

## **Commentaar op artikelen van het Consensusberaad Lyme Laboratorium Diagnostiek (Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie 2012-3)**

*door Niek Haak  
Stichting Tekenbeetziekten  
maart 2013*

### **Inleiding**

In een serie artikelen<sup>1-5</sup> onderzoeken en beschrijven medisch microbiologen en medewerkers van elf laboratoria, waaronder het RIVM en medische faculteiten, de Lyme diagnostiek in Nederland. Zij signaleren een aantal problemen: lymepatiënten bemoeien zich met diagnostiek en behandeling, de grote variatie in testresultaten en fout-negatieve uitslagen maken patiënten wantrouwig, er is druk vanuit de politiek en er blijft een groot verschil van mening met patiënten organisaties dat ook via het CBO overleg niet opgelost kon worden.

Als antwoord op deze situatie zijn twee onderzoeken gestart om de Lyme diagnostiek bij diverse laboratoria in Nederland te vergelijken. Het idee van een vergelijkend onderzoek is op zich nuttig maar wel laat, aangezien de problemen met serologische lymetesten al vele jaren bekend zijn. De twee artikelen hierover<sup>1,2</sup> hebben een aantal goede

elementen, evenals het onderzoek naar de mogelijkheid om de diagnostiek te verbeteren door meten van immuuncomplexen<sup>5</sup>.

Helaas verdwijnt objectieve wetenschap daarbij al snel naar de achtergrond. De conclusie is heel voorspelbaar dat het prima voor elkaar is met de Lyme diagnostiek in Nederland, dat het Consensusberaad nuttig was om de puntjes nog eens op de i te zetten en dat er wat probleempjes resteren die nog aandacht vereisen (waarvan met stip op plaats één de zogenaamd talrijke 'fout-positieven' bij serologische en andere lymetesten). Helaas wordt dit rooskleurige beeld niet gestaafd door de feiten.

In het vervolg van dit commentaar wordt de inhoud van de diverse artikelen van het Consensusberaad nader besproken.

In de eerste twee artikelen wordt een inventarisatie en vergelijking gemaakt van de diagnostische lymetesten die bij Nederlandse laboratoria in gebruik zijn.

## **Interlaboratoriumvariatie van de serologie voor de ziekte van Lyme in Nederland <sup>1</sup>**

*(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)*

Dit onderzoek inventariseert de serologische testen voor *Borrelia* die in negen Nederlandse laboratoria gebruikt worden en de combinaties die dit oplevert bij gebruik van het standaard tweestaps protocol van EIA + Immunoblot. De bedoeling is te kijken naar zowel verschillen tussen de testen als tussen de resultaten van verschillende laboratoria die met dezelfde test werken. Dit is onderzocht aan de hand van 20 sera van goed gedefinieerde lymepatiënten met een vroege of een late infectie en 5 controle sera. Er wordt inderdaad een aanzienlijke variatie gevonden:

*“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 standaardisatie van de Lyme-serologie tussen de laboratoria onderling kan hopelijk de inter-laboratoria verschillen verkleinen.” <sup>1</sup>*

Het wantrouwen dat mede het gevolg is van die variatie in eindconclusies van de serologie lijkt voor de microbiologen het belangrijkste pijnpunt. Bij standaardisatie van de testen zullen de verschillen vast kleiner worden; de vraag is wél of dat ook een betrouwbaarder resultaat oplevert. Een gestandaardiseerde slechte test blijft een slechte test, ook al heeft de buitenwacht dat dan minder snel in de gaten.

Conclusie van het onderzoek is dat de verschillen tussen de laboratoria bij gebruik van dezelfde test beperkt zijn, maar dat door gebruik van verschillende criteria en combinaties van testen frequent verschillende conclusies optreden, met name in de vroege fase. Het lijkt er op dat de labs die bij het onderzoek betrokken waren in technisch opzicht over het algemeen goed hun werk doen; een positieve bevinding. Over gevoeligheid van de testen wordt in dit artikel geen uitspraak gedaan.

Er zijn een aantal fundamentele problemen met de opzet van deze vergelijking van de testen en de laboratoria. Omdat deze problemen in sterkere mate gelden voor het tweede onderzoek over Lyme serologie <sup>2</sup> worden ze daar besproken. De conclusies van dit eerste artikel zijn in orde, zolang men de beperkingen van de studie in het achterhoofd houdt, dus niet zomaar extrapoleren naar de totale Lyme serologie situatie in Nederland.

Een opvallend resultaat:

*“De RIVM in-house Immunoblot scoorde negatief bij alle EM-patiënten.” <sup>1</sup>*

Deze test wordt inmiddels niet meer gebruikt; een interessante vraag is hoeveel lymepatiënten in het verleden ten onrechte als seronegatief beoordeeld zijn op basis van deze blijkbaar onvoldoende gevoelige test van het 'toonaangevende' RIVM. Diverse laboratoria stuurden in het verleden namelijk hun positieve Lyme EIA bloedmonsters naar het RIVM voor een confirmerende test.

## Nationale vergelijking van serologische assays voor het aantonen van *Borrelia*-antistoffen <sup>2</sup>

(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)

Het voorgaande onderzoek <sup>1</sup> betrof een beperkte groep patiënten en laboratoria. In dit tweede onderzoek probeert men een beter beeld te krijgen van de situatie door veel meer patiënten, meer labs/testkits en vooral meer 'controles' mee te nemen in de vergelijking. Er zijn enkele belangrijke, met elkaar samenhangende, problemen met de opzet van dit vergelijkend onderzoek: er wordt alleen gekeken naar 'modelpatiënten', er is twijfel mogelijk over de gebruikte controlegroep en de te lage gevoeligheid van de testen wordt ten onrechte gebagatelliseerd. De auteurs zijn zich ten dele van deze problemen bewust, maar ze trekken toch de volgende conclusie uit het onderzoek:

*“Voor de Nederlandse patiënten die worden verdacht van een Borrelia-infectie zijn er goede serologische testen beschikbaar met hoge sensitiviteit en specificiteit.”* <sup>2</sup>

We zullen laten zien dat deze eindconclusie om diverse redenen niet terecht is.

### **Probleem 1: modelpatiënten en selectie bias**

Het gaat om Lyme-patiënten met een 'goed gedefinieerd ziektebeeld', die dus al eerder door de serologische tests heen kwamen en 'kenmerkende symptomen' hadden (een algemeen verschijnsel bij onderzoek naar Lyme diagnostiek). Dit maakt het vergelijkend onderzoek makkelijker, maar het geeft per definitie een selectie bias. Die bias is geen bezwaar zolang het om een onderlinge vergelijking van testkits en laboratoria gaat, maar dan moet je vervolgens geen conclusies trekken over de kwaliteit en met name gevoeligheid van de Lyme serologie in het algemeen. De auteurs onderkennen het bias probleem:

*“... 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.”* <sup>2</sup>

Hoe de testen presteren bij de vele Lyme-patiënten met een minder stereotiep ziektebeeld, bijv. degenen die (aanvankelijk) seronegatief waren en minder 'kenmerkende' symptomen hadden, valt niet te beoordelen.

