruk te krijgen in hoeverre de verschillende in gebruik zijnde Lyme-testen zich ten opzichte van elkaar verhouden en eventueel zouden kunnen leiden tot interlaboratoriumvariatie. Hiervoor werd gebruikgemaakt van sera van patiënten waarbij wel vaststaat of zij wel of niet een Lyme-infectie hadden en of dit een vroege of late uiting van infectie betrof.

In het beperkte aantal van negen deelnemers aan deze rondzending waren er al acht verschillende combinaties in gebruik. Discrepanties in uitslagen werden met name gevonden bij patiënten in de vroege fase van infectie waarbij de immunrespons nog in ontwikkeling is. Bij patiënten met late uiting van Lyme-borreliose, zoals bijvoorbeeld bij ACA en bij volledig naïeve personen werden géén discrepanties in de definitieve uitslag gerapporteerd. De bloeddonoren werden door alle laboratoria in het aangeraden algoritme van bevestiging van een positieve screeningstest met blot correct als negatief beoordeeld. Er werden wel grenswaarden gevonden in alle donoren met sommige zowel screenings- als bevestigingstesten. Deze resultaten geven aan dat het gebruik van een tweestapsmethode fout-positieve uitslagen helpt te voorkomen en de specificiteit bevordert. Bij patiënten met andere aandoeningen (non-Lyme-artritis in dit geval) werden meer discrepante uitslagen gerapporteerd, in een geval leidend tot één foute conclusie.

Het aantal observaties binnen deze rondzending is beperkt, maar de Enzygnost ELISA lijkt vaker reactief en gevoeliger dan de andere screeningsassays en is daarmee sensitiever, maar ook mogelijk minder specifiek. De Euroimmuun- en Virotechimmunoblots lijken gevoeliger dan de Mikrogen en de RIVM in house blot maar hebben ook vaker een grenswaarde als resultaat ook bij non-Lymepatiënten. Dit verschil wordt onder meer veroorzaakt doordat deze twee Immunoblots een minder strengere afkapwaarde hanteren dan de Mikrogen en de in house blot. De tegenwoordig niet meer gebruikte RIVM in house blot was het minst gevoelig van alle toegepaste assays. Verklaring hiervoor is dat naast de strengere criteria, antistoffen tegen een aantal belangrijke antigenen zoals VlsE en OspC respectievelijk niet of minder sterk worden aangetoond met deze assay. Mogelijk kunnen door de criteria voor positiviteit aan te passen de uitslagen tussen de verschillende Immunoblots onderling beter met elkaar in overeenstemming worden gebracht.



De laboratoria die gebruikmaakten van dezelfde immunoassays hadden over het algemeen een goede overeenkomst en de kwantitatieve resultaten en de interlaboratoriumvariatie was bij gebruik van dezelfde testen laag. Hiermee lijkt de variatie in einduitslagen van de *Borrelia*-serologie vrijwel uitsluitend verklaarbaar te zijn door verschillen in de gebruikte testen en de diverse mogelijke combinaties van deze assays en lijkt niet gebaseerd op verschil in de technische uitvoering tussen de laboratoria.

Discrepancies werden gezien bij de vroege Lyme-infecties zoals EM en vroege neuroborreliose. Bij late infecties (ACA en Lyme-artritis) was de screeningsserologie steeds positief en de confirmatieblot minimaal grenswaarde in de routinematig gebruikte Immunoblots. Negatieve serologie bij vroege Lyme is géén nieuwe observatie, het is ook de reden om serologie af te raden bij een duidelijk EM. Uit deze studie blijkt dat in de vroege fase van infectie de uitslag van de serologie kan variëren tussen laboratoria. Bij een negatieve serologie-uitslag bij een patiënt waarbij een vroege *Borrelia*-infectie nog niet met zekerheid is uitgesloten, moet daarom altijd worden aangeraden om de serologie na een aantal weken te herhalen. Als dit advies niet wordt opgevolgd zullen vroege Lyme-patiënten mogelijk niet of niet tijdig worden opgespoord.

De eindconclusie bij alle negen patiënten met late symptomen van Lyme-borreliose was positief in alle laboratoria. De pijn in de dagelijkse praktijk van Lyme-serologie zit vaak in een grote groep patiënten met soms kort, maar meestal langer bestaande klachten die minder specifiek passen bij een *Borrelia*-infectie. Ook in deze groep zullen de verschillende toegepaste combinaties van testen voor de nodige discrepanties zorgen, waarbij bij patiënten met kort bestaande symptomen door sommige laboratoria het risico bestaat van fout-negatieve diagnose, terwijl bij patiënten met lang bestaande klachten juist een fout-positieve diagnose gesteld kan worden door gebrek aan specificiteit van testen. Overigens blijft bij deze patiëntencategorie het probleem bestaan dat ook met een consistent positieve serologie de relatie tussen de minder specifieke klachten en infectie met *Borrelia* lang niet zeker is. Interpretatie van testresultaten in samenhang met de symptomen van de patiënt en de ziekteduur zijn van belang voor de juiste interpretatie van de uitslagen.

De variatie in de gebruikte testen en verschillende combinaties heeft tot gevolg dat het mogelijk is dat één en dezelfde patiënt afhankelijk van welke test een laboratorium gebruikt dan wel als positief als negatief voor *Borrelia*-antistoffen kan worden beoordeeld. Verschillen in eindconclusie tussen laboratoria kunnen het vertrouwen in de kwaliteit van de microbiologisch laboratoria in Nederland ondermijnen. Dat is een ongewenste situatie. Betere directe vergelijking van de verschillende testen in goed gedocumenteerde sera van patiënten in verschillende ziektestadia en verschillende controlegroepen, met

daarnaast interpretatie van testuitslagen in samenhang met symptomen en ziekteduur kan hopelijk in de toekomst deze interlaboratoriaverschillen verkleinen.

## Summary

Comparison of the inter-laboratory performance of Lyme disease serology in the Netherlands by quality assessment Serology is an important diagnostic tool in the diagnosis of Lyme disease. Many different commercial assays are applied. A quality assessment was performed to investigate if this contributes to inter-laboratory variation. A total of 25 samples of patients with a well-defined diagnosis of early and late Lyme disease and controls were analyzed. In nine participating laboratories five different screening assays and five different confirmation assays in eight different combinations were applied. Qualitative and quantitative values between laboratories using the same tests were within close range, indicating that inter-laboratory variation is low when the same assay is in use. However, qualitative results between different algorithms lead to some clear discrepancies and inter-laboratory variation in 3/6 cases with an early infection and 1/2 controls with non-Lyme arthritis. All laboratories correctly identified *Borrelia*-specific antibodies in patients with late Lyme disease and no positive results were reported in blood donors if the algorithm was applied. Inter-laboratory variation is mainly caused by the use of different immunoassays and test combinations. Better standardisation of Lyme serology between laboratories would lead to fewer discrepancies in reports.

## Referenties

1. Strle F, Stanek G. Clinical manifestations and Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Curr Probl Dermatol*. 2009;37:51-110.
2. Richtlijn Lyme-borreliose. Kwaliteitsinstituut voor de Gezondheidszorg CBO. 2004.
3. Wormser GP, Dattwyler RJ, Shapiro ED, Halperin JJ, Steere AC, Klemperer MS, et al. The clinical assessment, treatment, and prevention of Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2006 Nov 1;43(9):1089-134.
4. Feder HM, Abeles M, Bernstein M, Whitaker-Worth D, Grant-Kels JM. Diagnosis, treatment, and prognosis of erythema migrans and Lyme arthritis. *Clin Dermatol*. 2006;24:509-20.
5. Aguero-Rosenfeld ME, Nowakowski J, Bittker S, Cooper D, Nadelman RB, Wormser GP. Evolution of the serologic response to *Borrelia burgdorferi* in treated patients with culture-confirmed erythema migrans. *J Clin Microbiol*. 1996;34:1-9.
6. Katchaki J, Kortbeek LM, Notermans DW. Een inventarisatie van laboratorium diagnostiek van volksgezondheidsrelevante micro-organismen. RIVM rapport 230071001/2008.
7. Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, Birtles RJ, Björnsdóttir A, Blance JR, et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10:1108-32.
8. Ang CW, Notermans DW, Hommes M, Simoons-Smit AM, Herremans T. Large differences between the strategies for the detection of anti-*Borrelia* antibodies are revealed by comparing eight ELISAs and five Immunoblots. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;DOI 10.1007/s10096-011-1157-6.
9. Brandenburg AH van Dam AP, Schellekens J. Problems in comparing test strategies for detection of anti-*Borrelia* antibodies *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30:1033-4.

# Nationale vergelijking van serologische assays voor het aantonen van *Borrelia*-antistoffen

C.W. Ang, A.H. Brandenburg, N.D. van Burgel, H.A. Bijlmer, T. Herremans, F.F. Stelma, F. Verduyn Lunel, A.P. van Dam namens het Consensusberaad Lyme

## Abstract

**Background:** Numerous tests for the detection of antibodies against *Borrelia* spp are commercially available. Manufacturer derived data invariably report a high sensitivity and specificity but comparative studies demonstrate large differences between tests, especially with regard to specificity. Patient organizations in the Netherlands have also questioned the sensitivity of serological testing.

**Objective:** To investigate the sensitivity and specificity of *Borrelia* antibody assays in patients from the Netherlands with clinically well defined manifestations of *Borrelia* infection and/or confirmation with PCR.

**Methods:** We retrospectively collected data from validation studies for *Borrelia* antibody assays from seven large laboratories in the Netherlands. The total number of samples from which data in two or more assays were available was 810. Samples were selected based on clinical and laboratory parameters. We only included samples from patients with erythema migrans, acrodermatitis chronica atrophicans, neuroborreliosis, arthritis, a large number of cross reactivity controls (CMV, EBV, HIV, leptospirosis, syphilis, *Mycoplasma pneumoniae*, Parvo B19, Reumatoid factor positive) and healthy controls. Data from 10 ELISA's (C6 peptide-Immunitics, Diacheck, Enzygnost, Euroimmun, Liaison, Medac, Mikrogen, Serion, Vidas, Virotech) and five Immunoblots (Euroimmun, Mikrogen, RIVM home made, Virablot, Virotech) were analysed. The samples were derived from different laboratories with different screenings assays for *Borrelia* antibodies. In 22 patients were *Borrelia* infection was confirmed by a positive PCR.

**Results:** When IgM and IgG results were combined, sensitivities of the ELISA's varied considerably in patients with short disease duration such as EM. For ACA and arthritis patients, although groups were small, the sensitivity of all tested assays was very high and only minor discrepancies were found between tests. In cross-reactivity controls the fraction of positive samples varied considerably, mainly in IgM alone. Seropositivity rates in healthy controls were low, corresponding with earlier findings concerning seroprevalence in the Netherlands. For the Immunoblots, only for

the Mikrogen and Virotech blot sufficient data for valid conclusions were available. For these blots, the sensitivity was slightly lower than for the ELISA's, especially in patients with early Lyme disease. For disease manifestations with short duration such as EM and acute neuroborreliosis, up to about 40% of patients had IgM antibodies only, depending on the assay used. With Immunoblot the percentage of patients with EM/neuroborreliosis with IgM antibodies was 25-30%. In the cross-reactivity controls, the false positive reactions were predominantly IgM antibodies. All 22 PCR positive patients were reactive in at least one assay. Only a few PCR positive hospital derived EM patients had a negative result in one or more assays. All PCR positive patients with longer disease duration tested positive for IgG *Borrelia* antibodies.

**Conclusions:** This nationwide retrospective study demonstrates that for manifestations of *Borrelia* infection with short disease duration, the sensitivity of the assays varies considerably. In patients with long disease duration, sensitivities differ only marginally. In cross-reactivity controls, there is huge variation in the seropositivity rate, but mainly in IgM. IgM testing only adds in patients with short duration of illness, in patients with longer duration of illness IgM single positives should be interpreted with caution.

## Inleiding

Antistoftesten voor *Borrelia* zijn de meest gebruikte, en vaak enig mogelijke, vorm van diagnostiek voor de Lyme-borreliose (LB). In Duitsland, met een inwoneraantal van 82 miljoen mensen, kwam naar voren dat er ruim 2,3 miljoen enzymimmunoassays (EIA's) voor *Borrelia* worden uitgevoerd.<sup>1</sup> Voor de Nederlandse situatie met ongeveer 16,7 miljoen inwoners, zou dat neerkomen op bijna 500.000 EIA-testen per jaar!

A.H. Brandenburg, N.D. van Burgel, H.A. Bijlmer, T. Herremans, F.F. Stelma, F. Verduyn Lunel, A.P. van Dam, namens het Consensusberaad Lyme.  
Correspondentieadres: C.W. Ang, e-mailadres: w.ang@vumc.nl.

De interpretatie van *Borrelia*-serologie kan erg lastig zijn. Ten eerste is de kinetiek van de antistofrespons tegen *Borrelia* relatief traag en kunnen er met name in de in de vroege fase van de ziekte fout-negatieve testuitslagen voorkomen.<sup>2</sup> Aan de andere kant kan het serologisch onderzoek positief zijn na een in het verleden doorge- maakte (al dan niet symptomatisch verlopen) infectie, die niet gerelateerd hoeft te zijn aan de actuele symptomen van de patiënt. Daarnaast bestaat nog het probleem van de kruisreactiviteit en aspecifieke reactiviteit dat kan resulteren in fout-positieve uitslagen.<sup>3</sup> In Nederland wordt een groot aantal verschillende assays gebruikt voor het aantonen van antistoffen tegen *Borrelia*. Elk van deze testen heeft eigen testkarakteristieken die van invloed kunnen zijn op de uitslag van de test (zie ook het artikel van Herremans et al in dit nummer). De meeste fabrikanten/leveranciers van antistofassays leveren wel enige informatie over de prestaties van de door hun geleverde producten, maar er zijn slechts weinig studies die goed gedefinieerde patiëntcohorten gebruiken. Daarnaast worden testen zelden direct met elkaar vergeleken. Zodoende is het erg moeilijk om de waarde van de verschillende in Nederland gebruikte testen te kunnen inschatten.

Binnen het Lyme Consensusberaad is het initiatief genomen om de sensitiviteit en specificiteit van de in Nederland gebruikte assays voor het aantonen van antistoffen tegen *Borrelia* te onderzoeken. Hiervoor hebben de microbiologen die deelnemen aan het Consensusberaad de resultaten van de vergelijkende studies die in hun eigen instituten zijn uitgevoerd, retrospectief bij elkaar gevoegd zodat de aantallen patiënten zo groot mogelijk zouden worden en gegevens over meerdere verschillende testen worden verzameld. Bij de analyse is speciale aandacht geweest voor de waarde van IgM en IgG bij verschillende ziektemanifestaties en voor de prestaties van de assays bij patiënten bij wie de diagnose met een *Borrelia*-PCR was bevestigd.

### Patiënten en methoden

De gegevens van studies van de volgende laboratoria werden retrospectief verzameld: Izore (Leeuwarden), LVI (Groningen), LUMC (Leiden), OLVG/GGD Streeklaboratorium (Amsterdam), RIVM (Bilthoven), UMCN (Nijmegen), UMCU (Utrecht), VUmc (Amsterdam). De microbiologen werd gevraagd gegevens aan te leveren van de patiënten met duidelijk omschreven klinische manifestaties van *Borrelia*-infectie. Gegevens van patiënten met een atypisch klinisch beeld werden niet geïnccludeerd in de database. Op deze manier werden alleen typische gevallen van LB geïnccludeerd, zodat zo weinig mogelijk onzekerheid over de verwachte uitkomst kon bestaan en op die manier een goede vergelijking van testen mogelijk is. Van de volgende klinische manifestaties werden gegevens verzameld. Erythema migrans (EM), n = 214: indien als

zodanig vermeld op de aanvraag of positieve PCR van huidbiopt. Van de 214 patiënten waren er 105 afkomstig uit een prospectieve studie naar tekenbeten en risico van ontstaan van EM.<sup>4</sup> Omdat dit zeer waarschijnlijk een andere populatie is dan de patiënten die voor routinediagnostiek worden getest zijn deze twee EM groepen apart geanalyseerd. Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA): n = 28: indien als zodanig vermeld op de aanvraag, met evt positieve PCR voor *Borrelia* en passend histopathologisch beeld. Neuroborreliose, n = 102: pijnlijke meningoradiculitis en/of dubbelzijdige facialisparese, pleiocytose en/of positieve PCR voor *Borrelia* in liquor. Artritis, n = 25: monoartritis van de knie en/of positieve PCR voor *Borrelia* in gewrichtsvocht of synoviumbiopt.

Een grote groep kruisreactiviteitscontroles werd ook geanalyseerd. Dit betroffen patiënten met een acute infectie met CMV (n = 36), EBV (n = 46), leptospirose (n = 7), *M. pneumoniae* (n = 27), Parvovirus B19 (n = 17) en patiënten met hiv (n = 17), syphilis (n = 58) en patiënten die reumafactorpositief waren (n = 4). Het totaal aantal serummonsters in deze groep bedroeg 212. Daarnaast werden gegevens geïnccludeerd van 228 gezonde controles. Van de LB-patiënten was bij 22 een positieve uitslag in een lokale *Borrelia*-PCR. Dit waren 4 EM-patiënten, 4 ACA-patiënten, 4 neuroborreliosepatiënten en 10 artritispatiënten.

In de verschillende laboratoria werden in totaal 10 EIA's geanalyseerd: C6 (Immunetics), Diacheck (Julio Moran, Zwitserland), Enzygnost (Siemens), Euroimmun, Liaison (Diasorin), Medac (Oxoid), Recomwell (Mikrogen), Serion ELISA Classic (Virion), Vidas IgTotaal (Biomérieux) en Virotech (Genzyme). Een kleiner aantal monsters werd ook getest in verschillende Immunoblots. Dit waren de volgende blots: Euroline-NR-AT (Euroimmun), Recomline (Mikrogen), een in-houseblot van het RIVM, Virablot (Viramed, MP Products) en Europe Line Immunoblot (Genzyme Virotech). Alleen de Recomline Immunoblot van Mikrogen is getest in een grote groep kruisreactiviteits- en gezonde controles in een prospectieve studie in het OLVG/GGD Amsterdam Streeklaboratorium.<sup>5</sup>

Het totaal aantal monsters dat werd meegenomen in de analyse was 807. Alle antistoftesten werden uitgevoerd door het lokale laboratorium en de uitslag en eventueel de testwaarde werden gerapporteerd volgens de specificaties van de fabrikant van de assay. Testuitslagen werden gerapporteerd als negatief, grenswaarde/dubieus en positief. Niet alle monsters werden getest in alle assays. Het aantal assays waarin monsters werden getest varieerde van 2-14. Statistische analyses werden gedaan met behulp van SPSS 15.0.

