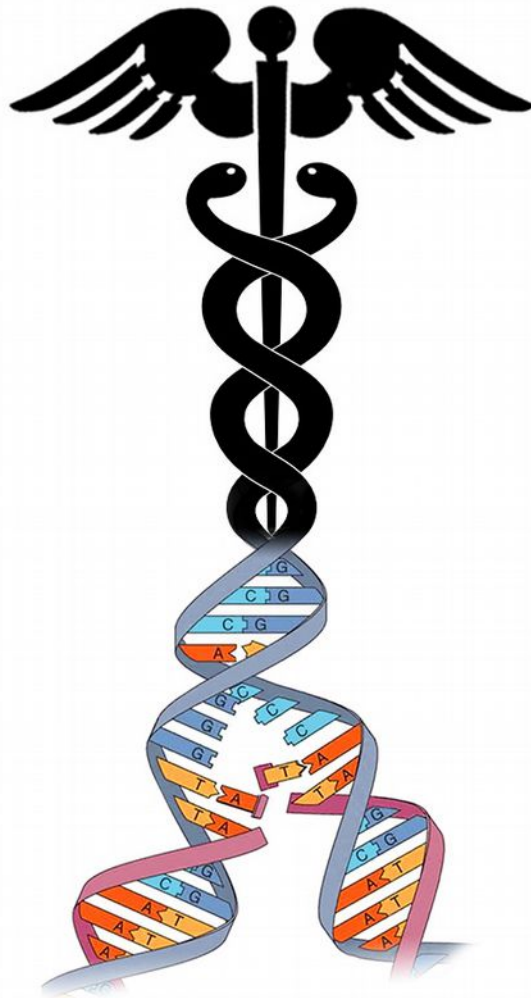


## Nieuwe Borrelia PCR tests

*door Niek Haak*

*april 2014*



**Afbeelding:**

*De Caduceus, twee slangen (spirocheten?) die zich om een gevleugelde staf draaien, wordt sinds de 19e eeuw met name in de VS vaak gebruikt als medisch symbool. In tegenstelling tot de staf van Asclepius (de Griekse god van de geneeskunde) is de Caduceus van oorsprong geen medisch symbool: het is de staf van Mercurius, de Romeinse god van handelaren, dieven en bedriegers. De verwisseling van deze twee goden is een teken aan de wand voor de huidige discussies over Lyme diagnostiek en behandeling ...*

*Bij het lezen van dit artikel wordt enige basiskennis van biochemie bekend verondersteld. Wanneer u niet weet wat DNA, RNA, PCR, DNA sequencing etc. is dan kunt u een toelichting vinden in o.a. Wikipedia.*

### **Lyme diagnostiek in de praktijk**

De diagnose Lyme wordt officieel gesteld op basis van 'kenmerkende klinische symptomen' en de kans op blootstelling aan een tekenbeet; laboratoriumtests worden als aanvullend gezien. In de praktijk werkt dat helaas slecht. Het meest kenmerkende Lyme symptoom, de EM, komt in zeker 50% van de gevallen helemaal niet voor, wordt niet gezien of heeft een zodanig afwijkende verschijningsvorm dat deze niet (h)erkend wordt. Veel andere symptomen kunnen behalve door *Borrelia* (Bb) ook door tekenbeet co-infecties of andere factoren veroorzaakt worden.

Ook mét een duidelijke EM is het nog maar de vraag of de patiënt erkend en behandeld wordt. Zo stelde IDSA voorman Wormser recent voor <sup>1</sup> om een antibiotica (AB) behandeling op basis van een EM alleen nog toe te laten in Amerikaanse staten waar volgens IDSA een aanzienlijk risico op tekenbeet bestaat. Bij 'laag risico' wordt in dit voorstel – ondanks EM – met behandeling gewacht tot de patiënt een positieve serologische test of duidelijke Lyme symptomen heeft. Deze methode zou volgens Wormser 'kostenbesparend werken'. Zijn collega Strle probeert in Europa de 'case definition' voor EM aan te scherpen <sup>2</sup> wat in de praktijk vergelijkbare gevolgen kan hebben: nog meer patiënten zullen niet (tijdig) behandeld worden. We geven toe dat dit wel een 'effectieve' methode is om het aantal officiële lymepatiënten flink omlaag te krijgen, dus scoren voor open doel voor de beleidsmakers. Tip voor CBO en Gezondheidsraad: misschien kan op basis van het 'kleine risico' na tekenbeet <sup>3</sup> de EM in Nederland ook geschrapt worden als voldoende reden voor de diagnose Lyme en bijbehorende AB behandeling? ;-(