We weten bijvoorbeeld dat ongeveer de helft van de Lyme-patiënten géén EM krijgt of opmerkt. Deze hele groep komt in het onderzoek niet aan bod tenzij ze een andere specifieke combinatie van symptomen en/of een PCR testuitslag hadden. Het grote verschil tussen de EM patiënten van de ziekenhuizen resp. van de RIVM test (tabel 1 p.114-115) wijst ook op een selectie bias in het onderzoek, waardoor de gevoeligheid overschat wordt. De eindconclusie dat de testen een 'hoge sensitiviteit' hebben, is alleen al hierom veel te optimistisch: de gevoeligheid is hooguit goed voor modelpatiënten zoals in het onderzoek (nog afgezien van de vraag of de gevonden gevoeligheid echt 'goed' genoemd mag worden).

Ook bij late fase patiënten is sprake van bias. Van Lyme-artritis en ACA patiënten is bekend dat die doorgaans (in het latere stadium) een robuuste afweerreactie hebben en dus meestal positief zullen testen; dit is echter niet representatief voor alle Lyme-patiënten in de latere fase. Bij deze meestal duidelijk herkenbare groep is nog een ander bias risico aanwezig: omdat een patiënt met dit type klachten - op basis van vooral Amerikaanse onderzoek - geacht wordt een duidelijk positieve Lyme serologie te hebben zal iemand met artritis klachten of een minder stereotiepe vorm van ACA en negatieve serologie snel een andere diagnose dan Lyme krijgen. Zulke patiënten zouden zelfs bij de 'controles' - in plaats van bij de erkende Lyme-patiënten - terecht kunnen komen. Ze zorgen dan niet alleen voor een overschatting van de gevoeligheid van de test, maar ook nog voor overschatting van het aantal 'fout-positieven'.



## ***Probleem 2: twijfelachtige controles en 'fout-positieven'***

Dat brengt ons bij het tweede probleem met de opzet van de vergelijking. Een diagnostische test moet zo specifiek mogelijk zijn, d.w.z. zo weinig mogelijk fout-positieven hebben. De keus van de juiste controles is belangrijk om de specificiteit te kunnen beoordelen. Bij de controle groep is soms onduidelijk hoe men zeker weet dat deze geen Borrelia infectie hebben of eerder hadden (volgens de onderzoekers blijven de antilichamen tegen Borrelia soms nog heel lang aanwezig). Bloeddonors worden normaal niet gescreend op aanwezigheid van Borrelia. Bij andere ziektebeelden dan Lyme is de diagnose soms gebaseerd op 'expert opinion' en niet op controleerbare feiten zoals een betrouwbare diagnostische test. Regelmatig horen we over patiënten met als oorspronkelijke diagnose MS, artritis, fibromyalgie enz. die later een actieve Borrelia infectie blijken te hebben. We weten ook uit de SKML testen dat soms ten onrechte syfilis wordt gediagnosticeerd bij een Borrelia besmetting. Laten we hopen dat er niet teveel van dit soort fout-diagnoses bij de controle groep zaten, want dan worden ze meegeteld bij de 'fout-positieven'.

Het is merkwaardig dat men steeds waarschuwt voor 'fout-positieven' bij Lyme diagnostiek, terwijl bij andere (soms vaker voorkomende) ziektebeelden de diagnose kennelijk boven iedere twijfel verheven is. Het lijkt erop alsof de auteurs van mening zijn dat Lyme geen serieuze ziekte is en al die andere ziektebeelden wél (alleen fout-positieven zijn een probleem, níet fout-negatieven). Er zullen onder patiënten met een Borrelia infectie zeker meer foutdiagnoses zijn dan door medici wordt toegegeven; wie niet zoekt zal ook niets vinden.

Het is aannemelijk dat ook in de literatuur door gebruik van foute controles het aantal 'fout-positieven' bij onderzoek van lymetesten groter lijkt dan het is. Het bekende 'Overdiagnosis' artikel <sup>6</sup> waarmee de hype onder microbiologen t.a.v. 'overdiagnose van lymepatiënten' twintig jaar geleden begon, is hiervan een treffend voorbeeld. In dat onderzoek werden vele lymepatiënten ingedeeld bij andere ziektebeelden om de simpele reden dat ze een antibiotica kuur van twee weken achter de rug hadden en 'dus' geen Lyme meer konden hebben en de symptomen op een ander ziektebeeld moesten wijzen. Als die 'controle' patiënten vervolgens positief testen in een lymetest 'bewijst' dat voor de onderzoekers dat de serologische testen veel fout-positieven opleveren en dat er dus sprake is van 'overdiagnose' van Lyme ...

In het tweede onderzoek <sup>2</sup> heeft men een groot aantal 'controles' meegenomen. Dit lijkt vooral bedoeld om te benadrukken dat fout-positieven een groot risico zijn bij Lyme diagnose. Als je het artikel terloops leest, zou je de indruk kunnen krijgen dat welhaast iedere gezonde patiënt positief scoort bij een lymetest, vanwege alle mogelijke kruisreacties. Het zou kunnen dat sommige 'kruisreacties' bij lymetesten berusten op reacties met Borrelia antistoffen bij patiënten die in werkelijkheid Lyme hebben, maar die fout gediagnosticeerd zijn - en dus géén 'fout-positieven' zijn (het zijn geen *false positives* maar *true positives*).

*“... 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.”*

Fout-positieven als gevolg van een 'serologisch litteken' (doorgemaakte infectie, geen klachten) kunnen voorkomen, maar ook hier is de vraag wat precies de situatie is. We nemen aan dat een patiënt alleen getest wordt als er duidelijke klachten zijn. Misschien is er twijfel mogelijk over de oorzaak van de klachten, maar hoe weet men *zeker* dat die klachten *niet* door Borrelia komen? Vaak 'weet' men dat alleen omdat de patiënt ooit een antibiotica kuurtje gehad heeft en *dus* geen Borrelia infectie meer kan hebben; of de Borrelia echt verdwenen is is niet onderzocht (en ook niet met zekerheid vast te stellen). Maar uit o.a. dierproeven weten we al lang dat dit onder medici populaire standpunt in het algemeen onjuist is en dat een deel van de Borrelia's ook een intensieve antibiotica kuur kan overleven.

Ook bestaat het risico dat patiënten positief testen maar (nog) geen klachten hebben, of geen klachten meer hebben, omdat hun afweersysteem Borrelia onder de duim houdt. De ervaring leert dat zo iemand alsnog Lyme kan krijgen als tijdelijk de weerstand minder wordt door bijvoorbeeld een andere ziekte, ongeluk of operatie. Kortom, bij veel 'fout-positieven' van de microbiologen kunnen grote vraagtekens gezet worden.

## ***Probleem 3: beperkte gevoeligheid***

Omdat de EIA test vaak onvoldoende specifiek is, wordt in het tweestaps protocol met een opvolgende Immunoblot gecontroleerd of een EIA uitslag echt positief is. Door het tweestaps protocol wordt de gevoeligheid nog lager dan die al was bij gebruik van alleen de EIA, omdat de Immunoblot ook

positieve EIA's kan missen <sup>7</sup>. Merkwaardig is dat alleen een positieve EIA uitslag gecontroleerd moet worden en een negatieve uitslag niet.

Bij de vergelijkende onderzoeken <sup>1,2</sup> wordt geen harde uitspraak gedaan over de gevoeligheid van de testen in de vroege fase; duidelijk is dat zelfs bij 'modelpatiënten' de uitkomsten sterk variëren per testkit en een aanzienlijk percentage lymepatiënten gemist wordt (in overeenstemming met diverse eerdere onderzoeken naar Lyme serologie). De uiteindelijke gevoeligheid is mede afhankelijk van o.a. meetellen van IgM en/of IgG, de interpretatie van grenswaardes en de door het lab gebruikte combinatie van EIA en Immunoblot - en dus niet af te leiden uit de door de auteurs gepresenteerde data.