### Resultaten

De resultaten van de EIA's zijn samengevat in *tabel 1*. De grenswaarde/dubieuze uitslagen zijn separaat als 'negatief' en 'positief' geanalyseerd. De variatie in sensitiviteit

tussen de verschillende assays is het meest duidelijk bij EM-patiënten. IgM-antistoffen (grenswaarde als positief geïnterpreteerd) werden gedetecteerd bij 26-80% van de EM-patiënten die via een ziekenhuislaboratorium zijn getest. Indien ook naar IgG-antistoffen werd gekeken, werd het verschil tussen de testen kleiner maar was het nog steeds aanzienlijk, het percentage positieve testuitslagen varieerde van 69-100%. Het hoogste percentage werd gehaald bij testen waarin slechts 5 resp. 13 sera zijn getest. Opvallend was de relatief lage sensitiviteit van de C6-assay in de apart geanalyseerde prospectief uitgevoerde RIVM-studie onder EM-patiënten (43-51%). Bij de klinische groepen met een gedissemineerde *Borrelia*-infectie was weinig variatie tussen de verschillende assays en nagenoeg alle assays hebben een hoog percentage positieve testuitslagen als ook de grenswaarde-uitslagen als positief worden geïnterpreteerd. Bij neuroborreliose werd een sensitiviteit van 92-100% gevonden in assays waarin minimaal 10 sera getest waren. Een enkel serum van een patiënt met een korte ziekteduur was negatief in één of meerdere testen. Voor ACA bedroeg de sensitiviteit steeds 100%. Voor Lyme-artritis was de sensitiviteit 96-100% in assays waarin minimaal 10 sera werden getest. Eén serum was negatief in de C6-EIA. De diagnose Lyme-artritis werd hier gesteld op basis van IgM- reactiviteit in de Enzygnost en Virotech EIA's en een tekenbeet in de recente voorgeschiedenis. Een PCR op gewrichtsvocht werd bij deze patiënt niet verricht. De grote spreiding in percentage positieve testen bij kruis-activiteitscontroles is opvallend (2-38%, tabel 1). Als ook de grenswaardemonsters worden beschouwd als positief stijgt dit percentage zelfs tot 60% voor bijvoorbeeld de Serion EIA. Dit geeft aan dat er een groot verschil is in specificiteit tussen de verschillende assays en zal ook leiden tot grote verschillen in aantallen monsters die moeten worden geconfirmeerd met een Immunoblot. Het percentage positieve testen bij gezonde controles varieert veel minder. Het aantal gezonde controles met grenswaarde-uitslag is ook laag, met als uitzondering wederom de Serion-EIA waarbij in een substantieel aantal gezonde controles alleen een grenswaarde IgM wordt gedetecteerd. Voor de Immunoblots zijn er minder gegevens voorhanden. In de meeste laboratoria worden alleen monsters die EIA-positief zijn, getest in een Immunoblot. Alleen voor de Mikrogen-blot zijn gegevens over kruis-activiteitscontroles en gezonde Nederlandse controles beschikbaar (tabel 2). Voor de overige klinische manifestaties zijn de aantallen geteste patiënten lager in de Immunoblot dan in de EIA. Bij de monsters van patiënten met late manifestaties (ACA en artritis) is de sensitiviteit van de blots zeer hoog. Voor patiënten met een kortere ziekteduur is het evident dat de sensitiviteit van de Immunoblot lager is dan van de EIA's. Bij de kruisactiviteitscontroles is 9% positief in IgM of IgG in de Mikrogen-Immunoblot. Het aantal gezonde controles met een

positieve testuitslag is nog kleiner, 3% (tabel 2). Zowel bij de kruisactiviteitscontroles als bij de gezonde controles zijn er enkele monsters die negatief zijn in meerdere EIA's, maar positief in de Mikrogen-Immunoblot. Er waren bij deze patiënten geen aanwijzingen dat er sprake was van een *Borrelia*-infectie.

Het volgen van een tweestapsalgoritme heeft grote invloed op het verminderen van het aantal positieve uitslagen in de kruisactiviteitsgroep. Bij de patiënten uit de prospectieve studie van het OLVG/GGD Streeklaboratorium werd in 10/66 (15%) monsters die positief/grenswaarde zijn, in minimaal een van de vijf daar uitgevoerde EIA's een positieve uitslag van de Immunoblot gevonden. Bij gezonde controles is ook slechts een klein aantal EIA-positieve monsters ook Immunoblotpositief (2/37, 5%). Helaas zijn geen gegevens van andere Immunoblots bekend, zodat geen goede vergelijking van prestaties van de Immunoblots bij deze patiëntengroepen kan worden verricht.

Een klein gedeelte van de patiënten had ook een positieve uitslag met een *Borrelia*-PCR. Alle PCR- positieve patiënten waren positief in minimaal één van de geteste assays. Negatieve EIA of Immunoblotuitslagen waren een uitzondering. Alleen bij 2 van de 4 EM-patiënten was er een negatieve EIA- of Immunoblotuitslag in één of meer van de geteste assays. Bij alle PCR-positieve patiënten met late manifestaties van *Borrelia*-infectie was een IgG-respons aantoonbaar.

## Discussie

Door middel van analyse van retrospectief verzamelde gegevens van een grote groep Nederlandse Lyme-patiënten met goed gedefinieerde ziektebeelden en van een grote groep controles is enig inzicht gekregen in de sensitiviteit en specificiteit van een groot aantal in Nederland gebruikte assays voor het aantonen van antistoffen tegen *Borrelia*.

Deze studie heeft enkele beperkingen. De studie had tot doel om een indruk te krijgen van de prestaties van commerciële assays bij Nederlandse patiënten met typische uitingen van LB. Wij hebben geprobeerd om zo helder mogelijke criteria op te stellen voor typische manifestaties van *Borrelia*-infecties maar het is duidelijk dat de aanwezigheid van een positieve serologische test voor *Borrelia*-antistoffen kan hebben geleid tot een bias bij inclusie. Dat kan weer hebben geleid tot een overschatting van de sensitiviteit van de assays.

De potentiële bias hebben wij op verschillende manieren proberen te omzeilen. Ten eerste zijn de monsters uit acht verschillende laboratoria afkomstig die een heel scala aan verschillende assays gebruiken; er heeft dus geen bias plaatsgevonden ten gunste van één bepaalde assay. Ten tweede zijn alle monsters in meer dan één assay getest, sommige zelfs tot 14 assays waarbij wel patiënten kunnen worden geïdentificeerd die seronegatief zijn in bepaalde assays.



Tabel 1. Percentage positieve testen – EIA's

EIA	Klinische manifestatie						
		EM-ziekenhuis		EM-RIVM studie		ACA	
		grenswaarde = negatief	grenswaarde = positief	grenswaarde = negatief	grenswaarde = positief	grenswaarde = negatief	grenswaarde = positief
C6 peptide	IgT	81/102 (79%)	84/102 (82%)	45/105 (43%)	53/105 (51%)	24/24 (100%)	24/24 (100%)
Diacheck	IgM	2/13 (15%)	4/13 (31%)			0/6 (0%)	2/6 (33%)
	alleen IgM	0/13 (0%)	0/13 (0%)			0/6 (0%)	0/6 (0%)
	IgG	12/13 (92%)	12/13 (92%)			6/6 (100%)	6/6 (100%)
	alleen IgG	10/13 (77%)	8/13 (62%)			6/6 (100%)	4/6 (67%)
	IgM en/of IgG	12/13 (92%)	12/13 (92%)			6/6 (100%)	6/6 (100%)
Enzygnost	IgM	49/81 (61%)	53/81 (65%)			8/14 (57%)	8/14 (57%)
	alleen IgM	12/81 (15%)	11/81 (14%)			0/14 (0%)	0/14 (0%)
	IgG	54/81 (67%)	66/81 (82%)			14/14 (100%)	14/14 (100%)
	alleen IgG	17/81 (21%)	24/81 (30%)			6/14 (43%)	6/14 (43%)
	IgM en/of IgG	77/81 (95%)	77/81 (95%)			14/14 (100%)	14/14 (100%)
Euroimmun	IgM	3/5 (60%)	4/5 (80%)				
	alleen IgM	0/5 (0%)	0/5 (0%)				
	IgG	4/5 (80%)	4/5 (80%)				
	alleen IgG	1/5 (20%)	0/5 (0%)				
	IgM en/of IgG	4/5 (80%)	4/5 (80%)				
Liaison	IgM	21/57 (37%)	26/57 (46%)			4/8 (50%)	4/8 (50%)
	alleen IgM	6/57 (11%)	5/57 (9%)			0/9 (0%)	0/8 (0%)
	IgG	44/57 (77%)	47/57 (83%)			8/8 (100%)	8/8 (100%)
	alleen IgG	29/57 (51%)	26/57 (46%)			4/8 (50%)	4/8 (50%)
	IgM en/of IgG	50/57 (88%)	52/57 (91%)			8/8 (100%)	8/8 (100%)
Medac	IgM	8/31 (26%)	8/31 (26%)			0/2 (0%)	0/2 (0%)
	alleen IgM	4/31 (13%)	4/31 (13%)			0/2 (0%)	0/2 (0%)
	IgG	18/31 (58%)	21/31 (67%)			2/2 (100%)	2/2 (100%)
	alleen IgG	14/31 (45%)	17/31 (55%)			2/2 (100%)	2/2 (100%)
	IgM en/of IgG	22/31 (71%)	25/31 (81%)			2/2 (100%)	2/2 (100%)
Mikrogen	IgM	3/5 (60%)	4/5 (80%)				
	alleen IgM	0/5 (0%)	0/5 (0%)				
	IgG	5/5 (100%)	5/5 (100%)				
	alleen IgG	2/5 (40%)	1/5 (20%)				
	IgM en/of IgG	5/5 (100%)	5/5 (100%)				
Serion	IgM	18/36 (50%)	24/36 (67%)			0/2 (0%)	0/2 (0%)
	alleen IgM	15/36 (42%)	18/36 (50%)			0/2 (0%)	0/2 (0%)
	IgG	7/36 (20%)	12/36 (33%)			2/2 (100%)	2/2 (100%)
	alleen IgG	4/36 (11%)	6/36 (17%)			2/2 (100%)	2/2 (100%)
	IgM en/of IgG	22/36 (61%)	30/36 (83%)			2/2 (100%)	2/2 (100%)
Vidas	IgT	34/55 (62%)	38/55 (69%)			18/18 (100%)	19/19 (100%)
Virotech	IgM	7/13 (54%)	9/13 (69%)			2/6 (33%)	3/6 (50%)
	alleen IgM	1/13 (8%)	1/13 (8%)			0/6 (0%)	0/6 (0%)
	IgG	11/13 (85%)	12/13 (92%)			6/6 (100%)	6/6 (100%)
	alleen IgG	5/13 (39%)	4/13 (31%)			4/6 (67%)	3/6 (50%)
	IgM en/of IgG	12/13 (92%)	13/13 (100%)			6/6 (100%)	6/6 (100%)

Klinische manifestatie							
Neuroborreliose		Artritis		Kruisreactiviteitcontroles		Gezonde controles	
grenswaarde = negatief	grenswaarde = positief	grenswaarde = negatief	grenswaarde = positief	grenswaarde = negatief	grenswaarde = positief	grenswaarde = negatief	grenswaarde = positief
86/90 (96%)	86/90 (96%)	14/16 (88%)	15/16 (94%)	17/211 (8%)	20/211 (10%)	9/228 (4%)	9/228 (4%)
0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	2/16 (13%)	2/16 (13%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	2/16 (13%)	2/16 (13%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
2/5 (40%)	4/5 (80%)	4/5 (80%)	4/5 (80%)	0/16 (0%)	1/16 (6%)	1/15 (1%)	1/15 (1%)
2/5 (40%)	4/5 (80%)	4/5 (80%)	4/5 (80%)	0/16 (0%)	1/16 (6%)	1/15 (1%)	1/15 (1%)
2/5 (40%)	4/5 (80%)	4/5 (80%)	4/5 (80%)	2/16 (13%)	3/16 (19%)	1/15 (7%)	1/15 (7%)
32/50 (64%)	39/50 (78%)	5/13 (38%)	6/13 (46%)	34/155 (22%)	46/155 (30%)	5/107 (5%)	11/107 (10%)
5/50 (10%)	5/50 (10%)	1/13 (8%)	1/13 (8%)	33/155 (21%)	41/155 (27%)	5/107 (5%)	10/107 (9%)
43/50 (86%)	44/50 (88%)	12/13 (92%)	12/13 (92%)	5/155 (3%)	15/140 (10%)	1/107 (1%)	3/107 (3%)
16/50 (32%)	10/50 (20%)	8/13 (62%)	7/13 (54%)	4/155 (3%)	10/155 (7%)	1/107 (1%)	2/107 (2%)
48/50 (96%)	49/50 (98%)	13/13 (100%)	13/13 (100%)	38/155 (25%)	56/155 (36%)	6/107 (6%)	13/107 (12%)
0/1 (0%)	0/1 (0%)			2/16 (13%)	4/16 (25%)	0/14 (0%)	0/14 (0%)
0/1 (0%)	0/1 (0%)			2/16 (13%)	4/16 (25%)	0/14 (0%)	0/14 (0%)
1/1 (100%)	1/1 (100%)			0/16 (0%)	2/16 (13%)	1/14 (7%)	2/14 (14%)
1/1 (100%)	1/1 (100%)			0/16 (0%)	2/16 (13%)	1/14 (7%)	2/14 (14%)
1/1 (100%)	1/1 (100%)			2/16 (13%)	6/16 (38%)	1/14 (7%)	2/14 (14%)
25/54 (46%)	26/54 (48%)	3/7 (43%)	3/7 (43%)	32/143 (22%)	36/143 (25%)	4/227 (2%)	6/227 (3%)
0/54 (0%)	0/54 (0%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	31/143 (22%)	33/143 (23%)	4/227 (2%)	6/227 (3%)
52/54 (96%)	54/54 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	10/143 (7%)	18/143 (13%)	8/227 (4%)	13/227 (6%)
27/54 (50%)	28/54 (52%)	4/7 (57%)	4/7 (57%)	9/143 (6%)	15/143 (11%)	8/227 (4%)	13/227 (6%)
52/54 (96%)	54/54 (100%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)	41/143 (29%)	51/143 (36%)	12/227 (5%)	19/227 (8%)
2/25 (8%)	2/25 (8%)			1/94 (1%)	1/94 (1%)	1/92 (1%)	1/92 (1%)
1/25 (4%)	1/25 (4%)			1/94 (1%)	1/94 (1%)	1/92 (1%)	1/92 (1%)
24/25 (96%)	24/25 (96%)			1/94 (1%)	1/94 (1%)	2/92 (2%)	2/92 (2%)
23/25 (92%)	23/25 (92%)			1/94 (1%)	1/94 (1%)	2/92 (2%)	2/92 (2%)
25/25 (100%)	25/25 (100%)			2/94 (2%)	2/94 (2%)	3/92 (3%)	3/92 (3%)
0/1 (0%)	0/1 (0%)			3/16 (19%)	3/16 (19%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
0/1 (0%)	0/1 (0%)			3/16 (19%)	3/16 (19%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
1/1 (100%)	1/1 (100%)			0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
1/1 (100%)	1/1 (100%)			0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
1/1 (100%)	1/1 (100%)			3/16 (19%)	3/16 (19%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
15/26 (58%)	19/26 (73%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	31/110 (28%)	56/110 (51%)	9/106 (9%)	30/106 (28%)
11/26 (42%)	10/26 (39%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	30/110 (27%)	48/110 (44%)	9/106 (9%)	29/106 (27%)
13/26 (50%)	14/26 (54%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	11/110 (10%)	18/110 (16%)	0/106 (0%)	1/106 (1%)
9/26 (35%)	5/26 (19%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	10/110 (9%)	10/110 (9%)	0/106 (0%)	0/106 (0%)
24/26 (92%)	24/26 (92%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	41/110 (37%)	66/110 (60%)	9/106 (9%)	30/106 (28%)
24/26 (93%)	24/26 (93%)	8/8 (100%)	8/8 (100%)	17/62 (27%)	24/62 (39%)	1/15 (7%)	1/15 (7%)
3/5 (60%)	3/5 (60%)	2/5 (40%)	5/5 (100%)	2/16 (12%)	8/16 (50%)	0/14 (0%)	0/14 (0%)
1/5 (20%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)	1/5 (20%)	1/16 (6%)	1/16 (6%)	0/14 (0%)	0/14 (0%)
4/5 (80%)	5/5 (100%)	4/5 (80%)	4/5 (80%)	5/16 (31%)	7/16 (44%)	0/14 (0%)	0/14 (0%)
1/5 (20%)	2/5 (40%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)	4/16 (25%)	5/16 (31%)	0/14 (0%)	0/14 (0%)
5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	6/16 (38%)	8/16 (50%)	0/14 (0%)	0/14 (0%)

Tabel 2. Percentage positieve testen – Immunoblots

Immunoblot		Klinische manifestatie					
		EM-ziekenhuis		EM-RIVM studie		ACA	
		grenswaarde = negatief	grenswaarde = positief	grenswaarde = negatief	grenswaarde = positief	grenswaarde = negatief	grenswaarde = positief
Euroimmun	IgM	1/4 (25%)	1/4 (25%)				
	alleen IgM	0/4 (0%)	0/4 (0%)				
	IgG	4/4 (100%)	4/4 (100%)				
	alleen IgG	3/4 (75%)	3/4 (75%)				
	IgM en/of IgG	4/4 (100%)	4/4 (100%)				
Mikrogen	IgM	43/83 (52%)	48/83 (58%)			5/11 (46%)	7/11 (64%)
	alleen IgM	30/83 (36%)	18/83 (22%)			0/11 (0%)	0/11 (0%)
	IgG	24/83 (29%)	48/83 (58%)			10/11 (91%)	11/11 (100%)
	alleen IgG	11/83 (13%)	18/83 (22%)			5/11 (46%)	4/11 (36%)
	IgM en/of IgG	54/83 (65%)	66/83 (80%)			10/11 (91%)	11/11 (100%)
RIVM	IgM	9/17 (53%)	14/17 (82%)	26/105 (25%)	66/105 (63%)	1/10 (10%)	6/10 (60%)
	alleen IgM	7/17 (41%)	8/17 (47%)	22/105 (21%)	55/105 (52%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)
	IgG	7/17 (41%)	8/17 (47%)	8/105 (8%)	14/105 (13%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)
	alleen IgG	5/17 (29%)	2/17 (12%)	4/105 (4%)	3/105 (3%)	9/10 (90%)	4/10 (40%)
	IgM en/of IgG	14/17 (82%)	16/17 (94%)	30/105 (29%)	69/105 (66%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)
Virablot	IgM	1/5 (20%)	1/5 (20%)				
	alleen IgM	1/5 (20%)	1/5 (20%)				
	IgG	2/5 (40%)	2/5 (40%)				
	alleen IgG	2/5 (40%)	2/5 (40%)				
	IgM en/of IgG	3/5 (60%)	3/5 (60%)				
Virotech	IgM	19/42 (45%)	20/42 (48%)			4/7 (57%)	4/7 (57%)
	alleen IgM	10/42 (24%)	3/42 (7%)			0/7 (0%)	0/7 (0%)
	IgG	16/42 (38%)	30/42 (71%)			7/7 (100%)	7/7 (100%)
	alleen IgG	7/42 (17%)	13/42 (31%)			3/7 (43%)	3/7 (43%)
	IgM en/of IgG	26/42 (62%)	33/42 (79%)			7/7 (100%)	7/7 (100%)

Een andere beperking van deze studie is dat het gaat om een retrospectieve verzameling van gegevens uit verschillende validatiestudies van lokale laboratoria. De serummonsters zijn dus niet allemaal in dezelfde set van assays head-to-head met elkaar vergeleken. De aantallen van sommige klinische beelden zijn bovendien relatief laag. Het adherentiegebied van de deelnemende laboratoria is groot en het feit dat er slechts weinig typische gevallen van late LB beschikbaar zijn voor dit onderzoek wijst erop dat de typische gevallen van late LB niet zo vaak voorkomen. Wij kunnen geen conclusieve uitspraken doen over vergelijking van testen, aangezien niet dezelfde sera in alle testen zijn getest, en het aantal geïncludeerde patiënten laag is. Onze studie suggereert kleine verschillen

in sensitiviteit tussen de testen. Op basis van deze studie is dus alleen te concluderen dat de geïncludeerde testen een goede sensitiviteit hebben voor het aantonen van gedissemineerde LB. Prospectief aangelegde biobanken met daarin materiaal van goed gedefinieerde patiënten met *Borrelia*-infectie zullen het mogelijk maken om goede vergelijkende studies te doen, waarbij alle monsters in alle te vergelijken assays worden getest.