### **Beperkingen van serologie**

Doordat symptomen en tekenbeet risico vaak geen uitsluitsel geven wordt in de praktijk blindgevaren op laboratoriumtests <sup>4</sup>. Vrijwel altijd zijn dat serologische tests, die de aanwezigheid van antilichamen tegen *Borrelia* in het bloed van de patiënt meten. Zulke tests zijn om diverse redenen onbetrouwbaar: gevoeligheid en specificiteit laten in de praktijk veel te wensen over en de conclusies van verschillende testkits komen regelmatig niet overeen. *Met het standaard tweestaps protocol wordt ongeveer 70% van de Bb besmettingen gemist* – wat de 'experts' overigens niet hindert om te verklaren dat de gevoeligheid van deze tests 'uitstekend' resp. 'bijna 100%' is <sup>5</sup>. Bij veel andere ziektes zou zo'n slechte gevoeligheid van een diagnostische test volstrekt onacceptabel zijn. Met name in de vroege fase scoort serologie slecht, terwijl

tijdige behandeling bij Lyme juist heel belangrijk is. Er is nog een ander probleem: serologische tests zijn *indirect*. Omdat als gevolg van de beperkende richtlijnen nauwelijks andere diagnostische tests (zoals PCR of microscopie) worden uitgevoerd is niet bekend hoeveel patiënten die met serologie negatief testen misschien toch met *Borrelia* besmet zijn, en hoeveel patiënten die positief testen met serologie niet langer besmet zijn met Bb maar alleen een 'doorgemaakte infectie' hebben. Die onzekerheid zorgt voor veel discussie over de behandeling van Lymeziekte zoals de vraag in hoeverre een korte antibiotica behandeling altijd 'afdoende' is bij Lyme. Bij onzekerheid over interpretatie van de test is de keus van medici al snel om niet te behandelen voor Lyme en een andere (fout-)diagnose te stellen.

We vatten de belangrijkste problemen van serologie even samen <sup>5</sup>:

- serologie is *onbruikbaar of zeer onbetrouwbaar in de eerste 3-6 weken na besmetting*, terwijl een snelle behandeling belangrijk is voor de herstelkansen.
- *slechte gevoeligheid in het algemeen*: steeds opnieuw blijkt dat de uitkomsten van serologie en andere tests slecht overeenkomen en serologie, ook in de latere fases van de ziekte, veel Lyme gevallen mist.
- veel serologische tests zijn onvoldoende afgestemd op *regionale Bb variaties en nieuwe Bb soorten*.
- serologie levert *geen of zeer beperkte informatie over de Bb soort*, informatie die van belang kan zijn voor diagnose, behandeling en epidemiologie.
- serologie is *indirect* en biedt geen mogelijkheid om na te gaan of een patiënt afdoende behandeld is.
- *co-infecties* komen vermoedelijk bij een aanzienlijk deel van de lymepatiënten voor en geven soms vergelijkbare symptomen. Voor detectie zijn aparte tests nodig die vanwege onvoldoende aandacht, kosten of gebrekkige kwaliteit van de beschikbare testen vaak achterwege blijven met als gevolg dat de behandeling niet optimaal is of zelfs helemaal uitblijft.

### **De belofte van PCR**

PCR, het aantonen van DNA van de *Borrelia* bacterie in weefsel of lichaamsvloeistof van de patiënt, kan in principe voor al de genoemde problemen een oplossing bieden. Dat zou een grote stap vooruit betekenen voor de Lyme diagnostiek, al zijn nog niet alle genoemde serologie problemen in één PCR test op te lossen. PCR tests worden al zeker 20 jaar als 'veelbelovend' gezien maar ze worden voor Lyme diagnostiek nog nauwelijks gebruikt; serologische tests blijven domineren. Dit is opmerkelijk gezien de zeer snelle vooruitgang van DNA technologie in de afgelopen twee decennia en de minimale vooruitgang bij Lyme serologie in dezelfde periode. Een belangrijk probleem van PCR was in het verleden vaak de beperkte *gevoeligheid* bij gebruik op lichaamsvloeistoffen zoals bloed en urine.

Bij een PCR test met weefsel (biopt) is de gevoeligheid geen probleem, maar dat is voor algemene screening van patiënten om praktische redenen niet bruikbaar. Met sommige recente PCR tests lijkt de gevoeligheid ook bij bloedmonsters niet langer een beperking, maar alleen al door gebrek aan vergelijkend onderzoek is het nog te vroeg om de traditionele serologie volledig door PCR te kunnen vervangen.

Een ander probleem bij PCR lymetests is *gebrek aan standaardisatie en certificatie*. IDSA, CBO en andere instanties die over Lyme diagnostiek adviseren hebben daarbij veel boter op hun hoofd vanwege hun negatieve houding t.a.v. PCR tests. Op dit moment is er géén algemeen erkende en gestandaardiseerde PCR test voor *Borrelia* verkrijgbaar. Niet alleen de PCR techniek zelf mist standaardisatie, hetzelfde geldt voor de voorbereiding van monsters en interpretatie van de testresultaten. Sommige PCR tests zijn in de praktijk nog onvoldoende gecontroleerd op specificiteit en op gevoeligheid voor de belangrijkste Bb sl soorten, laat staan nieuwe of minder bekende Bb soorten. Gevoeligheid, standaardisatie en interpretatie zijn bij serologie evengoed een probleem, maar desondanks worden die testen volop aangeraden en gebruikt...