IDSA auteurs noemen een gevoeligheid voor het tweestaps protocol van 35% bij Amerikaanse EM patiënten <sup>8</sup>, dus 2 van de 3 patiënten worden gemist. Er is geen reden om aan te nemen dat de situatie in Nederland veel anders is. Met name patiënten zonder EM of andere 'zeer kenmerkende' Lyme symptomen hebben daardoor een aanzienlijke kans op een foute diagnose.

*“Op basis van deze studie is dus alleen te concluderen dat de geïncludeerde testen een goede sensitiviteit hebben voor het aantonen van gedissemineerde LB.” <sup>2</sup>*

Zelfs deze beperkte conclusie is helaas onjuist: het geldt alleen voor de onderzochte, stereotiepe vormen en niet voor gedissemineerde LB in het algemeen; en het is nog de vraag wat je 'goed' moet noemen. Dit alles heeft geen invloed op de eindconclusie dat de in Nederland gebruikte serologische testen een 'hoge sensitiviteit' zouden hebben. De redenering achter die eindconclusie lijkt ongeveer als volgt:

- a) Seronegativiteit is een probleem wat te maken heeft met te vroeg (minder dan 6-8 weken na infectie) testen, bij later opnieuw testen zullen deze patiënten alsnog de juiste diagnose krijgen - als ze tenminste echt Lyme hebben.
- b) De serologische testen zijn vrijwel 100% gevoelig voor late/gedissemineerde Lyme, dus wie in het vroege stadium gemist wordt, zal later alsnog de juiste diagnose krijgen.

Hierin zitten helaas diverse denkfouten.

Probleem met punt **a**) is dat opnieuw testen vaak niet gebeurt ('ziet u wel, niks aan de hand!') en dat een aanzienlijk aantal patiënten ook bij een hertest negatief scoort, terwijl ze later wel degelijk een *Borrelia* infectie blijken te hebben. Voor zulke fout-

negatieve uitslagen zijn allerlei verklaringen te bedenken, feit is dat het regelmatig voorkomt en niet alleen bij testen binnen 6-8 weken na infectie (zie o.a. Ombudsmanrapport <sup>9</sup>).

Probleem met punt **b**) is dat er in de late fase al een aanzienlijke kans is op blijvende schade (en hogere kosten voor de behandeling), dus dit is op voorhand een onwenselijke situatie. Bovendien is die '100% gevoeligheid' in de late fase, een eindeloos herhaalde uitspraak onder Nederlandse 'Lyme experts', hooguit enigszins correct voor bepaalde stereotiepe vormen van late Lyme zoals Lyme-artritis en ACA.

Ook in dit onderzoek <sup>2</sup> blijkt de '100% gevoeligheid' alleen na jongleren met de data. Wie de EIA tabel leest, ziet bijvoorbeeld (IgM en/of IgG, grenswaarde negatief) 61-100% gevoeligheid voor EM, 40-100% voor neuroborreliose en 80-100% voor Lyme-artritis. Op basis van alleen IgG (in de praktijk realistischer) wordt de score soms nog veel lager. De auteurs komen zelf op 'bijna 100%' o.a. door alleen data mee te tellen van '*assays waarin minimaal 10 sera getest waren*', een benadering die blijkbaar niet nodig is voor interpretatie van bijvoorbeeld kruisreacties... Kortom, hier wordt op allerlei manieren toegewerkt naar het gewenste eindresultaat. Bovendien zou vanwege het tweestaps protocol de uiteindelijke gevoeligheid altijd nog lager uitvallen dan data van de afzonderlijke EIA en Immunoblot tests suggereren.

We weten uit talloze publicaties dat seronegativiteit ook bij late Lyme regelmatig voorkomt; het is bizar hoe de onderzoekers deze informatie steeds opnieuw negeren. Volgens Donta <sup>10</sup> test zelfs meer dan 75 procent van zijn chronische lymepatiënten negatief bij de Elisa, maar positief bij de Immunoblot. Daarbij kunnen fout-positieven zitten, maar zulke patiënten zouden met het standaard tweestaps protocol *allemaal* als 'negatief' gediagnosticeerd zijn en dus ook niet in de Lyme statistieken en onderzoeken voorkomen.

Men suggereert in het tweede artikel dat andere vormen van diagnostiek zoals PCR, voorzover ze positief zijn, goed overeenstemmen met de serologie en dus geen aanvullende informatie opleveren. Dat zou bijna per definitie zo moeten zijn, gezien de stelling van IDSA voorman Wormser dat een positieve PCR test bij negatieve serologie een fout-positieve uitslag is <sup>11</sup>. Er zijn echter vele artikelen die het tegendeel bewijzen. Serologie geeft een eenzijdig en regelmatig foutief beeld, andere diagnose technieken zoals PCR, kweek en microscopie kunnen een goede aanvulling zijn en laten zien dat seronegatieve Lyme wel degelijk vaker

voorkomt, ook in de latere fase<sup>12-17</sup>. Of dit komt doordat de patiënten geen antistoffen aanmaken, of dat de antistoffen niet gedetecteerd worden omdat de gebruikte testkits niet matchen met de aanwezige antigenen, is meestal onbekend. Vandaar misschien dat de alternatieven voor serologie door Ang<sup>4</sup> snel afgeserveerd worden; ze ontcrachten het optimistische beeld van de microbiologen t.a.v. hoge sensitiviteit en specificiteit van serologie ...

Dat het aantal chronische lymepatiënten blijft stijgen is een aanwijzing dat de gevoeligheid van de serologische testen te wensen over laat en mede daardoor veel patiënten niet tijdig gediagnosticeerd en behandeld worden.

#### **Probleem 4: negeren van literatuur, cirkelredeneringen en jumping to conclusions**

Naast een zekere bias bij de onderzoeksopzet die van invloed is op de uitkomsten, is op talloze plaatsen in de artikelen (1-4) sprake van cirkelredeneringen, ontoelaatbare extrapolaties en het negeren van feiten en publicaties die niet in het beeld van de auteurs passen.

We weten uit het verleden hoe reviews op Lyme gebied doorgaans verlopen: er wordt selectief gewinkeld in de bestaande literatuur (soms via een extern 'onafhankelijk' instituut zodat het allemaal heel objectief lijkt), artikelen en feiten die niet met de mening van de 'experts' kloppen worden genegeerd of op basis van 'expert opinion' snel afgeserveerd en er worden nieuwe publicaties geproduceerd die de oude meningen en verdraaide feiten nog eens recyclen, zodat het lijkt of dit de algemeen heersende wetenschappelijke opvatting is. Natuurlijk gaat zo de mening van de 'experts' bevestigd worden; dit is niet bepaald de correcte 'wetenschappelijke' manier van werken.

Een voorbeeld van het negeren van relevante literatuur is het steeds terugkomende standpunt<sup>2,3,4</sup> dat seronegativiteit, zeker in de latere fase van Lyme, zeer zeldzaam is - ondanks een groot aantal publicaties dat het tegendeel bewijst, wat op diverse plaatsen in dit commentaar ter sprake komt.