Een laatste beperking is dat er continu veranderingen worden doorgevoerd door fabrikanten van assays, waardoor een aantal beschreven assays (onder meer Serion, VIDAS) in een veranderde versie worden geleverd. Deze nieuwe assays zijn voor zover bekend niet of nauwelijks gevalideerd door Nederlandse microbiologen.

Klinische manifestatie							
Neuroborreliose		Artritis		Kruisreactiviteitcontroles		Gezonde controles	
grenswaarde = negatief	grenswaarde = positief	grenswaarde = negatief	grenswaarde = positief	grenswaarde = negatief	grenswaarde = positief	grenswaarde = negatief	grenswaarde = positief
0/1 (0%)	0/1 (0%)						
0/1 (0%)	0/1 (0%)						
0/1 (0%)	0/1 (0%)						
0/1 (0%)	0/1 (0%)						
0/1 (0%)	0/1 (0%)						
37/67 (55%)	44/67 (66%)	4/8 (50%)	5/8 (63%)	13/163 (8%)	27/163 (17%)	2/104 (2%)	3/104 (3%)
17/67 (25%)	5/67 (8%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)	12/63 (7%)	21/163 (13%)	2/104 (2%)	3/104 (3%)
36/67 (54%)	60/67 (90%)	7/8 (88%)	8/8 (100%)	3/160 (2%)	18/163 (11%)	1/104 (1%)	5/104 (5%)
16/67 (24%)	21/67 (31%)	3/8 (38%)	3/8 (38%)	2/163 (1%)	12/163 (7%)	1/104 (1%)	5/104 (5%)
53/67 (79%)	65/67 (97%)	7/8 (88%)	8/8 (100%)	15/163 (9%)	39/163 (24%)	3/104 (3%)	8/104 (8%)
5/15 (33%)	8/15 (53%)	2/3 (67%)	2/3 (67%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)		
4/15 (27%)	4/15 (27%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)		
8/15 (53%)	9/15 (60%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)		
7/15 (47%)	5/15 (33%)	1/3 (33%)	1/3 (33%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)		
12/15 (80%)	13/15 (87%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)		
0/1 (0%)	0/1 (0%)						
0/1 (0%)	0/1 (0%)						
1/1 (100%)	1/1 (100%)						
1/1 (100%)	0/1 (0%)						
1/1 (100%)	1/1 (100%)						
13/30 (43%)	19/30 (63%)	1/3 (33%)	1/3 (33%)	4/44 (9%)	10/44 (23%)		
3/30 (10%)	2/30 (7%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	4/44 (9%)	9/44 (21%)		
15/30 (50%)	21/30 (70%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/44 (5%)	7/44 (16%)		
5/30 (17%)	4/30 (13%)	2/3 (67%)	2/3 (67%)	2/44 (5%)	6/44 (14%)		
23/30 (77%)	23/30 (77%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	6/44 (14%)	16/44 (36%)		

Patiënten die met behulp van PCR zijn geïdentificeerd, waren allen positief in een of meerdere testen. Hoewel deze patiënten waarschijnlijk een aparte groep vormen – meestal wordt immers geen PCR-onderzoek verricht – geeft dit wel aan dat slechts een zeer klein aantal patiënten met een goed gedefinieerde manifestatie van *Borrelia*-infectie seronegatief zal zijn. PCR-onderzoek van de liquor van een serie patiënten die werd verdacht van neuroborreliose toonde aan dat er in één centrum geen additionele, seronegatieve, patiënten werden gediagnosticeerd met PCR (Ang, ongepubliceerde gegevens). Seronegatieve late LB lijkt zeldzaam. Bij de in de literatuur beschreven casus zijn vaak onvoldoende gegevens over de

gebruikte testen bekend om de seronegativiteit op waarde te kunnen schatten.<sup>6-9</sup> Bij de goed gedocumenteerde gevallen betreft dit in een aantal gevallen een onderliggende afweerstoornis die leidt tot een verminderde antistofrespons.<sup>10</sup> Bij deze zeldzame patiënten kan serologische diagnostiek een zodanig verminderde gevoeligheid hebben dat bij een negatief serologisch onderzoek ook een *Borrelia*-PCR moet worden gedaan om veronderstelde LB aan te tonen dan wel uit te sluiten.

Wat opvalt is het verschil in de frequentie van positieve uitslagen in de C6-assay bij patiënten die in een prospectieve epidemiologische studie naar het voorkomen van EM waren geïncludeerd.<sup>4</sup> Mogelijke oorzaak hiervan is een

selectiebias, waarbij in de ziekenhuizen vooral sera van wat langer bestaande huidafwijkingen ingezonden zouden kunnen zijn.

Wij hebben bewust gekozen om geen patiënten met atypische verschijnselen op te nemen in deze studie. Omdat er geen standaard bestaat voor het aantonen van LB is het onduidelijk wat de waarde van een positieve test is bij deze categorie patiënten. Met name de informatie van de prestaties van de testen bij kruisreactiviteitscontroles en gezonde controles zijn van belang bij het interpreteren van een positieve of grenswaarde-uitslag bij een specifieke assay. Deze informatie was tot nu toe niet voorradig en met name de gegevens van de prospectieve studie van het OLVG/GGD Amsterdam Streeklaboratorium voorzien in een grote behoefte omdat nu een goede inschatting kan worden gemaakt van de waarde van verschillende serologische patronen zoals grenswaarde IgM en een geïsoleerde positieve IgM-testuitslag.<sup>5</sup> Voor patiënten met langdurige klachten voegt een IgM-test weinig toe. Bij dit soort patiënten bestaat juist het risico dat aspecifiek reagerende antistoffen leiden tot een geïsoleerd fout-positieve IgM-uitslag met alle verwarring die dat met zich meebrengt. Een positieve IgM-uitslag, zonder IgG, bij een patiënt met langdurige atypische klachten moet met grote voorzichtigheid worden geïnterpreteerd omdat bij goed gedocumenteerde manifestaties zoals ACA en artritis bij alle patiënten een IgG-respons wordt aangetoond.

Het door nationale en internationale richtlijnen aangeraden tweestaps diagnostisch algoritme met screenings-EIA en confirmatie met Immunoblot wordt niet door alle laboratoria gevolgd.<sup>11-13</sup> Sommige laboratoria confirmeren met een tweede EIA, andere laboratoria voeren altijd zowel een EIA als een Immunoblot uit. Deze en andere studies tonen aan dat een positieve Immunoblot niet altijd noodzakelijk is voor het stellen van de diagnose. Indien gedetailleerde gegevens beschikbaar zijn over ziekteduur, klinische presentatie en gegevens van andere diagnostische onderzoeken is het mogelijk om bij patiënten met een korte ziekteduur de klinische diagnose waarschijnlijk te bevestigen met een positieve/grenswaarde EIA-uitslag en negatieve Immunoblot.<sup>2</sup>

Ter verhoging van de sensitiviteit is het in sommige laboratoria gebruikelijk om meerdere EIA's te doen, of om altijd een Immunoblot te doen, onafhankelijk van de uitslag van de EIA. Het risico bestaat dat dit leidt tot slechts een marginale verhoging van het aantal gediagnosticeerde patiënten met Lyme-borreliose ten koste van een toename van het aantal fout-positieve uitslagen. Bij het verrichten van meer EIA's gaat de het aantal monsters met minimaal één positieve test marginaal omhoog. Dit hangt voornamelijk af van de keuze van de EIA en het ziektebeeld. Bij korte ziekteduur en typisch ziektebeeld (voornamelijk neuroborreliose) en een negatieve uitslag in een EIA, kan het testen van het monster in een andere EIA in een klein aantal gevallen wel leiden

tot een positieve of grenswaarde uitslag. Bij patiënten met langere ziekteduur ligt dat anders. Bij chronische patiënten, bijv ACA patiënten, is de sensitiviteit van alle assays hoog en heeft toevoegen van meer testen nauwelijks een effect op het aantal patiënten met een positieve test.<sup>2</sup> Het nadeel van het verrichten van meer assays is het rapporteren van meer positieve testuitslagen bij patiënten die geen LB hebben. Sommige EIA's zijn hiervoor meer gevoelig dan andere en dit is belangrijk bij de keuze van assay en de interpretatie van uitslagen. Voor Immunoblots zijn op dit moment alleen gegevens beschikbaar uit de prospectieve studie van het OLVG/GGD Amsterdam Streeklaboratorium, die zijn uitgevoerd met de Mikrogenblot. Uit de gegevens van de Mikrogenblot blijkt dat het uitvoeren van een Immunoblot na een positieve screenings-EIA leidt tot een sterke verlaging van het aantal fout-positieve uitslagen bij kruisreactiviteitscontroles. Dit is dus van grote waarde bij patiënten met chronische klachten. Het valt te verwachten dat bij Immunoblots met minder goede specificiteit deze situatie heel anders kan zijn. De gegevens uit de OLVG/GGD Amsterdam Streeklaboratoriumstudie laten zien dat er in Nederland dus een Immunoblot verkrijgbaar is met goede specificaties. Mogelijk zijn ook andere Immunoblots geschikt maar onderzoek waarbij meerdere Immunoblots in grote groepen goed gedefinieerde patiënten met elkaar worden vergeleken, is voor zover bekend niet verricht.

Op basis van deze retrospectieve studie kunnen we stellen dat er bij patiënten met korte ziekteduur een aanzienlijke variatie in sensitiviteit bestaat tussen de assays die in Nederland in gebruik zijn. Bij lange ziekteduur is de sensitiviteit van nagenoeg alle testen hoog en is er slechts weinig verschil in sensitiviteit tussen de assays. Bij kruisreactiviteitscontroles is er een grote variatie in specificiteit, met name bij de IgM-bepalingen. Interpretatie van uitslagen van *Borrelia*-serologie dient dus altijd te gebeuren in combinatie met klinische gegevens van de patiënt. Voor de Nederlandse patiënten die worden verdacht van een *Borrelia*-infectie zijn er goede serologische testen beschikbaar met hoge sensitiviteit en specificiteit. Het grote aantal verschillende assays met verschillende testkarakteristieken bemoeilijkt de standaardisatie en daarmee interpretatie van serologische uitslagen.

## Literatuur

1. Muller I, Freitag MH, Poggensee G, et al. Evaluating frequency, diagnostic quality, and cost of Lyme borreliosis testing in Germany: a retrospective model analysis. *Clinical & Developmental Immunology* 2012: article ID 595427.
2. Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. *Lancet*. 2012;379(9814):461-73.
3. Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007;49(1):13-21.
4. Herremans T, Hofhuis A, Notermans DW, et al. Combining C6 ELISA and IgM immunoblot for the detection of antibodies in early Lyme infection. 20th ECCMID 2010.



- Van Dam AP, Coumou J. Performance of five VlsE containing immunoassays for the diagnosis of Lyme borreliosis. *Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie* 2012;20 (suppl):S68.
- Steere AC. Reply to letter by Volkman commenting on the possible onset of seronegative disease in Lyme arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009 Jan;60(1):310.
- Holl-Wieden A, Suerbaum S, Girschick HJ. Seronegative Lyme arthritis. *Rheumatol Int.* 2007;27(11):1091-3.
- Valentine-Thon E, Ilsemann K, Sandkamp M. A novel lymphocyte transformation test (LTT-MELISA) for Lyme borreliosis. *Diagnos Microbiol Infect Dis.* 2007 Jan;57(1):27-34.
- Dejmkova H, Hulinska D, Tegzova D, Pavelka K, Gatterova J, Vavrik P. Seronegative Lyme arthritis caused by *Borrelia garinii*. *Clin Rheumatol.* 2002;21(4):330-4.
- Harrer T, Geissdorfer W, Schoerner C, Lang E, Helm G. Seronegative Lyme neuroborreliosis in a patient on treatment for chronic lymphatic leukemia. *Infection.* 2007;35(2):110-3.
- Ang CW, Notermans DW, Hommes M, Simoons-Smit AM, Herremans T. Large differences between test strategies for the detection of anti-*Borrelia* antibodies are revealed by comparing eight ELISAs and five immunoblots. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;30(8):1027-32.
- Jansson C, Carlsson SA, Granlund H, Wahlberg P, Nyman D. Analysis of *Borrelia burgdorferi* IgG antibodies with a combination of IgG ELISA and VlsE C6 peptide ELISA. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(2):147-50.
- Wilske B, Zöller L, Brade V, et al. MiQ-12 Lyme-Borreliosis (English internet version). In: Mauch H, Lütticken R, Gattermann S, eds. *Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik.* München Jena: Urban & Fisher Verlag, 2000.

NVHB - CURSUS

## 'Behandeling van patiënten met HIV/Aids'



Op donderdag 15 november 2012 verzorgt de NVHB voor de tiende maal de cursus 'Behandeling van patiënten met HIV/Aids', in het Descartes-Centrum te Utrecht. Dit is een praktijkgerichte basiscursus over de behandeling van patiënten met hiv/aids. Deze is speciaal bedoeld

voor arts-assistenten, specialisten en artsen die in hun dagelijks werk te maken krijgen of hebben met patiënten met een hiv-infectie. De cursus is niet bedoeld voor aidsbehandelaren of fellows infectieziekten die reeds de masterclass hebben gevolgd. Wilt u zich aanmelden of meer informatie? Neem dan contact op met Van Zuiden Communications B.V., Marina Kapteyn, tel. 0172 4761 91, e-mail: kapteyn@vanzuidencommunications.nl. U ontvangt dan een aanmeldingsformulier.

### PROGRAMMA

- 09.00 - 09.30 uur** Ontvangst
- 09.30 - 10.30 uur** **Theorie:** Virologie, immuunrespons en beloop  
Dr. F.P. Kroon, internist
- 10.30 - 11.00 uur** Casus 1: Acute infectie
- 11.00 - 11.15 uur** Pauze
- 11.15 - 13.00 uur** **Casus 2:** Opportunistische infecties  
**Casus 3:** HIV en zwangerschap  
**Casus 4:** Postexposure prophylaxe
- 13.00 - 14.00 uur** Lunch
- 14.00 - 15.00 uur** **Theorie:** Behandeling en complicerende factoren  
Prof. dr. K. Brinkman, internist
- 15.00 - 15.30 uur** Casus 5: Antiretrovirale therapie
- 15.30 - 15.45 uur** Pauze
- 15.45 - 16.45 uur** **Casus 6:** Co-infecties  
**Casus 7:** Bijwerkingen therapie  
**Casus 8:** De oudere hiv-patiënt met cardiovasculaire problemen
- 16.45 - 17.15 uur** Algemene discussie en afsluiting
- 17.15 - 18.00 uur** Borrel

# Borrelia-serologie in de Nederlandse situatie: interpretatie van testuitslagen en ontwikkelingen

C.W. Ang, N.D van Burgel

## Samenvatting

Interpretatie van *Borrelia*-serologie wordt door veel artsen als lastig ervaren. Informatie over de ziekteduur is onmisbaar voor een juiste interpretatie. In dit artikel wordt een overzicht gegeven van de problemen die in de praktijk kunnen voorkomen en een algoritme voorgesteld dat kan worden gebruikt als leidraad bij de interpretatie van antistoftesten.

## Trefwoorden

Borrelia-serologie, testuitslagen, tweestaptesten

## Introductie

Het aantonen van antistoffen tegen *Borrelia* spp is een van de belangrijkste methoden om Lyme-borreliose te diagnosticeren.<sup>1</sup> De interpretatie van de uitslagen van antistoftesten wordt door veel artsen als lastig ervaren. Een gedeelte van de problemen wordt veroorzaakt door verschillen in assaykarakteristieken zoals uitgebreid toegelicht in artikelen elders in deze uitgave. Daarnaast zorgt de kinetiek van de antistofrespons ervoor dat de interpretatie van sommige uitslagen alleen mogelijk is wanneer de klinische gegevens en ziekteduur bekend zijn. De plaats en interpretatie van andere methoden van diagnostiek naar *Borrelia*-infecties zoals PCR en T-celstimulatiestesten wordt in een ander artikel in dit nummer beschreven.

Dit artikel heeft de interpretatie van de antistoftesten als onderwerp. We zullen eerst algemene diagnostische overwegingen bij serodiagnostiek bij *Borrelia*-infecties bespreken. Dit omvat zowel de kinetiek van de antistofrespons als algemene diagnostische principes zoals vooraf- en achterafkansen. Een groot gedeelte van deze onderwerpen wordt ook uitgebreid besproken in de conceptrichtlijn Lyme-borreliose, maar in dit artikel zullen we dieper ingaan op concrete testsituaties en handvaten bieden voor de dagelijkse praktijk.

Vrijwel alle validatiestudies van serologische testen hebben betrekking op volwassenen. Over kinderen is slechts een beperkte hoeveelheid informatie beschikbaar. Op basis van ervaringen bij het testen van monsters van kinderen lijken er geen evidente verschillen te zijn in kinetiek van de antistofrespons; er zijn echter wel aanwijzingen dat kinderen al vroeger in het beloop van een *Borrelia*-infectie een meer uitgesproken of verder gevorderd klinisch beeld

kunnen hebben.<sup>2</sup> De antistofkinetiek bij kinderen is voor zover bekend gelijk aan die bij volwassenen en de hieronder gegeven adviezen kunnen derhalve ook worden toegepast in een pediatrische populatie.