De dominantie van serologie heeft vooral politieke en commerciële redenen. De patentrechten voor serologie berusten voor een belangrijk deel bij de IDSA leden of hun werkgevers die de diagnose en behandelrichtlijnen bepalen en die voorlopig dus weinig belang hebben bij andere, betere, testen. In Europa blijkt ook regelmatig dat nationale 'Lyme experts' hun eigen serologische tests adviseren of verplicht stellen via de richtlijnen, terwijl betere (en goedkopere) tests beschikbaar zijn. De patenten op en ervaring met Bb PCR tests zijn in handen van een meer diverse groep onderzoekers en bedrijven, overwegend van buiten de medische sector én vaker ook van buiten de VS. Maar ook bij de ontwikkeling van PCR tests werken commerciële belangen soms averechts. Vaak proberen onderzoekers ieder voor zich het wiel uit te vinden (en te patenteren) waardoor steeds nieuwe, onvoldoende gevalideerde, PCR testen / procedures beschikbaar komen die uiteindelijk weinig gebruikt worden en dus duur en ongevalideerd blijven – als ze al officieel beschikbaar komen voor diagnostiek. Dat speelt de Lyme serologie lobby in de kaart. Er zijn een aantal technische problemen bij gebruik van PCR maar die zijn met wat inspanning en goede wil zeker te overwinnen.

### **PCR basisprincipes**

Een volledige uitleg van de PCR techniek zou te ver voeren, dus we stippen hier alleen wat zaken aan die voor Lyme diagnostiek belangrijk zijn. Zie voor een nadere bespreking van de principes, mogelijkheden en beperkingen van PCR lymetests het overzichtsartikel van Nolte<sup>6</sup>. Bij een PCR lymetest probeert men een

kenmerkende DNA sequentie van de *Borrelia* bacterie te detecteren, waarbij de minieme hoeveelheden DNA in het monster via de PCR kettingreactie sterk verhoogd worden. Bij *Borrelia* is die kenmerkende DNA sequentie meestal een deel van het 16S rDNA gen, de erfelijke code voor de eiwitfabriek van de bacterie. Dit deel van het DNA is altijd aanwezig en relatief stabiel; het verandert nauwelijks in de loop van de tijd en is dus kenmerkend voor de bacteriesoort. Tegelijk bevat het 16S rDNA gen ook stukjes die sterk variëren tussen verschillende Bb stammen en die zo een nauwkeurige identificatie van de Bb soort mogelijk maken. Dit kan helpen bij diagnose en behandeling omdat het ziektebeeld en de prognose kunnen variëren afhankelijk van de Bb versie. Net als bij serologische tests is het belangrijk dat de detectie zeer specifiek is, en dat dus niet bijvoorbeeld het 16S rDNA van een andere bacterie per ongeluk wordt aangezien voor Bb DNA ('fout-positief'). Bij het ontwerp van de PCR test wordt hiermee als het goed is rekening gehouden. De specificiteit is bij sommige recente PCR tests ook achteraf te controleren door zgn. DNA sequencing bij een positieve uitkomst. Sequencing biedt ook een goede controle op eventuele fout-positieven door verontreiniging (slechte lab procedures).

Een belangrijk voordeel van het 16S rDNA is dat de DNA volgorde daarvan al voor veel *Borrelia* stammen, en talloze andere bacteriesoorten, bepaald is. Behalve 16S rDNA en de enigszins vergelijkbare 5S-23S rDNA spacer worden nog diverse andere 'targets' gebruikt bij Bb PCR tests. Daaraan kleven soms grotere risico's voor het ontstaan van zowel fout-positieve als fout-negatieve uitslagen. Zo blijkt een oudere PCR test gebaseerd op het Bb OspA (een gen dat zich op een plasmide bevindt) te reageren met DNA van diverse andere bacteriën én met menselijk DNA (enigszins vergelijkbaar met de 'kruisreacties' bij serologie), terwijl sommige relevante *Borrelia* soorten juist niet of slecht gedetecteerd worden. Bovendien maken al deze verschillende PCR 'targets' de onderlinge vergelijking van uitkomsten van PCR lymetests moeilijk, waardoor arts en patiënt niet goed weten waar ze aan toe zijn.

Een punt van discussie is welke soorten gedetecteerd moeten worden door een PCR lymetest, omdat niet van alle *Borrelia* soorten duidelijk is of ze Lyme kunnen veroorzaken. Zo beschouwen sommige 'experts' het aantonen van *Borrelia miyamotoi* als een geval van 'fout-positief' omdat deze soort niet bij de Bb sl groep hoort (de groep *Borrelia*'s die officieel Lyme veroorzaakt) en volgens hen niet is aangetoond dat deze soort pathogeen is. Dat mensen in Rusland massaal ziek worden van *B. miyamotoi*<sup>7</sup> is in die opvatting blijkbaar niet relevant ... De juiste keus lijkt ons wél detecteren én vermelden om welke *Borrelia* (sub)species het gaat of in ieder geval welke soorten wel of niet worden aangetoond met de test.