Een ander voorbeeld is de interpretatie van serologische uitslagen. Zo komen Chinese onderzoekers bij relatief recent onderzoek naar Lyme Western Blot interpretatie<sup>18,19</sup> tot andere criteria dan hun Amerikaanse (en Nederlandse) collega's. En dat terwijl de in China voorkomende *Borrelia* soorten beter overeenkomen met de Nederlandse situatie dan de Amerikaanse *Borrelia* soorten. Zou dit er misschien mee te maken hebben

dat de Amerikaanse belangen rondom vaccin ontwikkeling, serologie patenten, onderzoeksgelden en kosten voor ziektekostenverzekeraars in China geen invloed hebben op de mening van onderzoekers en de inhoud van de diagnose richtlijnen? Kritiek op de interpretatie van *Borrelia* serologie zoals vastgesteld door vooral Amerikaanse onderzoekers en autoriteiten is overigens niet nieuw, deze kritiek bestaat al 20 jaar.

Enkele voorbeelden van cirkelredeneringen ten aanzien van modelpatiënten (probleem 1)<sup>2</sup>:

*“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.”*

Het zou er ook op kunnen wijzen dat de diagnose vaak gemist wordt (foutdiagnose), of dat de definitie zo strikt is opgesteld dat dit type patiënt inderdaad per definitie zeldzaam is. Als men afwijkingen van de norm niet onderzoekt dan zal het inzicht niet verbeteren.

*“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 prospectief aangelegde biobank is zeker nuttig, maar alleen als deze opgezet wordt zonder de bekende Lyme oogkleppen. Het materiaal beperken tot 'goed gedefinieerde patiënten' - zoals in de hier besproken studies naar Lyme serologie - helpt alleen om het bestaande beeld van medici en medisch microbiologen t.a.v. Lyme te bevestigen en zal weinig nieuwe informatie opleveren omdat de biobank dan onvoldoende representatief is.

*“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.”*

Dit geldt hooguit voor dit type patiënten en *niet* voor late fase patiënten in het algemeen. Bovendien zou 'alle' een gevolg van waarnemings bias kunnen zijn. Zoals vaker wordt er veel te makkelijk geëxtrapolerd van een niet-representatief onderzoek of een kleine groep patiënten naar de totale Lyme serologie situatie in Nederland.

*“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.”*

Per definitie ja ... aangezien de auteurs van mening zijn dat je zonder positieve serologie, kenmerkende symptomen etc. vrijwel zeker geen Lyme hebt en seronegatieve gevallen dus comfortabel buiten zicht blijven. Dit is een gevaarlijke cirkelredenering die helaas vaak voorkomt in Lyme onderzoek. Uit diverse publicaties is bekend dat seronegatieve Borrelia infecties wel degelijk voorkomen, maar daar kom je meestal alleen achter door andere diagnostiek dan serologie te gebruiken<sup>12-17</sup> en dat raden de auteurs af.

### **Borrelia-serologie in de Nederlandse situatie: interpretatie van testuitslagen en ontwikkelingen**<sup>3</sup>

*(C.W. Ang, N.D. van Burgel)*

De auteurs beginnen met de constatering dat artsen moeite hebben met interpretatie van Borrelia-serologie. Met indrukwekkende flowcharts en allerlei stellige uitspraken wordt de indruk gewekt dat de hier beschreven diagnostiek voor Lymeziekte heel degelijk is. Maar bij kritisch lezen zie je dat de diagnose verregaand afhankelijk is van de opinie van deze 'experts' en niet van harde feiten of algemeen geaccepteerde criteria. Het artikel staat zo vol met tendentieuze en onjuiste uitspraken dat het onmogelijk is er in detail op in te gaan, dus we lichten er alleen een paar opmerkingen uit.

*“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”*

Zijn de auteurs soms bang dat de Immunoblot een andere uitkomst zou kunnen geven dan 'negatief'? In de literatuur zijn volop voorbeelden te vinden van patiënten die met een EIA negatief testen en met een Immunoblot positief<sup>7, 10, 14</sup> (notabene inclusief een artikel van Ang zelf). Zouden dat volgens de auteurs allemaal 'fout-positieven' zijn? Of accepteren ze dat lymepatiënten in de vroege fase een fout-negatieve uitslag krijgen en desnoods pas in de late fase worden opgespoord? Ook uit talloze andere passages blijkt een negatieve bias t.a.v. Lyme (patiënten):

Soms ga je je afvragen waarom onderzoekers zoals Brandenburg, van Dam en Schellekens<sup>20</sup> niet simpelweg stellen dat de serologische lymetesten 100% gevoelig zijn en dat het enige probleem is dat er heel veel fout-positieven zijn. Voor hen heb je blijkbaar alleen Lyme als je positief test bij een serologische test, én een hele reeks volgens de 'experts' kenmerkende Lyme symptomen inclusief een officieel goedgekeurde EM hebt. Alles wat buiten die enge definitie valt kan geen Lyme zijn.

Op die manier wordt Lyme inderdaad - per definitie - een zeldzame, makkelijk te diagnosticeren en eenvoudig te behandelen ziekte (wie niet opknapt na maximaal twee weken antibiotica, die kan ook geen Lyme hebben ...). Helaas voor de meeste lymepatiënten is de werkelijkheid weerbarstiger.

*“Indien de klachten langer dan acht weken bestaan is de sensitiviteit van de antistof testen hoog. Bij onbehandelde patiënten met een ziekte duur van meer dan acht weken maakt een negatieve test een Lyme-borreliose zeer onwaarschijnlijk.”*

*“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 aspecifieke reactiviteit, bijvoorbeeld door kruisreagerende (auto-)antistoffen.”*

*“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”*

*“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.”*

De hierboven beschreven opinies t.a.v. fout-negatieve en fout-positieve uitslagen kwamen al eerder aan de orde. Ik weet uit eigen ervaring dat serologie ook lang na de tekenbeet en het ontstaan van kenmerkende lymeklachten (o.a. EM en

Bannwarth syndroom) herhaaldelijk negatief kan zijn. Gevolg: behandeling pas na twee jaar gestart, met daardoor ernstige medische en financiële schade. Terwijl dit volgens de auteurs een bijna ondenkbare uitzondering is, ken ik diverse vergelijkbare gevallen uit mijn naaste omgeving.

De opinie van Ang en van Burgel is gevaarlijk en misleidend, omdat dit soort patiënten door deze

oogkleppen visie automatisch een foute diagnose (en dus geen of een verkeerde behandeling) krijgen.

Het is te hopen dat dit artikel NIET, zoals de auteurs voorstellen, door huisartsen en specialisten gebruikt zal worden als leidraad voor interpretatie van Lyme serologie, want dan zullen opnieuw vele lymepatiënten een foute diagnose krijgen met alle gevolgen van dien.

## Diagnostische (on)mogelijkheden bij *Borrelia*-infecties <sup>4</sup>

(C.W. Ang)

Dit artikel bespreekt alternatieven voor serologie, die voor een deel worden aangeboden door

*“laboratoria die niet worden gesuperviseerd door leden van de NVMM, soms in het buitenland.”*

Oftewel: dit gaat vooral over de concurrentie.

*“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.”*

Oei, dat belooft niet veel goeds ... testen uit enge verre landen zoals Duitsland bijvoorbeeld, waar ze zoals bekend maar wat aan rommelen als het om medische testen gaat ;-)

*“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.”*

Merkwaardig, de Nederlandse laboratoria gebruiken zelf toch ook niet-gevalideerde testen?