## Tweestaptesten: screening en confirmatie

Het testen voor antistoffen tegen *Borrelia* dient in twee stappen te gebeuren, identiek aan de situatie bij *Treponema pallidum*.<sup>3</sup> Indien een monster van een patiënt een positieve uitslag heeft, wordt dit geconfirmeerd met een andere techniek. De meest gebruikte confirmatiemethode is de Immunoblot maar verschillende studies tonen aan dat in principe ook kan worden geconfirmeerd met behulp van andere serologische test in EIA-formaat.<sup>4</sup>

De achterliggende reden voor de confirmatiestap is dat *Borrelia*-antigenen relatief vaak kruisreageren of reageren met aspecifiek bindende antistoffen. Een nadeel van deze tweestapmethode is dat deze relatief veel tijd kost. Een tweede nadeel is dat een Immunoblot soms nog negatief is bij vroege manifestaties van Lyme-borreliose.<sup>5</sup>

Bij langer bestaande klachten op basis van de ziekte van Lyme is de confirmatie met de Immunoblot zeer waardevol. Bij aspecifieke reactiviteit (vnl. IgM) die wordt gedetecteerd met een screenings-EIA, is de Immunoblot in de meerderheid van de gevallen negatief, waardoor een infectie met *Borrelia* onwaarschijnlijk wordt.<sup>5</sup> Het verrichten van een Immunoblot na een negatieve screenings-EIA is niet aan te raden. De sensitiviteit van de Immunoblots is namelijk niet hoger en ook met de Immunoblots kunnen aspecifiek reagerende antistoffen zorgen voor fout-positiviteit.<sup>6</sup>

## Indeling van ziektebeelden waarbij *Borrelia*-serologie wordt aangevraagd

Dit artikel beoogt niet een leerboek voor Lyme-borreliose te zijn maar voor een goede interpretatie van *Borrelia*-

N.D. van Burgel, arts-microbioloog, afdeling Medische Microbiologie, Hagaziekenhuis, Den Haag.  
Correspondentieadres: C.W. Ang, arts-microbioloog, afdeling Medische Microbiologie en Infectiepreventie, VUmc, Amsterdam, e-mail: w.ang@vumc.nl

serologie is ook een gedegen kennis benodigd van de ziektebeelden die kunnen worden veroorzaakt door *Borrelia*-infecties. Deze manifestaties kunnen worden ingedeeld op grond van orgaanlokalisatie, disseminatie en tijdsbeloop. Voor interpretatie van de serologische bepalingen is een indeling in tijdsbeloop het meest geschikt. Hierbij wordt uitgegaan van de duur van de symptomen. Uit een groot aantal onderzoeken blijkt dat bij een ziekte duur van minder dan 6-8 weken de antistofrespons tegen *Borrelia* soms nog niet detecteerbaar is.<sup>5,7</sup> Herhaling van de test enkele weken later toont dan wel een positief resultaat in de screenings-EIA, indien er geen behandeling heeft plaatsgevonden. Afhankelijk van de gebruikte assay kan er bij confirmatie met behulp van Immunoblot er ook nog een negatieve of grenswaarde uitslag volgen omdat de antistofrespons zich initieel beperkt tot enkele antigenen. Bij de interpretatie moet met deze langzame kinetiek van de antistofrespons rekening worden gehouden.

### Vroege manifestaties

De meeste serologische aanvragen voor *Borrelia*-diagnostiek hebben betrekking op dermatologische ziektebeelden met een korte ziekte duur.<sup>8</sup> Dit kan zowel een klassiek erythema migrans (EM) zijn, waarvoor eigenlijk geen diagnostiek hoeft te worden aangevraagd, maar ook atypische vormen, waarbij de aanvrager twijfelt of de huidafwijking een EM is of iets anders.<sup>8,9</sup> In de praktijk blijkt dat een EM in veel gevallen zich niet presenteert als de klassieke bulls-eyelaesie, maar zich ook kan presenteren als erytheem, eventueel met schilfering of purpura. Soms gaat de laesie gepaard met jeuken, branden of gevoelloosheid.

Andere vroege presentaties van de Lyme-borreliose zijn perifere facialis parese (bij kinderen enkel en dubbelzijdig, bij volwassenen dubbelzijdig, vaak eerst de ene, daarna de andere zijde), aandoeningen aan één of meerdere andere hersenzenuwen, pijnlijke meningoradiculitis (Syndroom van Bannwarth), artritis (vaak monoartritis, voornamelijk van de knie en overige grote gewrichten), een *Borrelia*-lymfocytroom en carditis (AV-blok).<sup>1</sup> Het feit dat deze ziektebeelden een (sub-)acuut begin hebben betekent overigens niet dat de klachten geen langdurig beloop kunnen hebben.<sup>2,10</sup>

### Chronische manifestaties

Veel patiënten presenteren zich met klachten die veel langer bestaan dan de 6-8 weken die het duurt om een antistofrespons tegen *Borrelia* aan te kunnen tonen. In de differentiële diagnose van deze patiënten staan vaak ook ziekten waarbij er specifieke reactiviteit in verschillende serologische testen kan optreden, zoals bij patiënten met auto-immuunziekten. De interpretatie van grenswaarde-uitslagen zou bij deze groep patiënten

anders moeten zijn.<sup>5</sup> Bij patiënten met goed gedocumenteerde chronische uitingen van *Borrelia*-infectie, zoals acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) en PCR bevestigde chronische artritis is er nagenoeg altijd een sterke IgG-respons aantoonbaar, onafhankelijk van de gebruikte *Borrelia*-assay.<sup>15</sup> Een grenswaarde/dubieuze IgG-uitslag bij patiënten met een lange ziekte duur moet dan ook met argwaan worden bekeken. Er kan sprake zijn van een acute verergering van een reeds bestaand onderliggend lijden, uitgelokt door een recente *Borrelia*-infectie of een *Borrelia*-infectie in het verre verleden die niet in verband staat met de huidige ziekte-episode. Ook bestaat de kans op specifieke reactiviteit, bijvoorbeeld door kruis-reagerende (auto-)antistoffen.

### Relatie tussen antistoffen en ziekte

Afhankelijk van de gebruikte screeningsassay en de antigenen die daarin zitten, komen antistoffen tegen *Borrelia* voor bij 3-9% van de Nederlandse bevolking.<sup>5</sup> Bij personen die veel blootstelling hebben aan teken (onder andere boswachters) kan dat percentage nog hoger zijn.<sup>11</sup> Het is dus duidelijk dat het aantonen van antistoffen niet gelijk kan worden gesteld met het stellen van de diagnose 'Lyme-borreliose'.

### Positieve testuitslagen

Bij de interpretatie van de testuitslagen (de achterafkans) moet dus rekening worden gehouden met de voorafkans op Lyme-borreliose. Indien een patiënt een positieve antistoftest heeft bij een ziektebeeld waarbij een zeldzame associatie is beschreven met een *Borrelia*-infectie kan de positieve test op twee manieren worden geïnterpreteerd. Ten eerste als bewijs voor causaliteit (de infectie is de oorzaak van de ziekte), ten tweede kan de positieve test worden geïnterpreteerd als toevalsbevinding (5% van de personen in de bevolking heeft een positieve test, dus ook 5% van de patiënten met deze aandoening die geen Lyme hebben als oorzaak) (tabel 1).

**Tabel 1.** Positieve en negatieve voorspellende waarde van een serologische test met sensitiviteit en specificiteit van 95% voor het aantonen van *Borrelia*-antistoffen.

Voorafkans	Positieve voorspellende waarde	Negatieve voorspellende waarde
Laag (1-5%) (zeldzame manifestatie zoals carditis, uveïtis, myositis, etc.)	16,1-50,0%	99,7-99,9%
Gemiddeld (10-20%)	67,9-82,6%	98,7-99,4%
Hoog (50-95%) (typische ACA, meningoradiculitis na tekenbeet)	95,0-99,7%	50-95%

Helaas ontbreken voor een groot aantal ziektebeelden studies voor de Nederlandse situatie waardoor het vaststellen van de voorafkansen heel moeilijk is. Een prospectieve studie naar redenen voor het aanvragen van Lyme-diagnostiek toonde aan dat het percentage positieve antistoftesten bij patiënten die werden verdacht van *Borrelia*-infectie, slechts licht verhoogd was ten opzichte van controles.<sup>6</sup> Ook in een aantal retrospectieve studies (Ang, unpublished; Van Burgel, unpublished) kwam naar voren dat bij afdelingen zoals de KNO, oogheelkunde en reumatologie, het percentage patiënten met een positieve screeningstest nagenoeg gelijk was aan het percentage positieve individuen in de normale bevolking. Deze studies tonen dus aan dat we ook in Nederland in de dagelijkse praktijk regelmatig te maken krijgen met positieve testuitslagen die mogelijk niet gerelateerd zijn aan het ziektebeeld waarmee de patiënt zich presenteert.

### Negatieve testuitslagen

Ook bij de interpretatie van negatieve testuitslagen speelt de voorafkans soms een grote rol. Bij vroege gedissemineerde *Borrelia*-infecties (bijvoorbeeld bij vroege neuroborreliose) kan de antistofrespons nog onvoldoende tot ontwikkeling zijn gekomen en kunnen fout-negatieve uitslagen voorkomen. Bij een typische manifestatie van Lyme-borreliose (= hoge voorafkans) en korte ziekte duur sluit een negatieve test de ziekte dus niet uit (tabel 1).

Indien de klachten langer dan acht weken bestaan is de sensitiviteit van de antistoftesten hoog. Het is hierbij van belang dat intussen geen behandeling is gegeven, want bij behandeling van een vroege Lyme-borreliose kan de ontwikkeling van de antistofrespons worden beïnvloed. Deze patiënten krijgen geen isotypeswitch naar IgG, of een vroeg meetbare respons kan weer verdwijnen. Bij onbehandelde patiënten met een ziekte duur van meer dan acht weken maakt een negatieve test een Lyme-borreliose zeer onwaarschijnlijk. In uitzonderingsgevallen, zoals bijvoorbeeld bij (partiële) immunodeficiënties, kan sprake zijn van een 'seronegatieve Lyme'. In de peer-reviewed literatuur zijn echter slechts een klein aantal goed gedocumenteerde gevallen beschreven en vaak bestaat er onduidelijkheid over de kwaliteit van de serologische testen en de specificiteit van de gebruikte methoden om een *Borrelia*-infectie aan te tonen.<sup>12-15</sup>

### Persisteren en verdwijnen van antistoffen

Ook jaren na de initiële infectie en behandeling kunnen anti-*Borrelia*-antistoffen aantoonbaar blijven in bloed.<sup>16</sup> Met name de kinetiek van de IgM is hierbij bijzonder in vergelijking met andere infectieserologie. De IgM kan jaren positief blijven, of nooit goed converteren naar IgG. De anti-*Borrelia*-IgM heeft dus, behalve bij de diagnostiek van zeer vroege infecties, geen aanvullende waarde. Vanwege het persisteren van antistoffen ondanks behandeling heeft

het verrichten van follow-upserologie geen therapeutische consequenties en moet deze daarom niet worden verricht.

## Interpretatie van *Borrelia* serologie met behulp van klinische gegevens

### Vroege manifestaties

In figuur 1A en 1B zijn de overwegingen van de twee bovenstaande paragrafen samengevat. Bij een ziekte duur van minder dan acht weken kan de screenings-EIA en/of Immunoblot nog negatief zijn (figuur 1A). Bij een hoge voorafkans (bijvoorbeeld typische EM) heeft een negatieve uitslag geen grote invloed op de achterafkans. Die blijft hoog, omdat het immers een typische uiting van een *Borrelia*-infectie is. Dit is ook de reden waarom, volgens zowel de oude als de nieuwe Lyme-richtlijn bij een typische EM geen serologisch onderzoek hoeft te worden verricht. Bij andere vroege manifestaties kunnen grenswaarde/dubieuze uitslagen van zowel de EIA als de Immunoblot voorkomen die een uiting kunnen zijn van een beginnende immuunrespons. Nader onderzoek in de vorm van bijvoorbeeld een liquorpunctie bij verdenking neuroborreliose is hierbij vaak op zijn plaats.

Het wordt moeilijker als de patiënt een kort bestaande aandoening heeft waarbij de relatie met *Borrelia*-infectie veel minder sterk is zoals een panoftalmitis, myositis of hepatitis. Een negatieve test sluit een *Borrelia*-infectie nog niet helemaal uit want vanwege de kinetiek van de antistofrespons kan de test twee tot drie weken later alsnog positief worden. Ook een positieve bevinding stelt ons voor problemen. De positieve testuitslag kan ook zijn veroorzaakt door een eerdere (mogelijk asymptomatische) *Borrelia*-infectie. In de praktijk valt dit vaak niet uit te sluiten en, indien er geen andere oorzaak voor de klachten wordt gevonden, kan worden geadviseerd om een antibiotische behandeling in te stellen indien antistoffen tegen *Borrelia* worden aangetoond.

### Chronische manifestaties

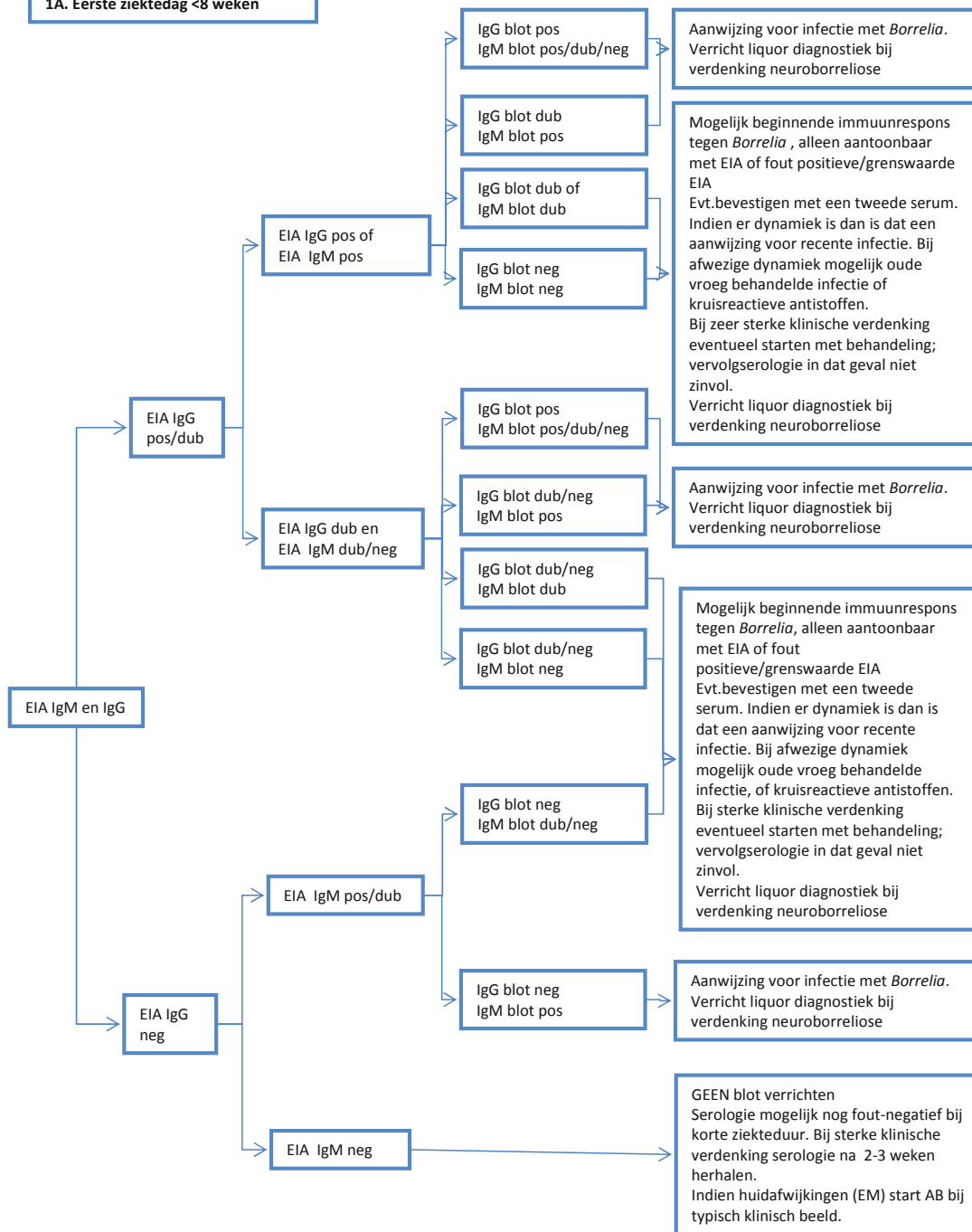
Bij een langer dan twee maanden bestaande ziekte duur heeft het immuunsysteem voldoende tijd gehad om een detecteerbare antistofrespons tegen *Borrelia* te genereren. Een negatieve testuitslag betekent dus dat het zeer onwaarschijnlijk is dat de klachten worden veroorzaakt door een *Borrelia*-infectie. Nader onderzoek naar een *Borrelia*-infectie met een Immunoblot heeft geen toegevoegde waarde omdat de sensitiviteit van de screenings-EIA's zo hoog is bij langer bestaande klachten (figuur 1B). Een positieve testuitslag bij zeldzame manifestaties kunnen in grote lijnen op dezelfde manier worden benaderd als bij vroege manifestaties.

### Testverschillen

De karakteristieken van de in Nederland gebruikte assays voor het aantonen van antistoffen tegen *Borrelia* zijn verschillend. Dat komt tot uiting in kleine verschillen in sensitiviteit en specificiteit bij patiënten met goed

**Figuur 1. Stroomschema interpretatie Borrelia serodiagnostiek**

**1A. Eerste ziektedag <8 weken**

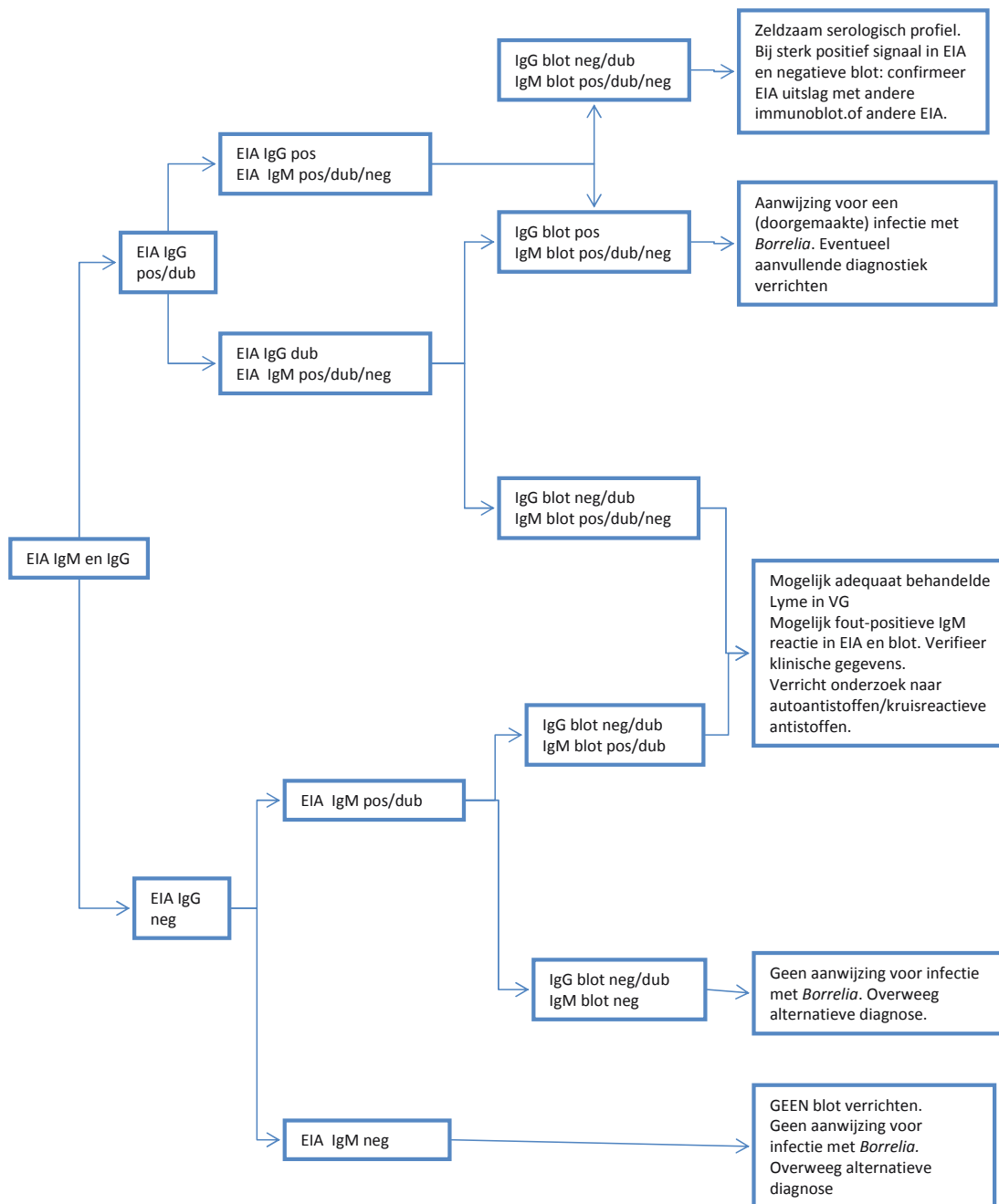


gedefinieerde uitingen van een Lyme-borreliose en bij gezonde controles. Bij patiënten met een onderliggend lijden dat kan zorgen voor aspecifieke antistofreactiviteit is het verschil tussen de assays aanzienlijk. Het komt dus regelmatig voor dat een patiënt in het ene laboratorium een negatieve testuitslag heeft, en in het andere lab een positieve uitslag heeft. Indien dat gebeurt is niet goed uit te leggen welk van de twee assays het bij het juiste eind heeft. De lokale arts-microbioloog moet op grond van de

populatie- en testkarakteristieken (wat is het percentage positieve testen bij potentiële kruisreactieve monsters, wat is de seroprevalentie tegen *Borrelia* in mijn patiëntenpopulatie, hoe hoog zijn de gevonden waarden, was er alleen IgM. etc.?) een inschatting maken bij zulke gevallen. Van de meest gebruikte testen in Nederland is door gezamenlijke inspanning nu een overzicht gekomen van een groot aantal testkarakteristieken zodat voor de Nederlandse situatie nu gegevens beschikbaar zijn.<sup>5</sup>