Een vergelijkbare discussie zien we bij diverse recent via PCR aangetoonde *Borrelia* soorten in Noord-, Midden- en Zuid-Amerika waarvan is vastgesteld of aannemelijk is dat ze ziekte kunnen veroorzaken bij mensen, maar die volgens IDSA in de betreffende regio's 'niet kunnen voorkomen', geen EM veroorzaken of niet aangetoond worden met standaard serologische tests en 'dus' volgens IDSA 'fout-positieven' moeten zijn. De opinie van de 'Lyme experts' blijkt steeds opnieuw belangrijker dan de feiten.

### **Wat betekent een positieve PCR uitslag?**

PCR is een *directe* test, een positieve uitslag betekent dat er DNA van *Borrelia* is gevonden en dus dat er sprake is (of dat er recent sprake was) van een *Borrelia* besmetting. Een belangrijke hindernis voor PCR tests is de opvatting van IDSA voorman Wormser en zijn ideologische aanhangers hier in Nederland dat 'een positieve PCR uitslag bij negatieve serologie bijna per definitie fout-positief is'<sup>8</sup> respectievelijk 'een positieve PCR is geen bewijs voor actieve infectie', de 'Amber theorie'<sup>9</sup>. Volgens andere onderzoekers is een positieve PCR uitslag juist wel heel belangrijk, zie o.a. het artikel 'Dood of levend?' op de STZ website<sup>10</sup>.

Het is bizar hoe men in IDSA kring bij een stealth pathogeen zoals *Borrelia*, die op allerlei manieren de afweer ontduikt en manipuleert, blindvaart op *indirecte* detectie via diezelfde afweer (met alle fundamentele beperkingen van dien) en *directe* detectie zoals met PCR tests op allerlei manieren ongeldig probeert te verklaren; dit is echt de omgekeerde wereld!

Feit is dat bij lymepatiënten na afloop van een AB kuur er met een gevoelige PCR test soms nog maandenlang *Borrelia* DNA aangetoond kan worden in bloed of urine, terwijl de patiënt zich dan al stukken beter voelt. Volgens IDSA aanhangers gaat het bij het gevonden DNA dan om '*bacterial debris*', dood of in ieder geval ongevaarlijk Bb materiaal<sup>10-12</sup>. Dit standpunt baseert men vooral op het feit dat er na een AB kuur meestal geen kweek van Bb's uit het bloed van de patiënt meer mogelijk is. Maar we weten al dat kweek bij *Borrelia* een onbetrouwbare test is... Normaal wordt het DNA van een dode bacterie snel (binnen uren tot dagen) uit het lichaam verwijderd. Dat er na een AB kuur soms nog maandenlang Bb DNA aantoonbaar is maakt het onwaarschijnlijk dat alle Bb's dood zijn. Aannemelijk is eerder dat de Bb's die na een AB kuur overblijven niet 'dood' zijn maar afwijkende eigenschappen hebben – waardoor ze met kweek of normale serologie niet goed aantoonbaar zijn – maar dat ze (later) wél nieuwe klachten kunnen veroorzaken. Daarvoor zijn uit dierproeven<sup>13</sup> maar ook op basis van de ervaring van lymepatiënten sterke aanwijzingen.

Bovendien is het '*bacterial debris*' argument niet van toepassing op gevallen waarbij de PCR test positief is en serologie negatief vóórdat de patiënt met antibiotica behandeld is, iets wat ook regelmatig voorkomt.

Deze discussie zou theoretisch te beslechten zijn door geen DNA maar RNA van *Borrelia* te detecteren. RNA heeft een zeer korte levensduur en de aanwezigheid daarvan wordt algemeen geaccepteerd als bewijs voor activiteit, een levend organisme. In een recente studie werd bij proefdieren een jaar na antibiotica kuur nog Bb mRNA activiteit gemeten<sup>13</sup>, een sterke aanwijzing dat sommige Bb's de AB kuur overleven. Anderzijds stellen IDSA onderzoekers op basis van een *in vitro* studie dat Bb RNA activiteit *niet* bewijst dat er sprake is van levende *Borrelia*'s en dat we moeten vertrouwen op serologie en culture tests<sup>12</sup>. Eventueel na een AB kuur nog resterende Bb's zouden ongevaarlijk zijn en geen verklaring vormen voor persistente klachten. Kortom, PCR wordt systematisch irrelevant verklaard zodra de resultaten niet stroken met de IDSA dogma's. Er is tenslotte niks pijnlijkers voor 'Lyme experts' dan toegeven dat ze het helemaal fout hadden, dus dat zal nooit gebeuren. Deze discussie draait om politieke en privé belangen en heeft weinig met wetenschap of diagnostiek te maken.