*“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 blijkbare te verkiezen valt boven een correct-negatieve.” “Wij ... hopen door deze informatievoorziening het ondeskundig uitvoeren van diagnostische testen tegen te gaan.”*

Dit soort opmerkingen lijkt bedoeld om de Nederlandse laboratoria te vrijwaren van een negatief beeld en af te geven op concurrerende labs. De auteur schuift alle verlies van vertrouwen op concurrerende laboratoria, die grotendeels met dezelfde technieken werken. Maar misschien komt het verlies van vertrouwen wel doordat de Nederlandse microbiologen en laboratoria, ondanks de duidelijke feiten, stug blijven volhouden dat het prima voor elkaar is met Lyme serologie?

Vervolgens worden een aantal alternatieven voor Lyme serologie besproken. Hoewel alternatieven inderdaad (net als serologie) hun beperkingen hebben en soms nader onderzoek wenselijk is om bijvoorbeeld tot betere standaardisatie te komen, is de bespreking van Ang nauwelijks serieus te nemen. Het lijkt of bij voorbaat vast stond dat serologie de enige goede diagnosetechniek is.

PCR is in andere landen (met name buiten de IDSA invloedssfeer) sterk in opkomst voor Lyme diagnose en research, maar wordt afgewezen (voor algemene screening) wegens gebrek aan standaardisatie en soms onvoldoende gevoeligheid. Merkwaardig aangezien dezelfde problemen net zo goed voor serologie gelden. Dat PCR ook evidente voordelen heeft boven serologie (o.a. eerder bruikbaar dan serologie, directe in plaats van indirecte test wat veel discussie voorkomt, aantonen van Bb soort/stam mogelijk wat nuttig kan zijn voor betere diagnose/behandeling) wordt niet besproken.

LTT wordt zoals te verwachten afgewezen, aangezien deze techniek bij Nederlandse laboratoria niet wordt uitgevoerd. Voorzover bekend wordt deze test nooit aangeraden voor algemene screening, maar in lastige gevallen kan ze soms aanvullende informatie leveren. We zijn benieuwd wat men straks vindt van de enigszins op hetzelfde principe gebaseerde Spirofind test, die afkomstig is van KUN/Radboud.



*Microscopie* wordt afgewezen wegens o.a. een rechtszaak in de VS rond bedenkelijke praktijken (net als bij buitenlandse labs die op een bedenkelijke manier Lyme serologie uitvoeren?) en onvoldoende reproduceerbaarheid (klinkt ook bekend ...). Voor andere spirocheet ziektes zoals relapsing fever, syfilis en leptospirose is microscopie (donkerveld / fluorescentie) wél een aanbevolen of aanvullende diagnose techniek en er zijn genoeg aanwijzingen dat microscopie goede mogelijkheden biedt voor Lyme diagnose. Ondanks goed zoeken hebben we niet één serieuze publicatie kunnen vinden van de 'officiële' Lyme onderzoekers naar gebruik van microscopie voor Lyme diagnostiek, tenminste niet uit de afgelopen twintig jaar. Mogelijk komt dit door onbekendheid van de huidige generatie onderzoekers met microscopie, een voorkeur voor testen die met één druk op de knop een ja/nee resultaat opleveren en vooroordelen rond 'donkerveld microscopie'. Dat laatste is begrijpelijk, maar niet vanwege de techniek zelf, maar door de manier waarop deze techniek in alternatieve kring soms gebruikt wordt; en dus geen reden om microscopie in het algemeen overboord te zetten.

En misschien komt het ook wel door de wens om informatie te onderdrukken die volledig in tegenspraak is met hun eigen simplistische visie op Lyme. Zo melden chronische lymepatiënten van over de hele wereld al sinds jaren dat ze op spirocheten lijkende structuren in hun bloed zien met eenvoudige donkerveld microscopie, ondanks de nodige variatie in basistechnieken. Een recent research artikel <sup>21</sup> beschrijft deze waarnemingen en de benodigde (simpele) techniek. Hoewel de interpretatie hiervan controversieel is, zou hier dringend nader onderzoek op moeten volgen, gezien

### ***Detectie van *Borrelia burgdorferi* s.l.-specifieke immuuncomplexen in patiënten met erythema migrans en neuroborreliose*** <sup>5</sup>

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

Dit is in principe een nuttig onderzoek, aangezien eerdere artikelen suggereren dat met detectie van immuuncomplexen een aantal van de beperkingen van serologie te ondervangen zijn. Helaas leverde het onderzoek geen duidelijke verbetering van de serologie op. Eerdere onderzoeken over dit onderwerp kwamen ook al tot tegenstrijdige resultaten. Het zou nuttig zijn om het commentaar van Brunner op dit onderzoek <sup>5</sup> te lezen, mede omdat de gebruikte technieken afwijken van wat hij en eerder Schutzer c.s. gebruikten voor isolatie van immuuncomplexen (wat ook zijn kritiek was t.a.v. een eerder negatief artikel uit IDSA kring over het

de verstrekkende gevolgen als de voorgestelde hypotheses rondom (chronische) Lyme juist zijn.

De *urine antigen test* (LUAT) wordt afgewezen op basis van de conclusies van één negatief artikel door een 'gereputeerd laboratorium'. Ang vermeldt niet dat achteraf bleek dat de conclusie resultaat is van een (vermoedelijk met opzet) foute testprocedure en dus ongeldig. Een onderzoek bovendien onder leiding van de 'gereputeerde' auteurs Klempner en Steere, die bij patiënten berucht zijn vanwege hun sterk bevooroordeelde artikelen rondom Lyme diagnose en behandeling. Bovendien gaat het hier om een relatief oude test en zijn er sindsdien vele andere ontwikkelingen.

Na nog wat opmerkingen over 'overige controversiële testen' moet duidelijk zijn dat alleen serologie, mits uitgevoerd door een Nederlands laboratorium onder supervisie van de NVMM, als algemene diagnostische techniek voor Lyme gekwalificeerd is. Tenslotte wordt nog eens benadrukt dat de Nederlandse laboratoria goed presteren op basis van de SKML rondzendtesten. Dat deze testen een zeer beperkte waarde hebben en dat de resultaten soms helemaal niet zo fraai zijn blijft achterwege.

De conclusie "*Voor de diagnostiek van goed gedefinieerde vormen van Lyme-borreliose voldoen antistoftesten*", klinkt mooi, maar hoe zit het met de 'minder goed gedefinieerde' vormen van Lyme waarbij een betrouwbare test hard nodig is? Dit artikel is vooral politiek en commercieel, met wetenschap heeft het weinig te maken. En een gemiste kans, want zo blijven we langer dan nodig met verouderde diagnostische technieken werken.

meten van immuuncomplexen <sup>22</sup>).

Een opvallend detail uit deze studie: 13 van de 33 EM patiënten hadden een negatieve serologie (C6 Elisa en Immunoblot) bij zowel eerste als tweede afname (12 weken na antibiotica kuur). Dit is opvallend aangezien volgens microbiologen de antilichamen bij *Borrelia* infectie nog lang aanwezig kunnen blijven. Heeft de AB kuur bij deze patiënten de vorming van antistoffen onderdrukt, of is er een andere reden voor herhaaldelijk negatief testen? Misschien verloopt de 'seroconversie' bij Lyme niet zoals gedacht wordt?