1b. Eerste ziektedag >8 weken



**Introductie en validatie van nieuwe en reeds bestaande assays**

Op dit moment zijn er meer dan 20 verschillende soorten antistoffesten commercieel verkrijgbaar in Nederland. Bij de SKML-rondzending in 2010 werden 10 verschillende ELISA's gerapporteerd en vijf verschillende blots. Uit de prospectieve en retrospectieve vergelijkingsstudies elders in dit nummer van het NTMM blijkt duidelijk dat er verschillen in testuitslagen voor een gedeelte terug te

voeren zijn op de gebruikte assay.<sup>5,17</sup> Daarnaast blijkt dat het huidige aanbod van antistoffesten ruimschoots voldoet. Voor elke testindicatie zijn assays beschikbaar met hoge sensitiviteit en specificiteit en de Nederlandse artsen-microbioloog hebben dus keuze uit verschillende opties. Door innovatie zullen ongetwijfeld de komende jaren nieuwe antistoffesten worden geïntroduceerd op de Nederlandse markt. Bij introductie van een nieuwe test op de Nederlandse markt zou een (Nederlands) laboratorium

dat gespecialiseerd is in *Borrelia* serologie een adequate validatiestudie moeten uitvoeren om te onderzoeken of de nieuwe test minimaal gelijkwaardig presteert ten opzichte van het huidige aanbod. Een probleem bij dit soort studies is het definiëren en verzamelen van ‘zekere’ Lyme patiënten (zie ook de paragraaf *Europese ontwikkelingen*).

Hoewel het ieder laboratorium natuurlijk vrijstaat om naar eigen inzicht nieuwe testen te introduceren lijkt het ons niet raadzaam om zonder uitgebreide validaties nieuwe *Borrelia*-antistofassays in te voeren.

Verschillende studies, waaronder de in dit tijdschrift beschreven prospectieve en retrospectieve validatiestudies, tonen aan dat er verschillen in testuitslag kunnen optreden die worden veroorzaakt door een verschil in gebruikte test. Wij raden onze collega's dan ook aan om, gebaseerd op de resultaten van Nederlandse validatie studies, de keuze voor hun lokale *Borrelia* antistof assay nog eens kritisch te bezien. Dit leidt mogelijk tot een inperking van het grote aantal verschillende assays, wat vanuit het oogpunt van standaardisering en uitwisselbaarheid van uitslagen zeer wenselijk is.

### Europese ontwikkelingen

De problemen die wij als Nederlandse microbiologen tegenkomen bij gebruik en interpretatie van *Borrelia*-antistoftesten zijn niet uniek. Ook binnen Europa zijn deze problemen bekend, de ESCMID en de ECDC erkennen de urgentie van eenduidig beleid. In 2010 is de ESGBOR (European Study Group for Lyme Borreliosis, [www.escmid.org/research\\_projects/study\\_groups/esgbor/](http://www.escmid.org/research_projects/study_groups/esgbor/)) opgericht die primair tot doel heeft om kennis over Lyme-borreliose op Europees niveau te verspreiden, maar ook een diagnostische tak heeft. Deze groep microbiologen initieert het opzetten van biobanken voor zowel zeer goed gedefinieerd patiëntenmateriaal om serologische testen mee te valideren, als stammenbanken met *Borrelia*-DNA dat kan worden gebruikt bij validatie van diagnostische PCR's. Aspecten die hierbij aan de orde komen zijn het definiëren van ‘true positives’, waarbij een belangrijke rol voor PCR-diagnostiek is weggelegd. Alleen met een grote hoeveelheid serummonsters van ‘true positives’ en goed gedefinieerde controles kunnen goede uitspraken worden gedaan over de sensitiviteit en specificiteit van nieuwe en bestaande assays.

### Conclusies

Interpretatie van *Borrelia*-diagnostiek is niet gemakkelijk. De langzame kinetiek van de antistofrespons, de gevoeligheid van de testen voor specifiek reagerende antistoffen en de uiteenlopende klinische beelden met soms zeer lage incidentie zorgen er voor dat een goede interpretatie van serologische uitslagen alleen mogelijk is met gedetailleerde klinische gegevens. Het is dus nagenoeg niet mogelijk om met geautomatiseerde algoritmes in een laboratoriuminformatiesysteem een ‘standaard’ uitslag te genereren.

Door de zeldzaamheid van *Borrelia* als verwekker bij een groot aantal ziektebeelden zullen veel positieve uitslagen worden gegenereerd die mogelijk geen relatie hebben met het ziektebeeld waarvoor de patiënt bij de arts komt. Op dit moment zijn er geen goede diagnostische testen die onderscheid maken tussen actieve ziekte en een ‘serologisch litteken’. Naast het verder standaardiseren van antistofbepalingen zal dit de grote uitdaging van de komende jaren worden.

### Referenties

1. Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. *Lancet*. 2012 Feb 4;379(9814):461-73.
2. Broekhuijsen-van Henten DM, Braun KP, Wolfs TF. Clinical presentation of childhood neuroborreliosis; neurological examination may be normal. *Archives of disease in childhood* 2010 Nov;95(11):910-4.
3. Wilske B, Zöller L, Brade V, et al. MiQ-12 Lyme-Borreliosis (English internet version). In: Mauch H, Lütticken R, Gattermann S, eds. *Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik*. München Jena: Urban & Fisher Verlag, 2000.
4. Ang CW, Notermans DW, Hommes M, Simoons-Smit AM, Herremans T. Large differences between test strategies for the detection of anti-Borrelia antibodies are revealed by comparing eight ELISAs and five Immunoblots. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011 Aug;30(8):1027-32.
5. Ang CW, Brandenburg AH, Van Burgel ND, et al. Nationale vergelijking van serologische assays voor het aantonen van Borrelia antistoffen. *Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie* 2012;20 (suppl):158-9.
6. Van Dam AP, Coumou J. Performance of five VlsE containing immunoassays for the diagnosis of Lyme borreliosis. *Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie* 2012;20 (suppl):S68.
7. Steere AC, McHugh G, Damle N, Sikand VK. Prospective study of serologic tests for Lyme disease. *Clin Infect Dis* 2008 Jul 15;47(2):188-95.
8. Van Dam AP, Coumou J. Increased frequency of positive Lyme serology in patients with aspecific skin lesions. *Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie* 2011;19 (Suppl):S42.
9. Mullegger RR, Glatz M. Skin manifestations of lyme borreliosis: diagnosis and management. *American journal of clinical dermatology* 2008;9(6):355-68.
10. Stanek G, Fingerle V, Hunfeld KP, et al. Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2011;17(1):69-79.
11. Moll van Charante AW, Groen J, Mulder PG, Rijpkema SG, Osterhaus AD. Occupational risks of zoonotic infections in Dutch forestry workers and muskrat catchers. *European journal of epidemiology* 1998 Feb;14(2):109-16.
12. Steere AC. Reply to letter by Volkman commenting on the possible onset of seronegative disease in Lyme arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2009 Jan;60(1):310.
13. Dejmokova H, Hulinska D, Tegzova D, Pavelka K, Gatterova J, Vavrik P. Seronegative Lyme arthritis caused by Borrelia garinii. *Clinical rheumatology* 2002 Aug;21(4):330-4.
14. Harrer T, Geissdorfer W, Schoerner C, Lang E, Helm G. Seronegative Lyme neuroborreliosis in a patient on treatment for chronic lymphatic leukemia. *Infection* 2007 Apr;35(2):110-3.
15. Holl-Wieden A, Suerbaum S, Girschick HJ. Seronegative Lyme arthritis. *Rheumatology international* 2007 Sep;27(11):1091-3.
16. Kalish RA, McHugh G, Granquist J, Shea B, Ruthazer R, Steere AC. Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to Borrelia burgdorferi 10-20 years after active Lyme disease. *Clin Infect Dis* 2001 Sep 15;33(6):780-5.
17. Herremans T, Van Burgel ND, Brandenburg AH, et al. Comparison of the inter-laboratory performance of Lyme disease serology in the Netherlands by quality assessment. *Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie* 2012;20 (suppl):S67-8.

# Diagnostische (on)mogelijkheden bij *Borrelia*-infecties

C.W. Ang

## Samenvatting

Naast serologische diagnostiek zijn er een groot aantal andere diagnostische modaliteiten die worden ingezet bij de diagnostiek van *Borrelia*-infecties. Een aantal wordt in laboratoria uitgevoerd die niet worden gesuperviseerd door leden van de NVMM, soms in het buitenland. Patiënten en collega-artsen hebben vaak vragen over zowel de testen als over de interpretatie van de uitslagen. In dit artikel wordt een overzicht gegeven van deze technieken en wordt per techniek de waarde bij de diagnostiek van Lyme-borreliose aangegeven.

## Trefwoorden

*Borrelia*-infecties, diagnostiek

## Inleiding

Infecties met *Borrelia* spp treden op na een tekenbeet en kunnen leiden tot zowel acute als chronische ziektebeelden.<sup>1</sup> Sommige van die ziektebeelden zoals erythema migrans zijn goed te herkennen. Andere manifestaties leiden tot chronische, aspecifieke klachten zoals moeheid en hoofdpijn. De diagnose 'Lyme-borreliose' kan dan alleen worden gesteld door middel van laboratoriumdiagnostiek. Diagnostiek van *Borrelia*-infecties is lastig, zowel door de aard van de bacterie, die nauwelijks te kweken is, en door de pathogenese van de ziekte, waarbij naast directe schadelijke effecten van de infectie ook immuungemedieerde processen een rol spelen.<sup>2</sup>

Hoewel de meeste microbiologische diagnostiek wordt verricht in medisch-microbiologische laboratoria die worden gesuperviseerd door in Nederland opgeleide arts-microbiologen is de situatie bij *Borrelia*-infecties anders. Een aantal commerciële laboratoria uit binnen- en buitenland biedt een aantal testen aan voor het aantonen van een *Borrelia*-infectie.<sup>3</sup> Sommige van deze testen, zoals de T-cellymfocytenstimulatietest, worden alleen in het buitenland verricht.<sup>4,5</sup> Hiermee krijgen deze patiënten soms de diagnose 'chronische ziekte van Lyme' op basis van niet-gevalideerde laboratoriumonderzoeken. Dit leidt tot het voorschrijven van uitgebreide antibioticumkuren en een heel scala aan overige therapieën, al dan niet via reguliere medische instellingen.<sup>6</sup>

Vaak komen deze patiënten weer in aanraking met de reguliere geneeskunde, waarbij de arts-patiëntrelatie onder

zware druk kan komen te staan door de tegenstrijdige adviezen van verschillende behandelaren.<sup>7</sup> Tegelijkertijd verliezen patiënten het vertrouwen in de diagnostiek die wordt uitgevoerd door Nederlandse medisch-microbiologische laboratoria, omdat deze veel minder vaak een positief testresultaat geven. Het bijbehorende advies wordt dan niet opgevolgd omdat een fout-positieve uitslag blijkbaar te verkiezen valt boven een correct-negatieve.

Al deze zaken kunnen negatieve invloed hebben op de gezondheid van patiënten. Dit betreft zowel patiënten die echt een *Borrelia*-infectie hebben als patiënten die op basis van ongevalideerde testen of onjuiste testinterpretatie de diagnose Lyme-borreliose hebben gekregen en therapieën wensen en krijgen die potentieel schadelijk zijn.

Omdat veel artsen in Nederland te maken krijgen met patiënten die vragen hebben over diagnostiek van *Borrelia*-infecties, of zelfs met uitslagen komen van zelf geïnitieerd onderzoek, volgt hierbij een overzicht van de diagnostische mogelijkheden om *Borrelia*-infecties te detecteren. Wij geven hierbij duidelijk aan wat de wetenschappelijke onderbouwing is van het gebruik van testen en hopen door deze informatievoorziening het ondeskundig uitvoeren van diagnostische testen tegen te gaan.

## Antistoftesten

Bij de diagnostiek van *Borrelia*-infecties hebben antistoftesten een belangrijke rol. De prestaties en beperkingen van antistoftesten komen elders in deze editie van het NTMM uitgebreid aan bod.

## PCR

Omdat de *Borrelia*-bacterie zeer moeilijk is te kweken, lijkt de PCR-methode voor de hand te liggen als diagnostisch hulpmiddel.<sup>8</sup> Helaas blijkt de waarde van de PCR bij de diagnostiek van Lyme-borreliose slechts beperkt. Er bestaat een groot aantal PCR-protocollen voor het aantonen

Correspondentieadres: C.W. Ang, arts-microbioloog, afdeling Medische Microbiologie en Infectiepreventie, VUmc, Amsterdam, e-mail: w.ang@vumc.nl

van *Borrelia*-DNA in diverse lichaamsmaterialen. Geen van deze protocollen is echter gestandaardiseerd, zodat het vergelijken van de verschillende studies lastig is.<sup>9</sup> PCR op huidbiopten kan worden gebruikt bij patiënten met atypische vormen van erythema migrans, omdat bij deze vroeggedissemineerde vorm van Lyme-borreliose de serologie vaak negatief is.<sup>9</sup> Bij late huidmanifestaties, zoals ACA kan de PCR ook positief zijn, maar bij deze vorm van Lyme-borreliose is de sensitiviteit van serologische testen nagenoeg 100%.<sup>10</sup>

PCR op gewrichtsvocht en synovia heeft een sensitiviteit van 36-85% waarbij synoviumbiopten een hogere opbrengst geven.<sup>9</sup> De serostatus van de patiënten in deze studies is slechts ten dele bekend en het is niet duidelijk wat de additionele bijdrage van PCR is bij de diagnostiek van vroege artritis door *Borrelia*. Persistierend positieve PCR-bevindingen in gewrichtsvocht en synovium na initiële behandeling met ceftriaxon komen voor.<sup>11</sup> Het is dus mogelijk dat de PCR een bijdrage kan leveren aan identificatie van patiënten met refractaire artritis die baat hebben bij uitgebreidere antibiotische behandeling, maar studies met goed gedocumenteerde patiëntgroepen ontbreken tot dusver.

Bij vroege neuroborreliose is de sensitiviteit van de PCR in liquor slechts laag met percentages positieve testen variërend tussen 9-50%.<sup>9,12</sup> Een PCR is dus zeker niet geschikt om een vroege neuroborreliose uit te sluiten. Bij patiënten met gestoorde antistofrespons kan een PCR wel nuttig zijn, omdat serologische testen fout-negatief kunnen blijven.<sup>13</sup>

Bij late en chronische klachten is de waarde van de PCR niet goed bekend.<sup>9</sup> Sommige instituten rapporteren aanzienlijke percentages positieve testen, voornamelijk op serum, soms na een initiële kweekstap.<sup>3</sup> Op dit moment zijn er geen studies met goed gedefinieerde patiëntgroepen, adequate controles en inzichtelijke methodiek, waaruit moet worden geconcludeerd dat voor een plaatsbepaling van PCR-onderzoek naar *Borrelia*-DNA in volbloed, serum of plasma bij chronische specifieke klachten eerst betere studies moeten worden verricht.

Diverse studies en instituten gebruiken de PCR ook op urine.<sup>9</sup> Het is mogelijk om *Borrelia*-DNA aan te tonen maar ook hierbij ontbreken studies met inzichtelijke methoden en adequate controlegroepen, zeker bij patiënten met chronische klachten.

Samengevat kan de PCR van hulp zijn bij diagnostiek van vroege vormen van Lyme-borreliose met atypische presentatie, en bij immunogecompromitteerde patiënten die een verminderde antistofrespons op *Borrelia* vertonen. Het grote aantal verschillende protocollen is een aanwijzing dat de optimale procedures op dit moment niet zijn uitgekristalliseerd en studies waarbij verschillende protocollen, ook die worden gebruikt door commerciële laboratoria, zijn nodig voor standaardisering van de PCR.<sup>9</sup>

## Kweek

Bij alle vormen van Lyme-borreliose is de sensitiviteit van de kweek lager dan die van antistofbepalingen en PCR.<sup>8</sup> Daarbij komt dat de techniek alleen beschikbaar is in het AMC in Amsterdam. Voor diagnostische doeleinden is *Borrelia*-kweek derhalve niet nodig. Indien er situaties zijn waarbij direct aantonen van *Borrelia* gewenst is, kan dat met behulp van PCR.