*Het vervolg van dit artikel betreft enkele recente publicaties over detectie van *Borrelia* met PCR of verwante technieken. Aan xenodiagnose in combinatie met PCR zullen zal binnenkort apart aandacht besteed worden. Het is niet de bedoeling hier alle nieuwe onderzoeken te noemen, maar om te laten zien dat er verbeteringen mogelijk zijn de bij Lyme diagnostiek.*

### **Nested PCR met DNA sequencing**

Lee<sup>14</sup> vergeleek de standaard serologie met een door het lab van de auteur ontwikkelde gevoelige *Borrelia* PCR test die is gebaseerd op nested PCR plus DNA sequencing. Nested PCR is gevoeliger dan de traditionele PCR tests, maar ook gevoeliger voor verontreiniging. De sequencing bij een positieve uitkomst is een goede controle op fout-positieven en levert bovendien informatie over de exacte *Borrelia* soort. In eerder onderzoek van Lee<sup>15</sup> werd gevonden dat het standaard tweestaps protocol in de vroegste fase van Lyme maar liefst 85% van de besmettingen mist vergeleken met deze PCR test. De PCR test bleek alleen kort na besmetting gevoelig, omdat er alleen dan relatief veel spirocheten in het bloed aanwezig zijn. Ook Russische onderzoekers stellen dat kort na Bb besmetting hun PCR test een hoge gevoeligheid heeft. Lastiger is de situatie bij patiënten die zich pas later melden met onvoldoende kenmerkende klachten, en patiënten waarbij niet bekend is of / wanneer er sprake was van een tekenbeet. In zijn nieuwe publicatie<sup>14</sup> zijn het tweestaps protocol en een verbeterde versie van de test vergeleken op basis van bloedmonsters afkomstig van de Amerikaanse CDC: van patiënten met mogelijke Lyme besmetting (volgens CDC criteria dus met EM en kenmerkende symptomen), behandelde lymepatiënten en een controle groep. Daarbij bleek dat serologie en PCR regelmatig in tegenspraak zijn.

Zo werd met deze PCR test *Borrelia* aangetoond bij diverse patiënten die op basis van serologie 'dubieus' of 'negatief' waren; in één geval ging het daarbij om een nieuwe nog onbekende *Borrelia* soort. Anderzijds werd bij de meeste patiënten met positieve serologie na een AB behandeling via de PCR test géén *Borrelia* gevonden. Bij dit onderzoek werden 'referentie sera' gebruikt; het is te verwachten dat de tegenspraak tussen serologie en PCR in de dagelijkse praktijk nog groter is, want 'dubieuze gevallen' komen meestal niet in een verzameling referentie sera terecht.

Samenvattend kan gesteld worden dat deze test een prima aanvulling op de gewone serologie kan zijn, met name als kort na een tekenbeet de eerste klachten ontstaan of voor patiënten met dubieuze serologie. Maar de test lijkt onvoldoende gevoelig om te gebruiken als (enige) screeningstest voor *Borrelia* infecties, mede gezien de kosten. Deze PCR test is in de VS inmiddels commercieel beschikbaar en kost \$150, wat voor Amerikaanse begrippen een redelijk bedrag is mede gezien de extra informatie die de test oplevert (Bb soort). Vermoedelijk kunnen de kosten flink omlaag als zo'n test meer gebruikt zou worden. In Nederland beschikbare *Borrelia* PCR testen worden meestal ook als 'aanvullend' gezien voor diagnose van bloedmonsters. Het zou wenselijk zijn dat meer laboratoria dergelijke vergelijkende testen publiceren van hun eigen PCR en standaard serologie, zodat een beter beeld ontstaat van de prestaties van de PCR test én van de beperkingen van serologie.

### Nieuwe 'culture' test

Sapi et al <sup>16</sup> beschreven begin 2013 in een research artikel een nieuwe kweekmethode voor *Borrelia* die de diagnose zou kunnen verbeteren. Na een aantal weken kweken worden aanwezige *Borrelia*'s aangetoond via een antilichamen test en PCR; de kweek moet hierbij de gevoeligheid van de uiteindelijk gebruikte detectie methode verhogen. De hoge gevoeligheid die de onderzoekers melden – 94% bij hun patiënten met chronische Lyme, in plaats van hooguit 10-20% voor gangbare kweekmethodes - lijkt te mooi om waar te zijn, mede omdat inmiddels duidelijk is dat diverse Bb stammen en levensvormen niet of moeilijk te kweken zijn (zoals de persistente spirochetes die reesteren na een AB kuur <sup>13</sup>). Het artikel dient als wetenschappelijke basis voor een dure (\$600-\$1000) lymetest die sinds 2012 door ALS, een bedrijf gelieerd aan ILADS arts Burrascano, wordt aangeboden.

In een kritisch artikel <sup>17</sup> komen CDC onderzoekers tot de conclusie dat er veel aan het onderzoek mankeert, zo ontbreken relevante gegevens over de patiënten en diverse noodzakelijke controles. Bij analyse van de PCR resultaten van Sapi lijkt een grote meerderheid van de Amerikaanse patiënten besmet met vrijwel dezelfde *Borrelia* varianten die in de VS bovendien (vrijwel) niet voorkomen.