## Conclusie

De conclusie van de medisch microbiologen:

*”Voor de Nederlandse patiënten die worden verdacht van een Borrelia-infectie zijn er goede serologische testen beschikbaar met hoge sensitiviteit en specificiteit.”*

is **onterecht en misleidend**; de gevoeligheid van de serologische testen laat duidelijk veel te wensen over. Op zich geen nieuws, want dit bleek al eerder bij diverse onderzoeken in binnen- en buitenland in de afgelopen jaren<sup>23-26</sup>. Op diverse punten is sprake van bias bij de opzet van het onderzoek en de analyse en interpretatie van de resultaten, waardoor

## Nabeschooving

Het grootste pijnpunt voor het Consensusberaad lijkt de variatie in laboratorium diagnostiek en de twijfel aan de betrouwbaarheid van serologische testen bij de patiënten te zijn. Het beraad lijkt dan ook vooral bedoeld om die variatie en twijfels weg te werken. De onderzoeken die daartoe zijn opgezet, zijn evenals de artikelen hierover - zogezegd - een typerend voorbeeld van ‘**de slager die zijn eigen vlees keurt**’. Daarnaast worden ten aanzien van concurrerende laboratoria en technieken bezwaren opgevoerd die net zo goed voor eigen serologische testen gelden, maar daar gebagatelliseerd worden. Het valt te betwijfelen of deze opstelling de geloofwaardigheid van Lyme serologie bij het grote publiek ten goede komt.

Duidelijk is dat men de variatie in conclusies bij Lyme serologie wil beperken door de testkits en interpretatie te standaardiseren. Op zich is dat prima, maar gezien de toon van de artikelen valt te vrezen dat daarbij sterk de nadruk zal liggen op maximale specificiteit, ten koste van de gevoeligheid; met als gevolg dat nog meer lymepatiënten aan hun lot worden overgelaten. De starre houding van de deelnemers aan het Consensusberaad t.a.v. de gebrekkige kwaliteit van serologische testen en mogelijke alternatieven **blokkeert vooruitgang bij Lyme diagnostiek en behandeling**, mede doordat dezelfde personen ook een belangrijke rol spelen in de CBO richtlijn commissie, de Gezondheidsraad commissie en bij het RIVM.

In **Europees verband** wordt blijkbaar hetzelfde nagestreefd. Zoals genoemd in de inleiding bij de vijf artikelen, wil men in Europees verband literatuur gaan reviewen, samen met ongetwijfeld dezelfde binnen- en buitenlandse ‘experts’ die

de gevoeligheid van de testen overschat wordt en het risico van 'fout-positieven' bij Lyme serologie te veel nadruk krijgt.

De alternatieven voor serologie zijn nauwelijks serieus beoordeeld en er wordt voorbij gegaan aan de vele beperkingen van de huidige serologische testen zoals onvoldoende geschiktheid van de testkits voor lokaal aanwezige Borrelia varianten of afwijkende Bb levensvormen, het niet goed kunnen onderscheiden van een actieve of doorgemaakte infectie en dat pas na 6-8 weken een betrouwbare testuitslag mogelijk is - wat het risico op het ontstaan van chronische Lyme vergroot.

verantwoordelijk zijn voor de huidige situatie t.a.v. Lyme diagnostiek en behandeling en die dus weinig reden zullen zien voor verandering.

Over het **belang van patiënten** lezen we in de artikelen van het Consensusberaad weinig, behalve dan dat men zich grote zorgen maakt over 'overbehandeling' op basis van 'fout-positieve' tests. Er zullen vast patiënten bestaan die onnodig behandeld zijn als gevolg van een fout-positieve lymetest, maar ik ben ze nog nooit tegengekomen. Patiënten die ernstige schade hebben opgelopen als gevolg van fout-negatieve lymetesten en kortzichtige Lyme diagnose richtlijnen zoals we die in de CBO richtlijn en het artikel van Ang en van Burgel<sup>3</sup> vinden, zijn er in overvloed.

Nergens komen de (internationale) **belangen achter de schermen** aan bod: hoe de regels voor Lyme diagnostiek beïnvloed zijn in het belang van bedrijven en onderzoekers die zich bezig houden met vaccin ontwikkeling of die patenten hebben rond de huidige serologische testen, de geldstroom voor onderzoek en de mogelijkheid te publiceren in 'gezaghebbende' medische tijdschriften waarbij alleen één bepaalde visie op Lyme acceptabel is, juridische belangen van artsen bij onzekere diagnostische methoden en verzekeraars die besparen op diagnostiek en behandeling, maar zo de belastingbetaler of de patiënt op termijn met torenhoge kosten opzadelen.

Uit recent onderzoek<sup>27-30</sup> komt het beeld naar voren dat er grote verschillen kunnen zijn in het verloop van Borrelia infecties, bijvoorbeeld t.a.v. het optreden van een EM en andere symptomen, het ontstaan van persistente infecties en gevoeligheid

van de bacterie voor antibiotica. Waarschijnlijk speelt het **Borrelia genotype** daarbij een belangrijke rol, in een complexe samenhang met eigenschappen van de patiënt en lokale factoren. Met serologie is het Borrelia genotype of de aanwezigheid van eventuele mix infecties (van verschillende Borrelia varianten) niet nauwkeurig vast te stellen terwijl dit met technieken als PCR wél kan en nuttig zou kunnen zijn bij diagnose en behandeling.

Ook is er discussie over de vraag welke Borrelia soorten met een lymetest wel of niet gedetecteerd moeten worden en duiken er regelmatig nieuwe Borrelia soorten op die met de bestaande serologische tests niet goed te detecteren zijn. Kortom, er zijn goede redenen om over te stappen

op andere diagnostische technieken.

Voor ons is vooral merkwaardig hoe microbiologen denken een **stealth infectie** zoals Borrelia betrouwbaar te kunnen detecteren met een simpele serologische test, terwijl deze bacterie zich al miljoenen jaren heeft gespecialiseerd in het ontwijken en manipuleren van het afweersysteem van de gastheer (inclusief mensen), waarop diezelfde test gebaseerd is. Borrelia is een obligate parasiet die er alle belang bij heeft om niet ontdekt te worden en zich zo duurzaam in de gastheer te handhaven. Serologische testen zijn voor zo'n pathogeen bijna per definitie problematisch. Alleen iemand met grote oogkleppen op kan concluderen dat de huidige serologische lymetesten prima voldoen.



*Scientific theories don't change because old scientists change their minds; they change because old scientists die - Max Planck (1858-1947)*

*Even when the experts all agree, they may well be mistaken - Bertrand Russell (1872-1970)*