## T-celstimulatieassays

Naast het aantonen van een antistofrespons is het ook mogelijk om de cellulaire immuunrespons tegen *Borrelia* te meten. Hierbij worden T-cellen in het perifere bloed gestimuleerd met *Borrelia* antigenen en daarna de proliferatie van de T-cellen gemeten (LTT, lymfocytentransformatietest) of het aantal T-cellen dat interferon-gamma produceert (Lyme ELISPOT).<sup>4,14</sup> Ook worden in experimentele setting T-celstimulatie testen uitgevoerd waarbij naar verschillende cytokinepatronen wordt gekeken.<sup>15</sup> Deze testen zijn niet gestandaardiseerd of commercieel verkrijgbaar en worden op dit moment in Nederland niet in een diagnostische setting uitgevoerd.<sup>16</sup>

Duitse laboratoria die deze test uitvoeren claimen dat T-celstimulatie superieur is aan serologie en op grond daarvan laten Nederlandse patiënten met chronische specifieke klachten zich in Duitsland testen.<sup>4</sup> Een congresbijdrage van één van deze Duitse laboratoria laat echter zien dat het percentage seronegatieve patiënten verdacht van *Borrelia*-infectie dat een positieve LTT heeft, slechts 2% bedraagt.<sup>17</sup> De helft van die patiënten had een EM.<sup>5</sup> Op dit moment zijn er echter geen andere studies met adequate controlegroepen die aantonen dat T-cel stimulatie assays een aanvulling vormen bij de diagnostiek van Lyme-borreliose. Gepubliceerde studies tonen aan dat de uitslagen van de T-celstimulatieassays grotendeels overeenkomen met die van de serologie of dat er geen relatie is tussen T-celreactiviteit en blootstelling aan *Borrelia*.<sup>18</sup> De geteste groepen zijn veel kleiner en over de reproduceerbaarheid van de testen is veel minder bekend dan van de serologische testen.<sup>4,14,18,19</sup>

Positieve T-celstimulatie testen bij personen zonder anti-*Borrelia*-antistoffen kunnen dan ook<sup>20,21</sup> niet zonder meer als een bewijs voor een infectie met *Borrelia* worden beschouwd. Het gebrek aan gegevens over de waarde van deze testen bij patiënten met chronische specifieke klachten, met en zonder antistoffen tegen *Borrelia*, impliceert wel dat nader onderzoek in dit veld gewenst is.

## Nieuwe ontwikkelingen

Met de huidige generatie antistof testen kan niet worden aangetoond of een patiënt een actieve infectie heeft, of een doorgemaakte infectie, met de aanwezigheid van antistoffen als een 'serologisch litteken'. Recent onderzoek geeft aan dat er mogelijk wel verschillen zijn in patronen

van antistofrespons tegen delen van membraaneiwitten van *Borrelia*.<sup>22,23</sup> Deze testen zijn momenteel niet commercieel verkrijgbaar en verder onderzoek bij grotere patiëntgroepen zal moeten uitwijzen of deze benadering vruchtbaar zal zijn.

Hoewel er gepubliceerde richtlijnen zijn, bestaat er geen consensus over de laboratoriumdiagnostiek van neuroborreliose.<sup>12</sup> Zowel op het gebied van de methoden voor antistofbepaling in liquor als de gebruikte markers voor inflammatie in het centraal zenuwstelsel zijn ontwikkelingen gaande. In de richtlijn wordt een indexbepaling van anti-*Borrelia*-antistoffen aanbevolen maar recent onderzoek toont aan dat het bepalen van de antistofrespons tegen het C6-peptide een hogere sensitiviteit heeft dan de indexbepaling bij gelijke specificiteit.<sup>24</sup> Bij de diagnostiek van vroege neuroborreliose kan een bepaling van het chemokine CXCL13 in de liquor van extra waarde zijn. Bij een groot gedeelte van de neuroborreliosepatiënten zijn verhoogde concentraties CXCL13 in de liquor aantoonbaar.<sup>20,21</sup> Bij patiënten met chronische aspecifieke klachten is dit nog niet onderzocht en gezien de bevindingen bij vroege neuroborreliose zou dit zeker de moeite waard zijn.

### Overige controversiële testen

Door sommige aanbieders van diagnostiek wordt geclaimd dat *Borrelia*-bacteriën kunnen worden aangetoond in bloed door middel van microscopie, soms met immunofluorescentie.<sup>25</sup> Ook andere bacteriën zoals *Ehrlichia* zouden met deze techniek kunnen worden opgespoord. Het is nooit gelukt deze resultaten te reproduceren onder gecontroleerde omstandigheden en aan het waarheidsgehalte van deze bevindingen moet dan ook ernstig worden getwijfeld.<sup>7</sup> Een andere diagnostische methode is het aantonen van *Borrelia*-antigenen in de urine.<sup>7</sup> Bij een uitgebreide validatie door een gereputeerd laboratorium bleek dat deze test een slechte reproduceerbaarheid en een groot aantal fout-positieve uitslagen.<sup>26</sup> Ook deze methode is dus ongeschikt voor het aantonen van een *Borrelia*-infectie.

De aanwezigheid van immuuncomplexen van *Borrelia*-antigeen en anti-*Borrelia*-antistoffen is volgens enkele organisaties bewijzend voor een actieve infectie. Ook deze claim kon niet worden geobjectiveerd bij een onderzoek dat de resultaten van de "uitvinder" van deze test probeerde te reproduceren.<sup>27,28</sup> Precipitatie met polyethyleenglycol leidt nl. niet alleen tot verrijking van immuuncomplexen, maar ook ongebonden anti-*Borrelia*-antistoffen worden neergeslagen. Deze test is dus in principe niet anders dan de ELISA's die onbewerkt serum gebruiken voor anti-*Borrelia* antistofdetectie. Een recente studie van het RIVM toonde dit ook overtuigend aan.

De aanwezigheid van een laag aantal CD57-positieve cellen, gedetecteerd met behulp van flowcytometrie, zou diagnostisch zijn voor chronische Lyme-borreliose.<sup>29</sup> Een gecontroleerde studie kon dit niet bevestigen.<sup>30</sup>

### Kwaliteitsaspecten

Voor het aantonen van antistoffen tegen *Borrelia* organiseert de Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratoriumdiagnostiek (SKML) al jaren een rondzending waarin ruim 60 Nederlandse laboratoria participeren.<sup>31,32</sup> De scores van de Nederlandse laboratoria zijn in het algemeen goed.<sup>31</sup> Een complicerende factor bij de kwaliteitsbewaking vormt het grote aantal verschillende testen en testcombinaties. In 2010 werden bij de microbiologische laboratoria die participeerden aan de rondzending maar liefst 10 verschillende ELISA's en vijf verschillende Immunoblots gebruikt. Dat leidde tot 18 verschillende ELISA-Immunoblotcombinaties. Het is goed voorstelbaar dat de verscheidenheid aan testmogelijkheden een barrière vormt voor standaardisatie en leidt tot verschillende bevindingen tussen laboratoria.<sup>33</sup>

Voor de PCR is op dit moment geen Nederlandse kwaliteitsrondzending. Nederlandse laboratoria kunnen participeren in kwaliteitsprogramma's uit Duitsland (Instand) of Groot-Brittannië (QCMD). De European Study Group for *Borrelia* infections (ESGBOR) is bezig een panel met *Borrelia*-DNA te maken van minstens acht *Borrelia*-species, zodat de sensitiviteit en specificiteit van assays die worden gebruikt in Europa, kunnen worden gevalideerd met een internationaal panel.

### Conclusie

Voor de diagnostiek van goed gedefinieerde vormen van Lyme-borreliose voldoen antistofftesten. Voor ziektebeelden met a priori een lage kans op *Borrelia*, waarbij de diagnose exclusief afhangt van de serologische uitslag zijn er mogelijk aanzienlijke testafhankelijke verschillen.

### Status van diagnostische testen voor het aantonen van een *Borrelia*-infectie

Serologie	Bekende hoge sensitiviteit bij patiënten met lange ziekte duur. Specificiteit testafhankelijk bij patiënten met onderliggend lijden <sup>10</sup>
PCR	Bekende beperkte sensitiviteit. Specificiteit afhankelijk van kwaliteit uitvoerend laboratorium <sup>9</sup>
T-celstimulatie	Geen goede klinische validatie studies. Mogelijk geen toegevoegde waarde boven serologie/PCR
Urineantigeentest	Slechte reproduceerbaarheid en specificiteit <sup>7,26</sup>
Microscopie van bloed	Geen goede klinische validatie. Uitvoerders in Verenigde Staten aangeklaagd wegens wangedrag <sup>34</sup>
Flowcytometrie	Geen goede klinische validatie. Gecontroleerde studies tonen lage specificiteit <sup>30</sup>



De waarde van de PCR bij artritis en vroege neuroborreliose is aanwezig maar beperkt. Voor chronische vormen van Lyme-borreliose is de waarde van PCR onduidelijk en eerst moet meer onderzoek worden verricht voordat de PCR onderzoek standaard wordt ingevoerd bij patiënten met chronische klachten.

De waarde van experimentele assays zoals T-celstimulatie-testen moet in onderzoeksverband bij goed gedefinieerde patiëntpopulaties worden onderzocht voordat een uitspraak kan worden gedaan over de waarde van dit soort testen. Standaardisering van dit soort testen zal naar verwachting nog lang duren omdat de bepalingen nog experimenteel zijn en er op dit moment geen commercieel verkrijgbare kits verkrijgbaar zijn.

Veel aspecten van de diagnostiek van *Borrelia*-infecties zijn nog onduidelijk. De route naar betere diagnostiek verloopt via het doen van methodologisch verantwoord wetenschappelijk onderzoek en niet door het grootschalig uitvoeren van niet gevalideerde diagnostische onderzoeken.

## Referenties

1. Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. *Lancet*. 2012 Feb 4;379(9814):461-73.
2. Aguero-Rosenfeld ME. Lyme disease: laboratory issues. *Infect Dis Clin North Am* 2008 Jun;22(2):301-13, vii.
3. Website Laboratorium Prohealth Medical. [bezoekt 18 juni 2012]; [http://www.prohealth.nl/medical/borrelia\\_onderzoek\\_ziekte\\_van\\_lyme.html](http://www.prohealth.nl/medical/borrelia_onderzoek_ziekte_van_lyme.html).
4. Valentine-Thon E, Ilsemann K, Sandkamp M. A novel lymphocyte transformation test (LTT-MELISA) for Lyme borreliosis. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2007 Jan;57(1):27-34.
5. Von Baehr V, Doebeis C, Liebenthal C, Volk HD, Von Baehr R. Zur Bedeutung des Lymphozytentransformationstestes (LTTBorrelie) für die Diagnostik und Verlaufsbeobachtung bei Patienten mit Borreliose. *Umwelt Medizin Gesellschaft* 2009;22(3):246-55.
6. Website Borreliose Centrum Augsburg, Duitsland. [bezoekt Juni 2012]; <http://www.borreliosecentrum.de>.
7. Duerden B. Unorthodox and unvalidated laboratory tests in the diagnosis of Lyme borreliosis and in relation to medically unexplained symptoms. London: Department of Health, 2006.
8. Cerar T, Ogrinc K, Cimperman J, Lotric-Furlan S, Strle F, Ruzic-Sabljic E. Validation of cultivation and PCR methods for diagnosis of Lyme neuroborreliosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008 Oct;46(10):3375-9.
9. Van Dam AP. Molecular diagnosis of *Borrelia* bacteria for the diagnosis of Lyme disease. *Expert Opinion Med Diagn*. 2011;5(2):135-49.
10. Ang CW, Brandenburg AH, Van Burgel ND, et al. Nationale vergelijking van serologische assays voor het aantonen van *Borrelia*-antistoffen. *Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie* 2012;20 (suppl):158-9.
11. Priem S, Burmester GR, Kamradt T, Wolbart K, Rittig MG, Krause A. Detection of *Borrelia burgdorferi* by polymerase chain reaction in synovial membrane, but not in synovial fluid from patients with persisting Lyme arthritis after antibiotic therapy. *Annals of the rheumatic diseases*. 1998 Feb;57(2):118-21.
12. Mygland A, Ljostad U, Fingerle V, Rupprecht T, Schmutzhard E, Steiner I. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *Eur J Neurol*. 2010 Jan;17(1):8-16, e1-4.
13. Harrer T, Geissdorfer W, Schoerner C, Lang E, Helm G. Seronegative Lyme neuroborreliosis in a patient on treatment for chronic lymphatic leukemia. *Infection*. 2007 Apr;35(2):110-3.
14. Ekerfelt C, Forsberg P, Svanvik M, Roberg M, Bergstrom S, Ernerudh J. Asymptomatic *Borrelia*-seropositive individuals display the same incidence of *Borrelia*-specific interferon-gamma (IFN-gamma)-secreting cells in blood as patients with clinical *Borrelia* infection. *Clinical and experimental immunology*. 1999 Mar;115(3):498-502.
15. Oosting M, Ter Hofstede H, Van de Veerdonk FL, et al. Role of interleukin-23 (IL-23) receptor signaling for IL-17 responses in human Lyme disease. *Infection and immunity*. 2011 Nov;79(11):4681-7.
16. Nijmeegse onderzoekers ontwikkelen nieuwe test voor ziekte van Lyme. [bezoekt Juni 2012]; <http://www.umcn.nl/OVERUMCSTRADBOUD/NIEUWSENMEDIA/ARCHIEF/NIEUWSARCHIEF2012/FEBRUARI2012/Pages/NijmeegseonderzoekersontwikkelennieuwetestvoorziektevanLyme.aspx>.
17. Von Baehr R. Zellulär immunologische Methoden zur Verlaufsbeobachtung von Patienten mit Borreliose vor und nach antibiotischer Therapie. Jahrestagung der Deutschen Borreliosegesellschaft, 2009.
18. Skogman BH, Hellberg S, Ekerfelt C, et al. Adaptive and innate immune responsiveness to *Borrelia burgdorferi* sensu lato in exposed asymptomatic children and children with previous clinical Lyme borreliosis. *Clinical & developmental immunology* 2012;2012:294587.
19. Umweltmedizin" KMUQid. Qualitätssicherung beim Lymphozytentransformationstest" – Addendum zum LTT-Papier der RKI-Kommission "Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin. Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz 2008;51:1070-6.
20. Schmidt C, Plate A, Angele B, et al. A prospective study on the role of CXCL13 in Lyme neuroborreliosis. *Neurology*. 2011 Mar 22;76(12):1051-8.
21. Ljostad U, Mygland A. CSF B-lymphocyte chemoattractant (CXCL13) in the early diagnosis of acute Lyme neuroborreliosis. *Journal of neurology*. 2008 May;255(5):732-7.
22. Chandra A, Wormser GP, Marques AR, Latov N, Alaedini A. Anti-*Borrelia burgdorferi* antibody profile in post-Lyme disease syndrome. *Clin Vaccine Immunol*. 2011 May;18(5):767-71.
23. Chandra A, Latov N, Wormser GP, Marques AR, Alaedini A. Epitope mapping of antibodies to VlsE protein of *Borrelia burgdorferi* in post-Lyme disease syndrome. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 2011 Oct;141(1):103-10.
24. Van Burgel ND, Brandenburg A, Gerritsen HJ, Kroes AC, Van Dam AP. High sensitivity and specificity of the C6-peptide ELISA on cerebrospinal fluid in Lyme neuroborreliosis patients. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Oct;17(10):1495-500.
25. Bradford RW, Allen HW. Lyme Disease, Potential Plague of the 21st Century. *Townsend Letter, The examiner of Alternative Medicine* 2005;<http://www.townsendletter.com/Jan2005/lyme0105.htm>.
26. Klempner MS, Schmid CH, Hu L, et al. Intralaboratory reliability of serologic and urine testing for Lyme disease. *The American journal of medicine*. 2001 Feb 15;110(3):217-9.
27. Marques AR, Hornung RL, Dally L, Philipp MT. Detection of immune complexes is not independent of detection of antibodies in Lyme disease patients and does not confirm active infection with *Borrelia burgdorferi*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2005 Sep;12(9):1036-40.
28. Brunner M. Report refuting value of immune complexes to diagnose Lyme disease is invalid. *Clin Vaccine Immunol*. 2006 Feb;13(2):304-5; author reply 5-6.
29. Stricker RB, Winger EE. Decreased CD57 lymphocyte subset in patients with chronic Lyme disease. *Immunology Letters*. 2001 Feb 1;76(1):43-8.
30. Marques A, Brown MR, Fleisher TA. Natural killer cell counts are not different between patients with post-Lyme disease syndrome and controls. *Clin Vaccine Immunol*. 2009 Aug;16(8):1249-50.
31. Meijer BC. Evaluatie SKML rondzending Lues/Lyme serologie 2011.1. 2012.
32. Infectieziekten-serologie S. Jaarverslag 2011 Sectie Infectieziekten-serologie SKML.
33. Herremans T, Van Burgel ND, Brandenburg AH, et al. Comparison of the inter-laboratory performance of Lyme disease serology in the Netherlands by quality assessment. *Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie* 2012;20 (suppl):S67-8.
34. Auwaerter PG, Bakken JS, Dattwyler RJ, et al. Antiscience and ethical concerns associated with advocacy of Lyme disease. *The Lancet infectious diseases* 2012 Sep;11(9):713-9.

# Detectie van *Borrelia burgdorferi* s.l.-specifieke immuuncomplexen in patiënten met erythema migrans en neuroborreliose

F.J.H.B. van Nunen, H. Sprong, A. Hofhuis, H.A. Bijlmer, T. Herremans

## Trefwoorden

Ziekte van Lyme, *Borrelia burgdorferi* s.l., serologie, ELISA, Immunoblot, immuuncomplexen

## Introductie

Serologie is een van de belangrijkste hulpmiddelen om de ziekte van Lyme te diagnosticeren. Een goede en snelle diagnose bij de ziekte van Lyme is belangrijk omdat de behandeling het meest effectief is indien deze in een vroeg stadium kan worden gestart.<sup>1</sup> Echter serologische testen kunnen bij vroege *Borrelia*-infecties zoals erythema migrans (EM) en vroege manifestaties van neuroborreliose nog een fout-negatieve uitslag geven vanwege de lage sensitiviteit van ELISA's en Western-blots in deze fase van de ziekte. Daarnaast heeft *Borrelia burgdorferi* sensu lato (hierna *Borrelia* genoemd) enkele antigenen die een kruisreactie kunnen geven met antigenen van andere micro-organismen, waardoor de ziekte van Lyme kan worden overgediagnosticeerd. Na een doorgemaakte infectie blijven antistoffen jarenlang aanwezig, ook nadat er geen sprake meer is van een actuele infectie met *Borrelia*. Aanwezigheid van antistoffen alleen is daarom geen direct bewijs voor een actuele infectie.

De meeste antistofstesten zijn ontworpen om vrije antistoffen te detecteren. Echter in een vroege, actieve infectie komen circulerende antistoffen mogelijk niet vrij in het serum voor, maar in de vorm van immuuncomplexen (IC). Deze immuuncomplexen bestaan uit antistoffen samen met het antigeen dat de productie van deze antistoffen heeft geïnduceerd<sup>2</sup>; aanwezige IC worden gezien als een mogelijke indicatie voor een actieve infectie. De aanwezigheid van IC in een vroeg stadium van een infectie zou de detectie van vrije antilichamen kunnen bemoeilijken en dus de gevoeligheid van serologische testen in dit stadium verlagen.

Wanneer er wel *Borrelia burgdorferi*-specifieke IC detecteerbaar zijn bij patiënten maar geen vrije antistoffen aantoonbaar zijn, zouden deze een eventuele vroege marker kunnen zijn voor een *Borrelia*-infectie. Naar

verwachting zullen na succesvolle behandeling de IC niet meer aantoonbaar zijn in het serum. IC's kunnen worden geprecipiteerd met polyethyleenglycol (PEG) om ze te isoleren uit het serum van Lyme-patiënten<sup>3</sup> waarna deze kunnen worden getest op aanwezigheid van *Borrelia*-specifieke antistoffen. Het doel van deze studie was om te onderzoeken of de isolatie van *Borrelia*-IC in vroege stadia meerwaarde heeft voor de serologische diagnostiek.

