

Geen onderscheid tussen actieve Lyme-neuroborreliose en Lyme-borreliose uit het verleden met cellulaire ELISpot-test

No discrimination between active Lyme neuroborreliosis from past Lyme borreliosis with in-house ELISpot assay

Ing. T. van Gorkom^{1,2}, drs. W. Voet³, dr. S.U.C. Sankatsing⁴, dr. K. Kremer², dr. S.F.T. Thijsen¹

Dit artikel is een bewerking van Van Gorkom T, Sankatsing SUC, Voet W, et al. An enzyme-linked immunosorbent spot assay measuring Borrelia burgdorferi B31-specific interferon gamma-secreting T cells cannot discriminate active lyme neuroborreliosis from past lyme borreliosis: a prospective study in the Netherlands. J Clin Microbiol 2018;56:pji: e01695-17.

SAMENVATTING

De diagnostiek van Lyme-borreliose (LB) is gebaseerd op het aantonen van *Borrelia*-specifieke antistoffen, maar een positieve testuitslag is geen bewijs voor actieve ziekte. Om actieve LB te kunnen vaststellen is betere diagnostiek nodig. Recentelijk zijn testen ontwikkeld die de activiteit van het cellulaire immuunsysteem meten, maar de klinische validatie van dergelijke testen bij goed gedefinieerde patiëntengroepen ontbreekt. Deze prospectieve studie beschrijft de validatie van een 'enzyme-linked immunosorbent spot'- (ELISpot-) test voor de diagnose van een actieve Lyme-neuroborreliose. De studie toont aan dat de *Borrelia*-ELISpot-test correleert met blootstelling aan de *Borrelia*-bacterie, maar niet kan worden gebruikt voor de diagnose van een actieve Lyme-neuroborreliose.

(TIJDSCHR INFECT 2019;14(3):89-95)

SUMMARY

Diagnosis of Lyme borreliosis (LB) is based on the detection of *Borrelia*-specific antibodies. However, a positive testresult is no proof of active disease. To establish a diagnosis of active LB, better diagnostic tests are needed. Recently, assays that measure the activity of the cellular immune system have become available, but studies evaluating the utility of these assays on well-defined patient populations are lacking. The current prospective study describes the utility of an enzyme-linked immunosorbent spot (ELISpot) assay to diagnose active Lyme neuroborreliosis. The data shows that the *Borrelia* ELISpot assay correlates with exposure to the *Borrelia* bacterium, but is not useful for the diagnosis of active Lyme neuroborreliosis.

¹onderzoeker, afdeling Medische Microbiologie en Immunologie, Diaconessenhuis, Utrecht, ²onderzoeker, Centrum Infectieziekteonderzoek, Diagnostiek en laboratorium Surveillance, Centrum Infectieziektebestrijding, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Bilthoven, ³neuroloog, afdeling Neurologie, ⁴internist-infectioloog, afdeling Interne Geneeskunde, Diaconessenhuis, Utrecht.

Correspondentie richten aan: Dhr. dr. S.F.T. Thijsen, arts-microbioloog, afdeling Medische Microbiologie en Immunologie, Diaconessenhuis, Bosboomstraat 1, 3582 KE Utrecht, tel.: 088 250 50 00, e-mailadres: sthijsen@diakhuis.nl

Belangenconflict/financiële ondersteuning: geen gemeld.

Trefwoorden: actieve ziekte, antistoffen, *Borrelia burgdorferi*, cellulair immuunsysteem, diagnostiek, ELISpot-test, interferon-gamma, Lyme-borreliose, Lyme-neuroborreliose, T-celactivatie.

Keywords: active disease, antibodies, *Borrelia burgdorferi*, cellular immune system, diagnostics, ELISpot, interferon gamma, Lyme borreliosis, Lyme neuroborreliosis, T-cell activation.

ONTVANGEN 8 AUGUSTUS 2018, GEACCEPTTEERD 27 SEPTEMBER 2018.