## Referenties

- (1) Herremans T, Van Burgel TD, Brandenburg AH, Meijer B, Verduyn Lunel F, Nabuurs-Franssen M, Stelma FF, Ang CW, Van Dam AP, Bijlmer HA. Interlaboratoriumvariatie van de serologie voor de ziekte van Lyme in Nederland. Ned Tijdschr Med Microbiol 2012;20:nr3, 105-110
- (2) Ang CW, Brandenburg AH, Van Burgel ND, Bijlmer NA, Herremans T, Stelma FF, Verduyn Lunel F, Van Dam AP. Nationale vergelijking van serologische assays voor het aantonen van Borrelia-antistoffen. Ned Tijdschr Med Microbiol 2012;20:nr3, 111-119
- (3) Ang CW, Van Burgel ND. Borrelia-serologie in de Nederlandse situatie: interpretatie van testuitslagen en ontwikkelingen. Ned Tijdschr Med Microbiol 2012;20:nr3, 120-125
- (4) Ang CW. Diagnostische (on)mogelijkheden bij Borrelia-infecties. Ned Tijdschr Med Microbiol 2012;20:nr3, 126-129
- (5) Van Nunen FJHB, Sprong H, Hofhuis A, Bijlmer HA, Herremans T. Detectie van Borrelia burgdorferi s.l.-specifieke immuuncomplexen in patiënten met erythema migrans en neuroborreliose. Ned Tijdschr Med Microbiol 2012;20:nr3, 130-133
- (6) Steere AC, Taylor E, McHugh GL, Logigian EL. The overdiagnosis of Lyme disease. JAMA. 1993 Apr 14;269(14):1812-6.
- (7) 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 August; 30(8): 1027–1032
- "There are numerous examples—from this and other studies—in which patients with early Lyme disease were initially ELISA-positive and blot-negative. In such cases, immunoblot seroconversion can only be documented in a follow-up sample, and, sometimes, even this option is blocked because antibiotic treatment may interfere with the development of the anti-Borrelia antibody response"*
- "Surprisingly, we found anti-Borrelia immunoblot reactivity in samples that were negative in all eight ELISAs. These are samples that normally would not have been tested in immunoblots. Again, this was not dependent on the nature of the antigen used for the immunoblot. For the Euroimmun immunoblot, 4/11 (36%) of the ELISA-negative samples were blot-positive. "*
- (8) Wormser GP, Schriefer M, Aguero-Rosenfeld ME, Levin A, Steere AC, Nadelman RB, Nowakowski J, Marques A, Johnson BJ, Dumler JS. Single-tier testing with the C6 peptide ELISA kit compared with two-tier testing for Lyme disease. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013 Jan;75(1):9-15. >>
- "In this study, the diagnostic accuracy of a single-tier commercial C6 ELISA kit was compared with 2-tier testing. The results showed that the C6 ELISA was significantly more sensitive than 2-tier testing with sensitivities of 66.5% (95% confidence interval [CI] 61.7-71.1) and 35.2% (95% CI 30.6-40.1), respectively (P < 0.001) in 403 sera from patients with erythema migrans. "*
- (9) Stichting de Ombudsman & NVLP. De ziekte van Lyme, een onderschat probleem. Onderzoek naar de gevolgen voor patiënten en maatschappij, september 2011. 146 p.
- In tabel 4.2 zien we dat 17% van de lymepatiënten minstens twee negatieve tests en minimaal één positieve test hadden en 9% minstens drie negatieve tests en minimaal één positieve test. 12% van de patiënten had een negatieve EIA test én een positieve Immunoblot - door de Nederlandse labs zouden deze patiënten als 'negatief' bestempeld zijn, want na een negatieve EIA wordt - conform advies van de microbiologen - geen Immunoblot uitgevoerd.*
- (10) Donta ST. Late and chronic Lyme disease. Med Clin North Am. 2002 Mar;86(2):341-9, vii.
- (11) Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of lyme borreliosis. Clin Microbiol Rev. 2005 Jul;18(3):484-509.
- "PCR positivity in seronegative patients suspected of having late manifestations of LB most likely represents a false-positive result. "*
- (12) Jolanta Chmielewska-Badora<sup>1</sup>, Ewa Cisak<sup>1</sup>, Angelina Wójcik-Fatla<sup>1</sup>, Jacek Zwoliński<sup>1</sup>, Alicja Buczek<sup>2</sup>, Jacek Dutkiewicz<sup>1</sup>. Correlation of tests for detection of Borrelia burgdorferi sensu lato infection in patients with diagnosed borreliosis. Ann Agric Environ Med 2006, 13, 307–311
- "No correlation was found to exist between the PCR results and the results of any of the serologic tests for detection of anti B. burgdorferi s.l. antibodies of IgM class. PCR results correlated significantly at a relatively low level (0.01 < p < 0.05) with the results of IgG-ELISA, but not with the results of IgG-immunoblot with regard to total reactions (0.2 < p < 0.1). "*
- (13) Coulter P, Lema C, Flayhart D, Linhardt AS, Aucott JN, Auwaerter PG, Dumler JS. Two-year evaluation of Borrelia burgdorferi culture and supplemental tests for definitive diagnosis of Lyme disease. J Clin Microbiol. 2005 Oct;43(10):5080-4.
- "Overall, 30 of 86 patients (35%) were culture positive, whereas an additional 15 of 84 (18%) were seropositive only (51% total sero- and culture positive), and PCR on skin biopsy identified 4 additional patients who were neither culture nor seropositive."*

(14) Tylewska-Wierzbanowska S, Chmielewski T. Limitation of serological testing for Lyme borreliosis: evaluation of ELISA and western blot in comparison with PCR and culture methods. *Wien Klin Wochenschr.* 2002 Jul 31;114(13-14):601-5.

*"No correlation was found between levels of specific B. burgdorferi antibodies detected with a recombinant antigen ELISA and the number of protein fractions developed with these antibodies by immunoblot. Moreover, Lyme borreliosis patients who have live spirochetes in body fluids have low or negative levels of borrelial antibodies in their sera. This indicates that an efficient diagnosis of Lyme borreliosis has to be based on a combination of various techniques such as serology, PCR and culture, not solely on serology."*

(15) Grignolo MC, Buffrini L, Monteforte P, Rovetta G. Reliability of a polymerase chain reaction (PCR) technique in the diagnosis of Lyme borreliosis. *Minerva Med.* 2001 Feb;92(1):29-33.

*"50% of the PCR positive results, obtained with serum and cerebrospinal fluid samples corresponded to patients who were true positives at clinical examination but negatives at serologic tests."*

(16) Honegr K, Hulínská D, Dostál V, Gebouský P, Hanková E, Horáček J, Vyslouzil L, Havlasová J. Persistence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in patients with Lyme borreliosis. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2001 Feb;50(1):10-6.

*"In 18 patients with Lyme borreliosis the authors proved the persistence of Borrelia burgdorferi sensu lato by detection of the causal agent by immune electron microscopy or of its DNA by PCR in plasma or cerebrospinal fluid after an interval of 4-68 months. Clinical manifestations common in Lyme borreliosis were present in only half the patients, in the remainder non-specific symptoms were found. In nine subjects with confirmed Borrelia burgdorferi sensu lato in the cerebrospinal fluid the cytological and biochemical finding was normal. Examination of antibodies by the ELISA method was negative in 7 of 18 patients during the first examination and in 12 of 18 during the second examination"*

(17) Girard YA, Fedorova N, Lane RS. Genetic Diversity of *Borrelia burgdorferi* and Detection of *B. bissettii*-Like DNA in Serum of North-Coastal California Residents. *J Clin Microbiol.* 2011 March; 49(3): 945–954.

*"Clinical and serological data previously gathered from CHR residents and analyzed (17, 18) were reevaluated in the light of our new, PCR-based evidence of B. burgdorferi infection among the study subjects. Three out of 16 (18.8%) and 7/12 (58.3%) (P = 0.039) of the B. burgdorferi PCR-positive sera collected in 1988 and 1989, respectively, were test positive for LB antibodies using the most stringent criteria. Greater concordance between PCR and serology was found when borderline samples were considered. Most B. burgdorferi PCR-positive individuals reported one or more LB clinical manifestations or had physician-diagnosed LB. Of the 24 subjects who were B. burgdorferi PCR positive in at least 1 year, 79.1% reported a history of one or more tick bites. In the same 24 individuals, joint pain was the most common symptom,*

*followed by EM and flu-like illness, neurological manifestations, and cardiac abnormalities."*

(18) Jiang Y, Hou XX, Geng Z, Hao Q, Wan KL. Interpretation criteria for standardized Western blot for the predominant species of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in China. *Biomed Environ Sci.* 2010 Oct;23(5):341-9.

(19) Liu ZY, Hao Q, Hou XX, Jiang Y, Geng Z, Wu YM, Wan KL.