## Materiaal en methoden

### Gebruikte serumpanels

Serummonsters van Lyme-patiënten met EM en neuroborreliose werden gebruikt voor IC-isolatie. In totaal zijn serummonsters van 33 EM-patiënten getest bij aanvang van de klachten en op twaalf weken na de start van de behandeling met een antibioticum. Deze sera zijn verzameld in het kader van het Landelijk Tekenbetenonderzoek in 2007 en 2008, waarbij patiënten met een EM of tekenbeet via de huisarts gevolgd werden gedurende twaalf weken. Bij een groep (n= 13) van deze EM-patiënten waren geen antistoffen aantoonbaar met de C6 ELISA, noch in de IgM- en IgG-Immunoblots in zowel het eerste als het tweede afgenomen serum. De overige 22 EM-patiënten waren C6 ELISA reactief in het serum waarvan twee in het grenswaarde gebied (Lyme index range 0,92 tot 10,99). Deze sera werden gezien als waarschijnlijk later in de infectie afgenomen. Elf sera van neuroborreliose (NB)-patiënten met aantoonbare antistoffen in de liquor werden ook onderzocht op aanwezigheid van IC's. Tevens werden patiënten uit het Landelijk

H. Sprong, A. Hofhuis, H.A. Bijlmer, T. Herremans, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu.  
Correspondentieadres: F.J.H.B. van Nunen, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Centrum voor Infectieziektebestrijding (Cib), Postbus 1, 3720 BA Bilthoven, Nederland, e-mail:Femke.van.Nunen@rivm.nl.

Tekenbetenonderzoek met gemelde persisterende klachten na een doorgemaakte EM (n=5) of na een tekenbeet (n=5) na antibioticumbehandeling getest op aanwezigheid van IC zowel voor als na behandeling.

### Isolatie van IC

De IC's werden geconcentreerd en opgelost volgens eerder beschreven methoden.<sup>2,4</sup> Bij 100 µl serum werd een gelijk volume van 7% w/v Polyethyleenglycol PEG-8000 in 0,1 M boraatbuffer (pH 8,4) toegevoegd en overnacht bij 4°C geïncubeerd op een schudplateau. Na incubatie werd het mengsel 30 minuten bij 10000 g afgedraaid, de pellet werd twee keer gewassen met een 3,5% PEG-8000 oplossing in 0,1 M boraatbuffer. De uiteindelijke pellet werd geresuspendeerd in het originele volume van 100 µl met een 0,1 M boraatbuffer (pH 10,2). De IC's zijn gedurende negen dagen stabiel bij 4°C.<sup>5</sup> De opgewerkte IC's werden binnen zeven dagen geanalyseerd met behulp van Immunoblot.

### RecomLine Immunoblot

Het onbehandelde serum en de opgeloste IC's werden simultaan geanalyseerd door middel van de recomLine *Borrelia* IgM en IgG Immunoblot [Mikrogen], volgens voorschrift van de fabrikant. De reactie tegen de recombinant *Borrelia burgdorferi* sensu lato antigenen OspA, OspC, p100, VlsE, p58, p41 (flagelline), p39 en p18 werden daarbij geanalyseerd. Het serum en de IC's werden 50 maal verdund op de test strip gebracht (40 µl in 2 ml verdunningsbuffer). De resultaten van het onbehandelde serum werden volgens het voorschrift van

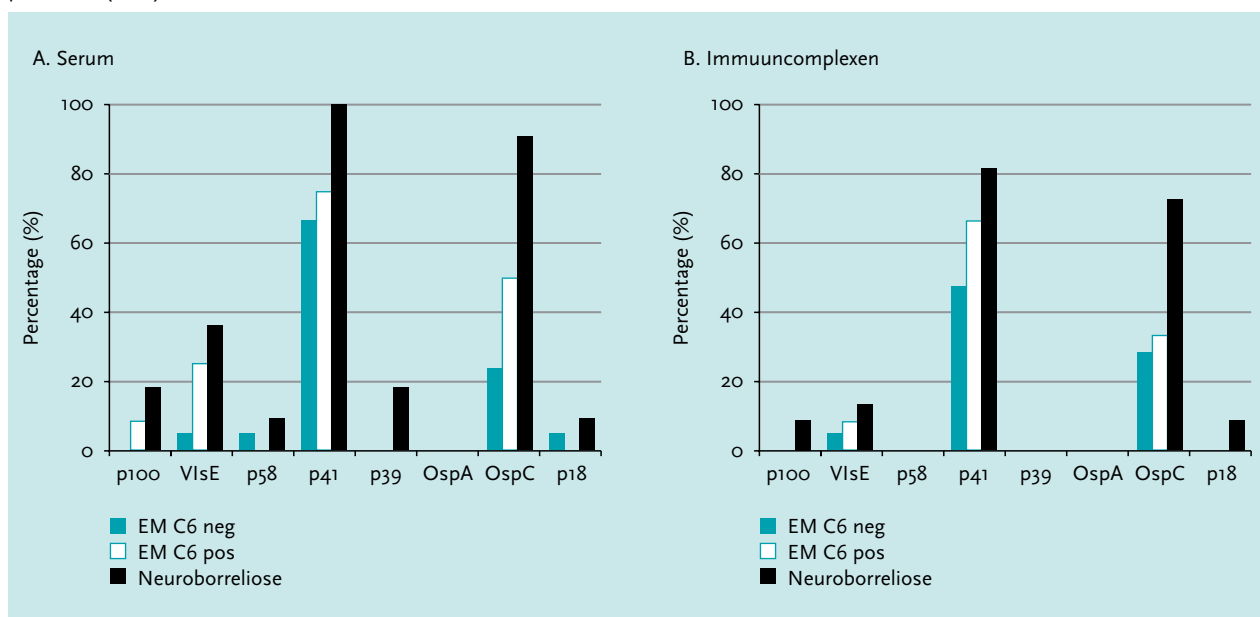
de fabrikant beoordeeld. Banden gelijk aan intensiteit met de cut-offband werden als positief gescoord. Zichtbare banden van de IC's werden positief benoemd zelfs wanneer de intensiteit minder was dan die van de cut-offband. Het percentage positief gedetecteerde antigeen banden in de recomLine-blot werd vervolgens per individuele band gescoord.

### Resultaten

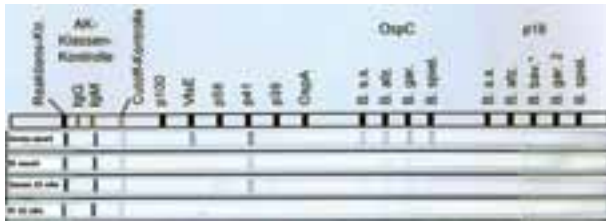
#### Detectie van IC bij C6 ELISA-positieve en negatieve EM-patiënten

In een groot aantal EM-patiënten (n=33) werden p41 (70%) en OspC (33%) specifieke IgM-antistoffen aangetroffen in het serum (figuur 1). Met de Immunoblot werd 36% als positief voor IgM antistoffen beoordeeld. In 58% van de EM-patiënten (19/33) werden IgM positieve IC's gedetecteerd. IgG IC's werden maar zelden aangetoond. De gedetecteerde IgM IC's waren voornamelijk gericht tegen het p41 (flagelline) en het OspC antigeen (figuur 1, figuur 2A). In een klein percentage EM-patiënten werden ook IC gevonden tegen VlsE. Het flagelline (p41) IC werden vaker gevonden in sera van C6 ELISA positieve EM-patiënten (70%) in vergelijking met C6 ELISA negatieve patiënten (52%) (tabel 1). In een aantal patiënten was optisch waarneembaar dat de intensiteit van enkele antigeen banden in het serum gelijk waren. Echter bij de IC-reactieve banden waren andere patronen zichtbaar (figuur 2). Hieruit blijkt dat bij PEG-precipitatie voornamelijk IgM neerslaat dat eerder was geassocieerd met IC.

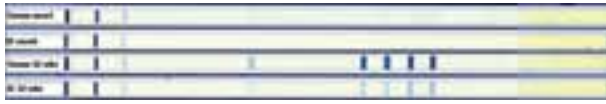
**Figuur 1.** Percentage positief gedetecteerde antigeen banden in de recomLine blot in A. Serum en B. IC's in drie groepen van Lyme-patiënten; EM-patiënten bij aanvang van de klachten (totaal n=33) waarvan C6 neg (n=21) en C6 pos (n=12) en neuroborreliose patiënten (n=11).



**Figuur 2.** *RecomLine* Immunoblots van enkele patiënten.



A. EM-patiënt met afnemende banden



B. EM-patiënt met toenemende banden



C. Neuroborreliose patiënt



D. EM-patiënt met persisterende klachten

**Tabel 1.** C6 ELISA en PEG-IC IGM *recomLine* blotresultaten.

Categorie	Serum C6 ELISA	Eerste monster		Tweede monster	
		PEG-IC IgM blot Percentage (positieve monsters/totaal)		PEG-IC IgM blot Percentage (positieve monsters/totaal)	
EM-patiënten	Negatief	52	11/21	72	18/25
	Positief	70	7/10	75	6/8
	Dubieus	50	1/2		0/0
Neuroborreliose-patiënten	Negatief		0/0		
	Positief	91	10/11		
	Dubieus		0/0		
Patiënten met persisterende klachten	Negatief	40	2/5	40	2/5
	Positief	80	4/5	50	2/4
	Dubieus		0/0	100	1/1

### Detectie van IC bij neuroborreliosepatiënten

Bij elk van de elf neuroborreliosepatiënten werden vrije IgM-antistoffen aangetoond. In vergelijking tot de EM-patiënten waren neuroborreliosepatiënten vaker positief voor IC's. Bij tien van de elf patiënten (91%) werd minstens één reactief bandje als IC gedetecteerd (tabel 1). In de groep van neuroborreliosepatiënten werden

ook voornamelijk IC gezien tegen p41 en OspC maar ten opzichte van de EM-patiënten was vooral OspC vaker aanwezig (figuur 1). In één patiënt gediagnosticeerd met neuroborreliose zijn tevens IC's gedetecteerd tegen p100, p18 en VlsE (figuur 2C). In de liquor werd geen IC aangetroffen (figuur 2).

### Detectie van IC in EM-patiënten na antibioticabehandeling

In de groep van EM-patiënten werd gezien dat de IgM-titers in serum in het algemeen gelijk bleven na antibioticumbehandeling. Er werd echter wel een toename in IC's geobserveerd van 58% naar 73% twaalf weken na behandeling in de EM-groep, bij de C6-negatieve EM-patiënten was deze toename in IC's het hoogst, van 52% naar 72% twaalf weken na behandeling (tabel 1). In vijf van de 33 (15%) werd een duidelijke seroconversie gedetecteerd voor *Borrelia*-specifieke IC's in vervolgsera (figuur 2A). Maar er waren ook drie patiënten waar bij juist een afname in de IC werd gevonden (figuur 2B).

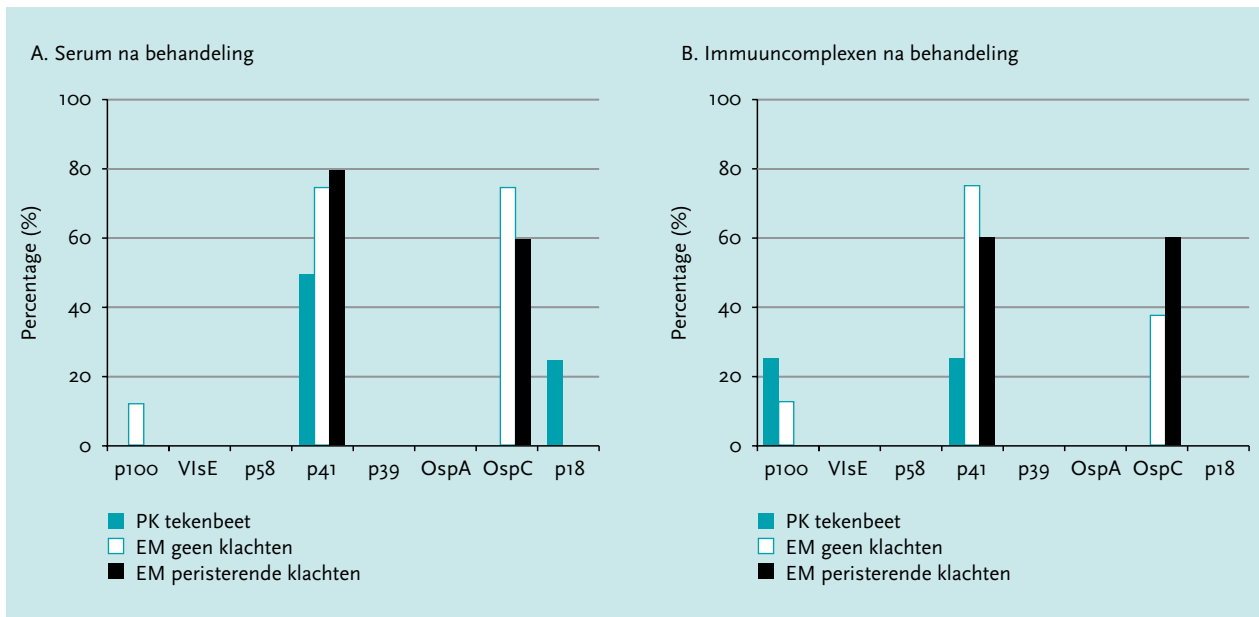
### Detectie van IC in patiënten met persisterende klachten

Bij EM-patiënten met persisterende klachten na behandeling is het bandenpatroon in serum vergelijkbaar met de EM-patiënten zonder klachten en zoals verwacht voornamelijk gericht tegen p41 en OspC (figuur 3A). Het aantal waarnemingen was laag maar EM-patiënten met persisterende klachten gaven een iets ander patroon in de IC ten opzichte van EM-patiënten zonder klachten. Het percentage p41-IC's was iets lager terwijl het de OspC-IC's juist weer vaker werden gevonden. Interessant is één EM-patiënt met gerapporteerde persisterende klachten na behandeling waarin IC's bij aanvang ook gedetecteerd zijn tegen p100 en VlsE, naast de frequent gedetecteerde p41 en OspC in de meerderheid van de EM-gevallen (figuur 2D). Bij vier tekenbeetpatiënten die klachten hielden werden geen noemenswaardige reactieve serologie of IC gevonden (figuur 3).

### Discussie

In een vroeg stadium van de ziekte van Lyme leidt PEG-precipitatie in onze experimenten niet tot een hogere sensitiviteit van serologische testen. Eerdere data van andere onderzoekers suggereren dat de detectie van een actieve *Borrelia*-infectie door het detecteren van IC's door PEG-precipitatie in de diagnostiek van Lyme-patiënten niet eenduidig is.<sup>6,7</sup> Met het aantonen van IC in een vroeg stadium van de ziekte van Lyme, nog voordat vrije antistoffen kunnen worden aangetoond, zouden we verwachten dat de sensitiviteit van de serologie mogelijk verhoogd zou worden. In dit onderzoek werden echter juist meer IC's gedetecteerd als er al vrije antistoffen aantoonbaar waren. De percentages van Lyme-patiënten met detecteerbare IC's blijken toe te nemen in relatie tot de duur en ernst van de ziekte. Opvallend was dat de p100 en

**Figuur 3.** Percentage positief gedetecteerde antigeen banden in de *recomLine* blot in A. Serum en B. IC's in drie groepen van Lyme-patiënten na behandeling; PK tekenbeet patiënten met persisterende klachten (n=4), EM-patiënten C6 positief (n=8) en EM-patiënten C6 positief (n=5) met persisterende klachten.



VlsE IC's alleen gedetecteerd zijn in patiënten in een meer gevorderd stadium van de ziekte.

Een andere beschreven toepassing van IC-detectie is als een serologische marker voor actieve infectie.<sup>4</sup> Een actieve infectie is in de meeste Lyme-patiënten niet te verwachten na antibioticumbehandeling. Desondanks hebben wij in ons onderzoek IC's gedetecteerd in meer dan 40% van 33 EM-patiënten, twaalf weken na behandeling. Ook bij EM-patiënten met persisterende klachten waarbij een inadequate behandeling vermoed zou kunnen worden, was het aantonen van IC niet informatief. Daarom lijkt de detectie van IC's als marker van een actieve infectie vooralsnog zeer beperkt.

Marques et al. beweert in tegenstelling tot de resultaten van Brunner et al. dat er geen IC werden geprecipiteerd in Lyme-patiënten, maar slechts vrije immuunglobulinen uit serum.<sup>6,7</sup> De reactie van dr. M. Brunner<sup>7</sup> op het onderzoek van Marques et al. spreekt deze bevindingen tegen. Hij bevestigt dat in IC's immuunglobulinen kunnen worden aangetoond en refereert daarbij naar onderzoek van Digeon et al.<sup>5</sup> Digeon beschrijft dat bij de PEG-precipitatie weinig tot geen vrij IgG neer slaat, echter mogelijk wel een gedeelte van het vrije IgM, wat niet verrassend is vanwege het hoogmoleculaire gewicht van IgM en de polymere vorm van het eiwit. In pathologische sera van patiënten met verschillende soorten ziekte, waaronder ook stoornissen in het afweersysteem, slaat naast IC ook

15-65% van vrij IgM neer.<sup>5</sup> In ons onderzoek zijn IgM afkomstig uit IC's aangetoond gezien in de Immunoblot regelmatig andere patronen bij IC's ten opzichte van de reactiviteit in serum werden gevonden (*figuur 2C*). Deze resultaten laten echter geen bruikbare serologische markers zien voor de verbetering van serologie als hulpmiddel bij de diagnose van de ziekte van Lyme.

## Referenties

1. Schutzer SE, Coyle PK, Reid P and Holland B. 1999. *Borrelia burgdorferi*-Specific Immune Complexes in Acute Lyme Disease. *American Medical Association*. 282, no.20.
2. Brunner M. New method for detection of *Borrelia burgdorferi* antigen complexed to antibody in seronegative Lyme disease. *J Immunol Methods*. 2001;249:185-90.
3. Harkiss GD and Brown DL. Detection of immune complexes by a new assay, the polyethylene glycol precipitation-complement consumption test (PEG-CC). *Clin Exp Immunol*. 1979;36:117-29.
4. 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*. *J Clin Microbiol*. 2001;39:3213-21.
5. Digeon M, Laver M, Riza J, Bach JF. Detection of circulating immune complexes in human sera by simplified assays with polyethylene glycol. *J Immunol Methods*. 1977;16:165-83.
6. Marques AR, Hornung RL, Dally L, Philipp MT. Detection of immune complexes is not independent of detection of antibodies in Lyme disease patients and does not confirm active infection with *Borrelia burgdorferi*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12:1036-40.
7. Brunner M. Report refuting value of immune complexes to diagnose lyme disease is invalid. Letters to the editor. *Clin Vaccine Immunol*. 2006;13:304-6.