De CDC onderzoekers denken dat er sprake was van verontreiniging bij de procedure wat tevens de 'hoge gevoeligheid' zou verklaren. Dit betekent niet dat de kweekmethode of de test niet deugt, wél dat de conclusies van Sapi op losse schroeven komen te staan en de diagnostische waarde van de test dubieus is. In kringen van lymepatiënten werd veelal furieus op het kritische CDC artikel gereageerd, maar de kritiek lijkt in grote lijnen terecht. ALS meldde op hun website dat ze met een reactie op het artikel zouden komen, maar een ruim half jaar later is die reactie er nog steeds niet.

### Multiplex-PCR

De afgelopen jaren is duidelijk geworden dat er bij tekenbeten regelmatig sprake is van co-infecties of mix-infecties (besmetting met meerdere Bb varianten). Een test die tegelijk de bekendste Bb soorten en tekenbeet co-infecties kan detecteren zou zeer nuttig zijn want zo worden kosten en tijd bespaard en ontstaat een beter beeld van de situatie. Dit kan o.a. met een zgn. **multiplex-PCR**, waarbij niet naar één specifieke DNA sequentie maar naar DNA sequenties van meerdere organismen tegelijk gezocht wordt. Chan <sup>18</sup> beschrijft in een research artikel van eind 2013 een nieuwe multiplex PCR test voor *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti* en *Anaplasma phagocytophilum*, tekenbeet (co-)infecties die in de VS veel problemen veroorzaken en in opkomst zijn. Deze pathogenen vertonen een overlap in de gebruikte gastheren, verspreidingsgebied en symptomen wat het nuttig maakt de diagnostiek te combineren. Bij detectie van Bb kan later onderscheid gemaakt worden tussen de belangrijkste drie soorten (Bb ss, *B. garinii*, *B. afzelii*). Met een kleine aanpassing zou bijv. ook *B. miyamotoi* of een door teken overgebracht virus gedetecteerd kunnen worden. De methode lijkt zeer gevoelig (detectiegrens minder dan 10 Bb's per ml bloed) en zou in zowel de vroege als chronische fase van Lyme en voor de genoemde co-infecties geschikt zijn. De methode moet nog getest worden met bloedmonsters van patiënten, waar aan gewerkt wordt. Omdat met name Babesiose ook voor bloedbanken een probleem is zou de test ook daar gebruikt kunnen worden voor screening. In Nederland lijken *Babesia* en *Anaplasma* nog geen belangrijk probleem maar dat kan in de toekomst veranderen. De auteurs hebben patenten op een deel van de gebruikte multiplex PCR techniek en ze verdienen dus aan een eventuele invoering.

Kort na het artikel van Chan verscheen een kort artikel van onderzoekers van de Amerikaanse CDC over een andere multiplex PCR test voor dezelfde pathogenen <sup>19</sup>. Deze test lijkt echter niet afgestemd op de 'Europese' Bb soorten en werd alleen getest met besmette teken, en niet met bloedmonsters, de evaluatie is minder ver gevorderd. De eerste resultaten lijken in grote lijnen vergelijkbaar met de multiplex PCR van Chan c.s.: het is mogelijk om 4-5 verschillende tekenbeet infecties

tegelijk te detecteren met hoge gevoeligheid, zonder dat een dominante aanwezigheid van één van de pathogenen resp. van menselijk DNA de detectie verstoort. De onderzoekers prijzen de techniek aan als 'snel en goedkoop'. Al met al is er flinke overlap met de andere multiplex PCR test, een vergelijking van de kwaliteiten en beperkingen van deze testen is helaas nog nergens te vinden. Voor beide tests is behalve een evaluatie met bloedmonsters van tekenbeet patiënten een aanpassing aan de Europese situatie wenselijk.

### Andere directe technieken

Met een zgn. **DNA micro-array** in combinatie met qPCR kan een groot aantal monsters in korte tijd gescreend worden op aanwezigheid van veel verschillende micro-organismen<sup>20</sup>. Deze techniek wordt inmiddels door diverse research labs toegepast en zou o.a. geschikt zijn voor screening van teken op co-infecties, maar voor betrouwbare diagnose van bloedmonsters van menselijke patiënten lijkt de techniek nog onvoldoende gevoelig. De door de onderzoekers ontwikkelde micro-array kan tegelijk Borrelia, Anaplasma, Francisella, Rickettsia en Coxiella soorten en Candidatus N. mikurensis detecteren, allemaal op basis van de 16S rDNA sequenties van deze organismen. Teken kunnen honderden verschillende micro-organismen bevatten, die lang niet allemaal ziekte veroorzaken; om na te gaan of een gevonden soort ook ziekte veroorzaakt zal meestal nog aanvullend onderzoek nodig zijn.