INLEIDING

Een recente studie onder huisartsen in Nederland toonde aan dat in 2017 ongeveer 148 per 100.000 inwoners, omgerekend ongeveer 25.500 mensen, de diagnose erythema migrans (EM) hadden: een rode huidafwijking rondom de plek van een tekenbeet. Dit aantal is een viervoudige stijging ten opzichte van 1994, toen het aantal gevallen van EM werd geschat op 39 per 100.000 inwoners. Het aantal gevallen van gedissemineerde Lyme-borreliose (LB) werd in 2017 geschat op ongeveer 1.500 patiënten.^{1,2} De diagnose van LB hangt af van de klinische manifestatie en kan soms lastig zijn vanwege het ontbreken van een gouden standaard, zoals kweek of PCR. Een kweek is alleen zinvol bij huidmanifestaties zoals EM of acrodermatitis chronica atrophicans, maar wordt niet geadviseerd vanwege de wisselende gevoeligheid en de lange duur. Hierdoor is EM vooral een klinische diagnose.^{3,5} PCR is met name zinvol bij huidmanifestaties en Lyme-artritis.^{4,6} Bij Lyme-neuroborreliose hebben kweek en PCR een wisselende gevoeligheid en beide methoden zijn met name zinvol bij vroege manifestaties van Lyme-neuroborreliose.^{4,6-9} De diagnose wordt in de meeste gevallen echter gesteld op basis van de klinische presentatie, de aanwezigheid van een verhoogd aantal leukocyten in de liquor (pleiocytose: ≥ 5 leukocyten/ μl) en/of de detectie van intrathecaal geproduceerde antistoffen tegen *Borrelia*.⁸⁻¹²

De interpretatie van de beschikbare antistoftesten voor LB is lastig, omdat een testuitslag niet altijd doorslaggevend is voor de diagnose. Een positieve testuitslag kan wijzen op een actieve LB, maar ook op persisterende antistoffen na een behandelde of geklaarde LB.¹³ Een negatieve testuitslag kan betekenen dat iemand niet is blootgesteld aan de *Borrelia*-bacterie, maar ook dat het lichaam nog niet voldoende tijd heeft gehad om antistoffen te produceren.¹⁴ Omdat een vroege en juiste diagnose van Lyme-neuroborreliose van belang is voor een adequate antibioticabehandeling, zijn testen nodig voor de diagnostiek, die onderscheid kunnen maken tussen een actieve en een eerder behandelde of geklaarde infectie.¹⁵⁻¹⁷

Recentelijk zijn verschillende studies gepubliceerd, waarbij met zogenoemde cellulaire testen een verhoogde productie van interferon-gamma (IFN- γ) door door *Borrelia* geactiveerde T-cellen werd gemeten bij LB-patiënten.¹⁸⁻²⁰ Het ontbreekt in deze studies echter aan bewijs voor de bruikbaarheid van dergelijke testen voor de diagnostiek van LB in de kliniek.^{21,22} Om meer inzicht te verkrijgen in de waarde van cellulaire testen voor de diagnostiek van LB is de hier besproken studie uitgevoerd, waarbij patiënten met een actieve Lyme-neuroborreliose werden gebruikt als een proxy-indicator voor een actieve LB. Met een gestandaardiseerd platform voor een 'enzyme-linked immunosorbent

spot'- (ELISpot-) test en goed gedefinieerde studiegroepen, bestaande uit (on)behandelde patiënten en gezonde vrijwilligers, werd onderzocht of het aantal *Borrelia*-specifieke IFN- γ -producerende T-cellen gebruikt kan worden als een marker voor ziekteactiviteit.