A Study of the Technique of Western Blot for Diagnosis of Lyme Disease caused by *Borrelia afzelii* in China. *Biomed Environ Sci.* 2013 Mar;26(3):190-200.

(20) 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 Aug;30(8):1033-4; author reply 1035-7.

(21) Laane MM, Mysterud I.

A simple method for the detection of live *Borrelia* spirochaetes in human blood using classical microscopy techniques.

*Biological and Biomedical Reports* 2013, 3(1), 15-28

*"We also present a simple hypothesis for explaining the confusion generated through the interpretation of possible stages of Borrelia seen in human blood. We hypothesize that these various stages in the blood stream are derived from secondarily infected tissues and biofilms in the body with low oxygen concentrations. Motile stages transform rapidly into cysts or sometimes penetrate other blood cells including red blood cells (RBCs). The latter are ideal hiding places for less motile stages that take advantage of the host's RBCs blebbing-system. Less motile, morphologically different stages may be passively ejected in the blood plasma from the blebbing RBCs, more or less coated with the host's membrane proteins which prevent detection by immunological methods."*

(22) 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

(23) Goossens HA, van den Bogaard AE, Nohlmans MK. Evaluation of fifteen commercially available serological tests for diagnosis of Lyme borreliosis.

*Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999 Aug;18(8):551-60.

*"The performance of 11 commercially available enzyme immunoassays (EIA) and four Western blot (WB) tests for the detection of IgM and IgG antibodies against Borrelia burgdorferi were compared. ... In specimens from patients with early Lyme borreliosis, the sensitivity of the individual tests ranged from 35 to 81% for detection of IgM. In late Lyme borreliosis, sensitivity of the tests ranged from 46 to 92%. In healthy controls the specificity of the tests ranged from 89 to 100% and from 82 to 97% for IgM and IgG tests, respectively. In the patient control group, specificity of the tests ranged from 75 to 90% for IgM and from 84 to 100% for IgG tests. ... The maximum sensitivity of Western blotting for detecting IgM in patients with early Lyme borreliosis and IgG in patients with late Lyme borreliosis was 50 and 46%, respectively. The use of an EIA-WB two-test protocol improved the specificity and positive predictive values of the EIA results but caused a significant loss in sensitivity."*

(24) Hunfeld KP, Stanek G, Straube E, Hagedorn HJ, Schörner C, Mühlischlegel F, Brade V. Quality of Lyme disease serology. Lessons from the German Proficiency Testing Program 1999- 2001. A preliminary report. Wien Klin Wochenschr. 2002 Jul 31;114(13-14):591-600.

*"Test results were found to be in part highly variable and clearly correlated with the manufacturers and the applied test methodology. ... Quantification of test results and reporting of specific immunoblot bands also showed high variability. Moreover, for some assays a high number of false positive and false negative test results were reported by the participants. ... In view of our results further standardisation of Lyme disease serology is not just desirable but is urgently needed. Moreover, stronger criteria for the validation of available test kits must be applied."*

(25) Smismans A, Goossens VJ, Nulens E, Bruggeman CA. Comparison of five different immunoassays for the detection of *Borrelia burgdorferi* IgM and IgG antibodies. Clin Microbiol Infect. 2006 Jul;12(7):648-55.

*"The performances of five commercially available enzyme immunoassays were compared for the detection of Borrelia burgdorferi IgM and IgG antibodies. Sensitivity was assessed with European serum samples collected from 45 patients with clinically defined Lyme disease in conjunction with a positive immunoblot (n = 44) or other serological test (n = 1). Sensitivities for the detection of IgM and IgG with each test were: Dako IgM 64%; Dako IgG 53%; Serion IgM 89%; and Serion IgG 88%. The Immunitics assay makes no distinction between IgM and IgG antibodies and had a sensitivity of 91%. Specificity was calculated by testing a control group comprising 40 patients with acute Epstein-Barr virus infection, cytomegalovirus infection, syphilis or rheumatoid factor positivity. The specificities achieved for each test were: Dako IgM 78%; Dako IgG 100%; Serion IgM 52%; Serion IgG 92%; and Immunitics 92%."*

(26) Müller I, Freitag MH, Poggensee G, Scharnetzky E, Straube E, Schoerner Ch, Hlobil H, Hagedorn HJ, Stanek G, Schubert-Unkmeir A, Norris DE, Gensichen J, Hunfeld KP. Evaluating frequency, diagnostic quality, and cost of Lyme borreliosis testing in Germany: a retrospective model analysis. Clin Dev Immunol. 2012;2012:595427.

*"Currently, a large variety of serological tests for the detection of LB are available in the European market, supplied by an increasing number of manufacturers. ... the quantity of detected antibody measured in titers or quantitative EIA results and, similarly, the number and category of specific immunoblot bands can vary greatly for the same sample. In addition, changes in qualitative and quantitative serologic test results may be misleading and can emerge simply by using different assay systems in different laboratories. "*

(27) Baranton G, Seinost G, Theodore G, Postic D, Dykhuizen D. Distinct levels of genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* are associated with different aspects of pathogenicity. Res Microbiol. 2001 Mar;152(2):149-56.

*"Only two groups in B. afzelii and four groups in B. garinii cause invasive disease. Thus, only ten out of the 58 defined ospC groups cause invasive and presumably chronic Lyme disease."*

(28) Wormser GP, Brisson D, Liveris D, Hanincová K, Sandigursky S, Nowakowski J, Nadelman RB, Ludin S, Schwartz I. *Borrelia burgdorferi* genotype predicts the capacity for hematogenous dissemination during early Lyme disease. J Infect Dis. 2008 Nov 1;198(9):1358-64.

*"... a distinct subset of just 4 of the 16 ospC genotypes identified were responsible for >80% of cases of early disseminated Lyme disease."*

(29) Crowder CD, Matthews HE, Schutzer S, Rounds MA, Luft BJ, Nolte O, Campbell SR, Phillipson CA, Li F, Sampath R, Ecker DJ, Eshoo MW. Genotypic variation and mixtures of Lyme *Borrelia* in Ixodes ticks from North America and Europe. PLoS One. 2010 May 14;5(5):e10650.

*"Human risk for the disease may be dependent on a complex interaction between environment and vector with transmission of the resultant bacterial genotypes an essential determinant of disease."*

*"Previous studies have shown that certain strains of B. burgdorferi are more likely to cause an erythema migrans and/or disseminate through the body. The ability to quickly identify the Borrelia species and associate particular genotypes with certain symptoms can have important patient-management implications. "*

*"These findings indicate genotype mixtures in ticks are common in both Europe and North America. ... Exposure to multiple Borrelia genotypes from a single tick bite may further increase the risk of disseminated Lyme disease."*

(30) Tijssse-Klasen E, Pandak N, Hengeveld P, Takumi K, Koopmans MP, Sprong H. Ability to cause erythema migrans differs between *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates. Parasit Vectors. 2013 Jan 22;6(1):23.

*"We identified a strong correlation of certain IGS and ospC types with formation of erythema migrans. This indicates that only a small subset of B. burgdorferi s.l. carried by ticks in the wild actually cause EM. Other genotypes either may be apathogenic for humans or may cause Lyme borreliosis without the typical first sign of infection. However, as we restricted our investigation to an early form of Lyme borreliosis, it cannot be excluded that other B. burgdorferi s.l. genospecies and genotypes, not associated with EM, might omit this early sign of Lyme borreliosis and still lead to disseminated infections."*