Enigszins vergelijkbaar maar technisch wat verder gevorderd en gevoeliger is detectie van DNA van Borrelia en tekenbeet co-infecties op basis van **massa-spectrometrie**, zoals PCR/ESI-MS en MALDI-TOF-MS. PCR/ESI-MS is ontwikkeld voor militair gebruik (detectie van gebruik van biowapens) waarbij in korte tijd op zoveel mogelijk pathogenen gescreend moet worden en hoge gevoeligheid minder belangrijk is. Een belangrijk verschil met andere methodes zoals de gangbare PCR tests is dat hier door de militaire belangen veel geld beschikbaar is, en dat gevestigde medische en commerciële belangen minder een rol spelen. Een nadeel is de mogelijkheid van militaire invloed op gebruik van de diagnostische techniek en dat de benodigde apparatuur relatief duur is en daarom niet in kleinere labs voorhanden zal zijn.

Eshoo c.s.<sup>21</sup> beschrijven de diagnose mogelijkheden voor Lyme, beginnend met de beperkingen van de traditionele methodes serologie en kweek. Vervolgens worden directe detectiemethodes besproken met daarbij de nadruk op **PCR/ESI-MS**, een variant op PCR die het mogelijk maakt om tegelijk verschillende pathogenen, bijvoorbeeld diverse Borrelia versies en co-infecties, te detecteren. Met deze methode is wél de Borrelia soort maar niet de exacte DNA sequentie te bepalen (wat met sommige recente Borrelia PCR tests

wél kan). Een voordeel is dat deze methode ook verwante maar nog niet eerder beschreven pathogenen kan aantonen. De techniek lijkt in de vroege fase van Lyme voor analyse van bloedmonsters gevoeliger dan conventionele PCR en potentieel een alternatief voor serologie, maar over de absolute gevoeligheid (ook vergeleken met serologie) is nog geen uitspraak te doen. Men hoopt in de toekomst de gevoeligheid nog verder te verhogen. De voor deze test benodigde apparatuur wordt geleverd door het bedrijf waar de onderzoekers werken. Opvallend is dat de auteurs aanstippen dat PCR ter discussie staat omdat detectie van Borrelia DNA geen bewijs voor actieve infectie zou zijn. Vervolgens wringen ze zich in allerlei bochten om aannemelijk te maken dat detectie van Borrelia DNA met hun eigen methode wél een indicatie is voor actieve infectie. Moeten we het Amber-sprookje van IDSA<sup>9-11</sup> nu wel of niet serieus nemen?

Een enigszins vergelijkbare techniek is **MALDI-TOF MS**<sup>22</sup>. Een groot aantal verschillende Borrelia soorten en co-infecties kunnen hiermee tegelijk gedetecteerd worden in een snelle, simpele en relatief goedkope procedure. De onderzoekers noemen epidemiologie (bijv. monitoring van de besmetting van teken) en diagnostiek als toepassing, maar er is nog niet getest met echte bloedmonsters van patiënten en voor deze toepassing lijkt de gevoeligheid nog te laag.

### Slotwoord

Een PCR test voor Borrelia kan belangrijke voordelen bieden vergeleken met traditionele serologie: diagnose is soms in een zeer vroeg stadium mogelijk, afwijkende Borrelia varianten en co-infecties kunnen tegelijk ook gedetecteerd worden. Er is (nog) geen PCR test die de genoemde voordelen combineert, voorlopig moet dus afhankelijk van de situatie gekeken worden welke test het meest geschikt is. Een gevoelige *directe detectie* kan de eindeloze discussie die we van serologie kennen voorkomen – als de 'Lyme experts' en beleidsmakers ten minste hun oogkleppen af willen doen. Het grote probleem bij PCR zit niet in de beschikbare techniek, maar in het gebrek aan standaardisatie / validatie en regelgeving die vernieuwing tegenhoudt. PCR zou op zijn minst al een goede aanvulling zijn op serologie o.a. kort na besmetting wanneer de eerste symptomen optreden (en serologie onbruikbaar is), als een soort 'second opinion' wanneer symptomen en serologie dubieuze conclusies opleveren en bij vermoeden van co-infecties. Overigens zijn de nog vrij hoge kosten van PCR vergeleken met bijvoorbeeld een Elisa test ook een hindernis voor gebruik bij algemene screening van tekenbeet slachtoffers. Aan PCR gerelateerde directe detectietechnieken kunnen helpen een beter zicht te krijgen op de verspreiding van Borrelia en co-infecties in teken en op wat langere termijn, mede dankzij lagere kosten, wellicht ook een belangrijke bijdrage leveren aan de Lyme diagnostiek.