# Wetenschappelijke Najaarsvergadering NVMM en VIZ



Donderdag 15 november 2012

Conferentiecentrum Woudschoten, Woudenbergseweg 54, Zeist

Programma		Parallele sessies	
<b>Plenair</b>		<b>Zaal 1</b>	
09.30 – 10.15	Imaging infection in real-time <i>Prof. dr. Agneta Richter Dahlfors, Karolinska Institutet</i>	13.45 – 14.05	De ziekte van Lyme in Nederland, onderzoek door het RIVM <i>Dr. Kees van den Wijngaard, RIVM</i>
10.15 – 10.45	Vraag niet wat u voor uw darmflora kan doen, maar wat uw darmflora voor u doet! Van speculatie tot bewijs <i>Dr. Willem van Schaik, UMC Utrecht</i>	14.45 – 15.45	Vrije voordrachten
10.45 – 11.15	Koffie/thee	<b>Zaal 2</b>	
11.15 – 11.45	Antibiotica-allergie, implicaties voor de praktijk <i>Prof. dr. Roy Gerth van Wijk, Erasmus MC Rotterdam</i>	13.45 – 14.05	De epidemiologie van de VRE-uitbraak in Nederland <i>Dr. Rob Willems, UMC Utrecht</i>
11.45 – 12.15	Als SIRS geen sepsis is: hoe om te gaan met ernstige SIRS-beelden <i>Dr. Pieter van Paassen, Maastricht UMC</i>	14.45 – 15.45	Vrije voordrachten
12.15 – 12.25	Prijsuitreiking VIZ	13.45 – 15.45	Onderwerp en spreker worden nader bekend gemaakt Vrije voordrachten
12.25 – 13.30	Lunch	15.45	Thee, huishoudelijke vergaderingen NVMM en VIZ, afsluitende borrel

## Inschrijving

U kunt zich aanmelden voor deelname aan de Najaarsvergadering via [www.nvmm.nl](http://www.nvmm.nl).

## Kosten

Bij aanmelding voor 1 oktober 2012: € 40,- (incl. lunch en drankjes), over te maken naar 44.63.43.676 t.n.v. de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie te Bilthoven, onder vermelding van 'NVMM/VIZ Najaarsvergadering' en uw naam.

Bij aanmelding na 1 oktober 2012 bedragen de kosten € 50,-.

## Abstracts

Zie [www.nvmm.nl](http://www.nvmm.nl) of [www.infectieziekten.org](http://www.infectieziekten.org) voor instructies. De instructies zullen ook via e-mail aan de leden van de NVMM en VIZ worden toegestuurd. Deadline: 1 oktober.

## Accreditatie

De bijeenkomst wordt geaccrediteerd door de NVMM en de VIZ.

## Informatie

Heeft u nog vragen, dan kunt u contact opnemen met het secretariaat van de VIZ: [secretariaat@infectieziekten.org](mailto:secretariaat@infectieziekten.org), of met het NVMM-secretariaat: [nvmm@knmg.nl](mailto:nvmm@knmg.nl).

# *Pseudomonas*-behandeling bij cystic-fibrosepatiënten

## Oude stoffen in een nieuw jasje

B. Voordouw, A. Vollaard, R. Bijleveld

In Nederland zijn ongeveer 1400 cystic fibrose (CF)-patiënten. Kolonisatie met *Pseudomonas* kan al ontstaan in het eerste levensjaar en eradicatie is moeilijk tot onmogelijk, zodat alleen suppressieve therapie overblijft om de infectie en inflammatoire respons te onderdrukken. Behandeling van *Pseudomonas aeruginosa*-luchtweginfecties in deze patiënten is van levensbelang.

Tijdens kolonisatie in het relatief anaerobe milieu van een CF-long veranderen *Pseudomonas*-bacteriën fenotypisch in een mucoïde vorm en vormen ze biofilms. Daardoor veranderen bacteriële virulentiefactoren en zijn de antibiotische gevoeligheidsbepalingen zoals bepaald in 'planktonic' bacteriën niet meer overeenkomstig.

### Middelen

Verschillende antimicrobiële middelen worden gebruikt, waarbij inhalatie-tobramycine en -colistine waren geregistreerd voor de langetermijnsuppressieve therapie van *P.aeruginosa* infecties in CF-patiënten in combinatie met systemische antibiotische therapie. Standaard wordt ook chronisch azitromycine-onderhoudsbehandeling gegeven. De verbetering in longfunctie en afname in aantal exacerbaties is waarschijnlijk niet het gevolg van een rechtstreeks bactericide effect, maar een immunomodulatoir effect of effect op de vorming van biofilms.

De consumptie van antibiotica in CF is fors: zowel wat betreft onderhoudsbehandeling met azitromycine als met inhalatieantibiotica en intraveneuze of orale antibiotica in geval van exacerbaties. In een studie kreeg 39% van de patiënten onder tobramycine-inhalatie ook nog intraveneuze antibiotica tijdens de studieduur van 24 weken.<sup>1</sup> Het nut van deze intensieve behandeling wordt niet door iedereen gesteund, zoals in een recentelijk gepubliceerde studie waarbij gedurende een decade de veranderingen in bacteriekolonies werd bepaald.<sup>2</sup> Exacerbaties waren niet geassocieerd met veranderingen in diversiteit of dichtheid van die kolonies, maar antibiotische behandeling leidde wel tot vermindering in diversiteit wat kolonisatieresistentie zou kunnen verminderen.

### Recente registraties

Recent zijn tobramycine en colistine ook geregistreerd als inhalatiepoeders (TobiPodhaler en Colobreathe)<sup>3,4</sup> voor CF-patiënten vanaf 6 jaar. Dit was op basis van non-inferiority studies, waarbij geen verschil met de al geregistreerde vernevelvloeistoffen werd gezien op het belangrijkste eindpunt verandering van de FEV<sub>1</sub> (het volume geblazen in één seconde bij geforceerde expiratie), wat geassocieerd wordt met overleving in CF-patiënten. Belangrijk voordeel van deze inhalatiepoeders is de korte toedieningstijd (5 minuten versus 20 minuten) en het toedieningsgemak wat bij kinderen en adolescenten de compliance zou kunnen bevorderen. Tenminste, als zij in staat zijn adequaat te inhaleren en niet teveel last hebben van de daarmee geassocieerde hoestprikkel. Verder is sinds 2009 voor aztreonam ook een vernevelvloeistof (Cayston)<sup>5</sup> geregistreerd voor dezelfde indicatie, en volgen wellicht fosfomycine en ciprofloxacine-inhalatievloeistoffen.

Vroege behandeling van *Pseudomonas*-infectie met inhalatieantibiotica is geassocieerd met betere uitkomsten voor patiënten en tijdelijke eradicatie,<sup>6</sup> maar voor eradicatie van *Pseudomonas* zijn deze antibiotica nog niet geregistreerd.

### Conclusie

De toegenomen beschikbaarheid van vernevel- en inhalatieantibiotica van verschillende klassen biedt de mogelijkheid van onderlinge uitwisseling en daarmee eventuele beperking van het risico van resistentieontwikkeling. In alle studies leidde afname van antibiotische

A. Vollaard, klinisch beoordelaar anti-infectiva, FT4, CBG; internist-infectioloog LUMC, R. Bijleveld, klinisch beoordelaar anti-infectiva, FT4, CBG.

Correspondentieadres: B. Voordouw, klinisch senior speerpuntbeoordelaar anti-infectiva, farmacotherapeutische groep IV, CBG; AIOS medische microbiologie LUMC, e-mailadres: ac.voordouw@cbg-meb.nl.

gevoeligheid van *Pseudomonas* onder inhalatietherapie echter niet meteen tot verslechtering van de FEV<sub>1</sub>. Dat betekent dat de standaardafkapwaarden bij inhalatie van dergelijke doses wellicht niet gelden, of effecten op andere micro-organismen ook een rol spelen. In ieder geval laat het zien dat we van de ecologie van bacteriële kolonisatie in CF nog maar weinig weten.

## Referenties

1. BW Ramsey, MS Pepe, JM. Quan et al. Intermittent Administration of Inhaled Tobramycin in Patients with Cystic Fibrosis. NEJM, 1999; 340:23-30.
2. J Zhao, PD Schloss, LM. Kalikin et al. Decade-long bacterial community dynamics in cystic fibrosis airways PNAS 2012 109 (15) 5809-5814.
3. Productinformatie Tobipodhaler: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002155/WC500110921.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002155/WC500110921.pdf).
4. Productinformatie Colobreathe: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/001225/WC500123690.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/001225/WC500123690.pdf).
5. Productinformatie Cayston: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000996/WC500019992.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000996/WC500019992.pdf).
6. Langton HSC, Smyth AR. Antibiotic strategies for eradicating *Pseudomonas aeruginosa* in people with cystic fibrosis. Cochrane Database of Systematic Reviews 2009, Issue 4. Art. No.: CD004197. DOI: 10.1002/14651858.CD004197.pub3

# Het genoom ligt op straat

J. Kaan

Carbapenemasevormende Enterobacteriaceae (CRE) zijn al lang in Nederland neergestreken in een aantal verschijningsvormen. CRE komen Nederland binnen met de medische toerist die zijn heup in India laat vernieuwen en daarbij een urineweginfectie verkrijgt, of met een op de intensive care in Griekenland verpleegd gerepatriëerd verkeersslachtoffer.<sup>1</sup> Maar de frequentie is laag en we houden er in de dagelijkse praktijk nog geen rekening mee in onze empirische therapieën. Het is te hopen dat er geen carbapenems gaan spelen in de bio-industrie, zodat we dit vooralsnog niet hoeven aan te passen.

Mijn dochter woont sinds enige tijd in New Delhi met haar gezin en ik was daar op bezoek. Het is een prettige stad, voor iedereen die van toeterend verkeer en schilderachtige markten houdt. De levensstandaard varieert in India extreem, zo ook in Delhi. Er is in ieder geval voldoende koopkracht om op iedere hoek wel een clinic in bedrijf te houden voor specialistische beeldvorming, laboratoriumonderzoek, of kindergeneeskunde, dan wel een winkel waar alle geneesmiddelen maar ook antibiotica te koop zijn. De dag van ons vertrek terug naar Nederland besloot ik het te wagen. Is de carbaresistentie hier nu werkelijk wijdverbreid? Ik schepte (enigszins besmuikt, bij zonsondergang) met een theelepeltje twee lege shampooflesjes vol



met grond uit de straat waar we te gast waren, verpakte ze in een dubbele plastic zak en verstopte het pakje in mijn binnenzak. In het laboratorium thuis in Nederland werd de grond met hulp van twee enthousiaste analisten op ESBL- en CRE-voedingsbodems gebracht. We concentreerden ons onderzoek op de gramnegatieve staven. Met een lichte schok bekeek ik enige dagen later de Vitek-uitdraai: een panresistente *E. coli*. De MIC's van 8 voor imipenem en 4 voor meropenem waren grimmig. Ik vroeg collega James Stuart Cohen om een genotypische bepaling en ja hoor: "de NDM (New Delhi Metallo-beta-lactamase) pcr is positief." Walsh onderzocht het leidingwater van Delhi al veel eerder en constateerde dat de verspreiding indrukwekkend ver gevorderd is.<sup>2</sup> En ik weet nu dat het genoom op 8 uur vliegen van hier aan je zolen meereist; een bedreigend gegeven.

## Referenties

1. Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al: Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53: 5046-54.
2. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis.* 2011 May;11(5):355-62.

## CURSUSAANKONDIGING NSPOH

### E-learning Tuberculosebestrijding

Door middel van blended learning leert u over de achtergronden van tuberculose, het voorkomen in de wereld en in Nederland, de behandeling en de preventieve maatregelen.

Doelgroep: artsen infectieziektebestrijding, artsen tuberculosebestrijding, artsen microbiologie, bedrijfsartsen, huisartsen werkzaam in PI, verpleegkundigen tuberculosebestrijding

Data: dinsdag 2 oktober en 4 november 2012

Kosten: € 350,-

Locatie: Amsterdam

Link: <http://www.nspoh.nl/page.ocl?pageid=32&id=552>

Inlichtingen: [www.nspoh.nl](http://www.nspoh.nl), tel. 020-4097000, e-mail: [info@nspoh.nl](mailto:info@nspoh.nl).

### Globalisering van de infectieziektebestrijding

Infectieziekten mondiaal gezien: het effect van en op de Nederlandse bestrijding van infectieziekten.

Doelgroep: professionals werkzaam in infectieziektebestrijding, artsen AGZ en JGZ, bedrijfsartsen, huisartsen en medisch microbiologen.

Data: dinsdag 11 en 18 december 2012

Kosten: € 770,-

Locatie: Amsterdam

Link: <http://www.nspoh.nl/page.ocl?pageid=32&id=85>

Inlichtingen: tel. 020-4097000, e-mail: [info@nspoh.nl](mailto:info@nspoh.nl).



## PROMOTIES

13 juni 2012

**M.H.J. Meevissen**

Titel proefschrift: *Schistosoma mansoni* egg glycoproteins: glycan structures & host immune responses

Promotores: prof. dr. M. Yazdanbakhsh, prof. dr. A.M. Deelder, copromotor: dr. R. Hokke. LUMC Leiden, afd. Parasitologie.

20 juni 2012

**A. de Breij**

Titel proefschrift: *Towards an explanation for the success of Acinetobacter baumannii in the human host*

Promotor: prof. dr. P.J. van den Broek, copromotores: dr. P.H. Nibbering, mw. dr. L. Dijkshoorn. LUMC Leiden, afd. Infectieziekten.

20 juni 2012

**W.L.J. Hansen**

Titel proefschrift: *Bacterial and fungal infections: Evolving towards molecular pathogen diagnostics*

Promotor: prof. dr. C.A. Bruggeman, copromotor: dr. ir. P.F.G. Wolffs. UMC Maastricht, afd. Medische Microbiologie.

26 juni 2012

**W. van der Hoek**

Titel proefschrift: *The 2007-2010 Q fever epidemic in the Netherlands: risk factors and risk groups*

Promotor: prof. dr. R.A. Continho, copromotor: dr. P.M. Schneeberger. UMC Utrecht, afd. Medische Microbiologie. RIVM, Centrum Infectieziektenbestrijding.

26 juni 2012

**B.C.L. van Schaijk**

Titel proefschrift: *The Plasmodium 6-cysteine protein family in sexual and sporozoite stages: targets for malaria vaccine development*

Promotor: prof. dr. R.W. Sauerwein. UMC St. Radboud Nijmegen, afd. Medische Microbiologie.

27 juni 2012

**A.L. Ouedraogo**

Titel proefschrift: *Determining the burden of Plasmodium falciparum transmissible stages in sub-Saharan African settings: Indices of transmission in Burkina Faso*

Promotor: prof. dr. R.W. Sauerwein, copromotores: dr. A.J.F. Luty (Universiteit Parijs), dr. J.T. Bousema (London School of Hygiene and Tropical Medicine, UK). UMC St Radboud Nijmegen, afd. Medische Microbiologie.

## ORATIE

6 september 2012

**prof. dr. C.A. Bruggeman**

Ter gelegenheid van haar afscheid als hoogleeraar medische microbiologie heeft prof. dr. C.A. Brugeman haar afscheidscollege gehouden getiteld: "De veranderende wereld van de Medische Microbiologie". UMC Maastricht, afd. Medische Microbiologie.

**24 september 2012**

**Werkgroep Algemene Medische Microbiologie (voorheen wgr. Oost & West)**

St. Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein. Aanvang 14.00 uur  
Informatie: T. Schulin, tel. 024-3614356; R.W. Vreede, tel. 015-2604305

**25 september 2012**

**Informatiebijeenkomst over Clostridium difficile in Nederland, voorafgaand aan het WIP-symposium,**  
LUMC, Leiden. Aanvang: 11 uur

**25 september 2012**

**Implementatie van (kern)richtlijnen op het gebied van infectiepreventie, WIP-symposium ter gelegenheid van het afscheid van Thea Daha**

LUMC, Leiden. Aanvang: 14 uur  
Aanmelding: <https://www.boerhaavenascholing>  
Informatie: [http://www.wip.nl/free\\_content/Uitnodiging\\_V2.pdf.nl](http://www.wip.nl/free_content/Uitnodiging_V2.pdf.nl)

**26 september 2012. Gewijzigde datum!**

**Werkgroep Hygiene en Infectiepreventie (HIP)**

Hoog Brabant, Utrecht. Aanvang: 15.00 uur  
Informatie: Hans Koeleman (secretaris), tel. 010-4616076

**27 september 2012**

**Wie is er sterker, het beestje of de mens?**

Kasteel Woerden. Aanvang: 15.00 uur  
Informatie: [www.hematologiedebat.nl](http://www.hematologiedebat.nl)

**4 oktober 2012**

**VRE, wat moet je ermee?**

Sanadome, Nijmegen. Aanvang: 15.00 uur  
Aanmelden: [www.interactie.org/vre](http://www.interactie.org/vre). De inschrijfkosten bedragen € 97,50.

**10 oktober 2012**

**8<sup>e</sup> ISIS-AR-dag**

RIVM, Bilthoven. Aanvang: 12.00 uur  
Aanmelden: [isis@rivm.nl](mailto:isis@rivm.nl)

**12 oktober 2012**

**Symposium Vaccines and Vaccination**

LUMC  
Informatie: <http://www.infectieziekten.org/mededelingen/mededelingen/cid-symposium-vaccines-and-vaccination-lumc?objectSynopsis=UYBUWj5pKjvwykyA6dETbg>

**8 - 11 november 2012**

**3<sup>rd</sup> Southeast European Conference on Chemotherapy and Infection**

Informatie: <http://www.seec2012.com/>

**12 - 14 november 2012**

**Boerhaave, Moleculaire diagnostiek in de microbiologische praktijk**

Leiden.  
Informatie: <https://www.boerhaavenascholing.nl/pages/Boerhaave/ShoppingCart?addactivity=14333&windowuid=uid1337865525>

**15 november 2012**

**Wetenschappelijke Najaarsvergadering NVMM en VIZ**

Conferentiecentrum Woudschoten, Zeist  
Aanmelden: <http://www.nvmm.nl/content/najaarsvergadering-2012-inschrijfformulier>

**3 december 2012**

**Werkgroep Algemene Medische Microbiologie (voorheen wgr. Oost & West)**

Nijmegen. Aanvang 14.00 uur  
Informatie: T. Schulin, tel. 024-3614356; R.W. Vreede, tel. 015-2604305

**19 december 2012**

**Werkgroep Hygiëne en Infectiepreventie (HIP)**

Hoog Brabant, Utrecht. Aanvang: 15.00 uur  
Informatie: Hans Koeleman (secretaris), tel. 010-4616076

**20 december 2012**

**Vooraankondiging: Infectieziektensymposium Amsterdam**  
AMC, Amsterdam. Aanvang: 9.00 uur

**14 - 17 februari 2013**

**2<sup>nd</sup> International Conference on Controversies in Vaccination in Adults (CoVAC), CoVAC 2013 München, Duitsland**

Informatie: [www.comtecmed.com/covac](http://www.comtecmed.com/covac). [covac@comtecmed.com](mailto:covac@comtecmed.com)

**27 - 30 april 2013**

**23<sup>rd</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)**

Berlijn  
Informatie: <http://www.congrex.ch/eccmid2013/>

**11 juni 2013**

**SKML congres: De Juiste Score**

Informatie: <http://www.skml.nl/organisatie/symposia-overzicht/skml-congres-2013>

**11 - 14 oktober 2013**

**6<sup>th</sup> Trends in Medical Mycology**

Kopenhagen  
Informatie: <http://www.TIMM2013.org>

**10 - 13 Mei 2014**

**24<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID),**

Barcelona  
Informatie: <http://www.congrex.ch/eccmid2014/>