## Referenties

1. Lantos PM, Brinkerhoff RJ, Wormser GP, Clemen R. Empiric antibiotic treatment of erythema migrans-like skin lesions as a function of geography: a clinical and cost effectiveness modeling study. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013 Dec;13(12):877-83. PMID: 24107201
2. Strle F, Lusa L, Ružić-Sabljić E, Maraspin V, Lotrič Furlan S, Cimperman J, Ogrinc K, Rojko T, Videčnik Zorman J, Stupica D. Clinical characteristics associated with *Borrelia burgdorferi* sensu lato skin culture results in patients with erythema migrans. *PLoS One.* 2013 Dec 26;8(12):e82132. PMID: 24386087
3. Tijssen-Klasen E, Jacobs JJ, Swart A, Fonville M, Reimerink JH, Brandenburg AH, van der Giessen JW, Hoffhuis A, Sprong H. Small risk of developing symptomatic tick-borne diseases following a tick bite in The Netherlands. *Parasit Vectors.* 2011 Feb 10;4:17. PMID: 21310036
4. Haak N. Waarom is er geen betrouwbare test voor de ziekte van Lyme? 2010. <http://www.tekenbeetziekten.nl/artikelen/>
5. Haak N. Commentaar op artikelen van het Consensusberaad Lyme Laboratorium Diagnostiek 2013. <http://www.tekenbeetziekten.nl/artikelen/>
6. Nolte O. Nucleic Acid Amplification Based Diagnostic of Lyme (Neuro-)borreliosis - Lost in the Jungle of Methods, Targets, and Assays? *Open Neurol J.* 2012;6:129-39. PMID: 23230454
7. Sarksyan DS, Platonov AE, Karan LS, Malinin IE, Khalitova LI, Shakhov VI, Dudarev MV, Malinin OV, Maleev VV. Clinical presentation of "new" tick-borne borreliosis caused by *Borrelia miyamotoi*. *Ter Arkh.* 2012;84(11):34-41. Russian. PMID: 23252245
8. Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin Microbiol Rev.* 2005 Jul;18(3):484-509. PMID: 16020686
9. Wormser GP, Nadelman RB, Schwartz I. The amber theory of Lyme arthritis: initial description and clinical implications. *Clin Rheumatol.* 2012 Jun;31(6):989-94. PMID: 22411576
10. Haak N. Dood of Levend? 2014. <http://www.tekenbeetziekten.nl/dood-of-levend/>
11. Bockenstedt LK, Gonzalez DG, Haberman AM, Belperron AA. Spirochete antigens persist near cartilage after murine Lyme borreliosis therapy. *J Clin Invest.* 2012 July 2; 122(7): 2652–2660. PMID: PMC3386809
12. Iyer R, Mukherjee P, Wang K, Simons J, Wormser GP, Schwartz I. Detection of *Borrelia burgdorferi* Nucleic Acids after Antibiotic Treatment Does Not Confirm Viability. *J Clin Microbiol.* 2013 March; 51(3): 857–862. PMID: PMC3592055
13. Hodzic E, Imai D, Feng S, Barthold SW. Resurgence of persisting non-cultivable *Borrelia burgdorferi* following antibiotic treatment in mice. *PLoS One.* 2014 Jan 23;9(1):e86907. PMID: 24466286
14. Lee SH, Vigliotti JS, Vigliotti VS, Jones W, Shearer DM. Detection of borreliae in archived sera from patients with clinically suspect Lyme disease. *Int J Mol Sci.* 2014 Mar 11;15(3):4284-98. PMID: 24619223
15. Lee SH, Vigliotti VS, Vigliotti JS, Jones W, Williams J, Walshon J. Early Lyme disease with spirochetemia - diagnosed by DNA sequencing. *BMC Res Notes.* 2010 Nov 1;3:273. PMID: 21040573
16. Sapi E, Pabbati N, Datar A, Davies EM, Rattelle A, Kuo BA. Improved culture conditions for the growth and detection of *Borrelia* from human serum. *Int J Med Sci.* 2013;10(4):362-76. PMID: 23470960
17. Johnson BJ, Pilgard MA, Russell TM. Assessment of new culture method for detection of borrelia species from serum of Lyme disease patients. *J Clin Microbiol.* 2014 Mar;52(3):721-4. PMID: 23946519
18. Chan K, Marras SA, Parveen N. Sensitive multiplex PCR assay to differentiate Lyme spirochetes and emerging pathogens *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti*. *BMC Microbiol.* 2013 Dec 20;13:295. PMID: 24359556
19. Hojgaard A, Lukacik G, Piesman J. Detection of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti*, with two different multiplex PCR assays. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014 Jan 18. pii: S1877-959X(14)00005-3. PMID: 24507434
20. Melničáková J, Derdáková M, Barák I. A system to simultaneously detect tick-borne pathogens based on the variability of the 16S ribosomal genes. *Parasit Vectors.* 2013 Sep 18;6:269. PMID: 24330462
21. Eshoo MW, Schutzer SE, Crowder CD, Carolan HE, Ecker DJ. Achieving molecular diagnostics for Lyme disease. *Expert Rev Mol Diagn.* 2013 Nov;13(8):875-83. PMID: 24151851
22. Calderaro A, Gorrini C, Piccolo G, Montecchini S, Buttrini M, Rossi S, Piergianni M, Arcangeletti MC, De Conto F, Chezzi C, Medici MC. Identification of *Borrelia* Species after Creation of an In-House MALDI-TOF MS Database. *PLoS One.* 2014 Feb 12;9(2):e88895. PMID: 24533160