MATERIAAL EN METHODE

STUDIEGROEPEN

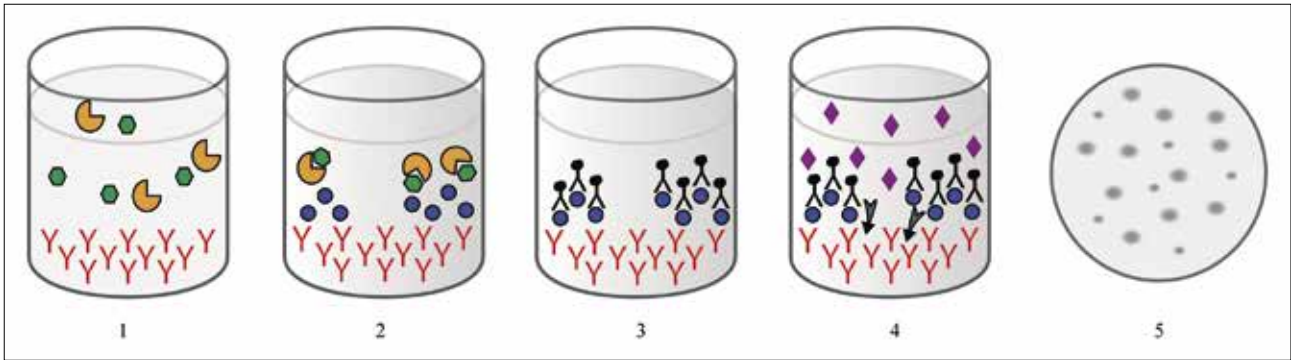
Bloedmonsters werden afgenomen bij ziekenhuispatiënten met de diagnose actieve Lyme-neuroborreliose, ziekenhuispatiënten die in het verleden zijn behandeld voor Lyme-neuroborreliose, en gezonde vrijwilligers (18 jaar of ouder). Alle patiënten die in het Diakonessenhuis in Utrecht en/of het St. Antonius Ziekenhuis in Nieuwegein waren gediagnosticeerd met Lyme-neuroborreliose konden deelnemen aan de studie, mits ze voldeden aan ten minste 2 van de 3 criteria voor Lyme-neuroborreliose van de Europese Federatie van Neurologische Verenigingen (EFNS):

1. Aanwezigheid van neurologische symptomen die wijzen op Lyme-neuroborreliose, zonder duidelijke andere oorzaak;
2. Pleiocytose in de liquor (≥ 5 leukocyten/ μl);
3. *Borrelia*-specifieke intrathecale antistofproductie.⁹

De diagnose Lyme-neuroborreliose werd zeker geacht als een patiënt voldeed aan al deze criteria. Een patiënt die voldeed aan 2 criteria, kreeg de diagnose mogelijke Lyme-neuroborreliose. Gezonde vrijwilligers mochten geen klachten hebben bij de start van de studie. Deze studiegroep bestond uit werknemers van het Diakonessenhuis in Utrecht, het St. Antonius Ziekenhuis in Nieuwegein en het RIVM in Bilthoven die vaak recreëren in bos-, tuin- en/of duingebieden. Daarnaast werden ook leden van de plaatselijke scoutingvereniging, eigenaren van jachthonden en hardlopers geïncludeerd. Informatie over eerder opgelopen tekenbeten, klachten, en antibioticabehandeling voor LB werd verkregen door het afnemen van een Lyme-specifieke vragenlijst en door het bekijken van het elektronische patiënteninformatiesysteem. Alle deelnemers van de studie ondertekenden een geïnformeerde toestemming. De studie was goedgekeurd door de regionale medisch ethische toetsingscommissie (Nieuwegein, MEC-U: NL36407.100.11).

BORRELIA-ELISPOT

Zie *Figuur 1* voor een schematische weergave van de stappen van de ELISpot-test. Voor de *Borrelia*-ELISpot werd gebruik gemaakt van een gestandaardiseerd ELISpot-platform (Mabtech, Nacka Strand, Zweden). Uit het perifere bloed van patiënten en vrijwilligers werden mononucleaire cellen ('peripheral blood mononuclear cells': PBMC's) geïsoleerd. Vervolgens werden 250.000 PBMC's gestimuleerd met een



FIGUUR 1. De ELISpot-test. **(1)** De ELISpot-plaat bestaat uit wetjes gecoat met antistoffen (rood) tegen interferon-gamma (IFN- γ). Op de plaat worden mononucleaire cellen uit het perifere bloed (oranje) en het lysaat van de *B. burgdorferi*-stam B31 (groen) toegevoegd. **(2)** De mononucleaire cellen uit het perifeer bloed ('peripheral blood mononuclear cells': PBMC's) verwerken de *B. burgdorferi*-B31 en presenteren stukjes van deze bacterie aan de T-cellen, die daarop IFN- γ (blauw) produceren. De IFN- γ wordt vervolgens gebonden aan de antistoffen tegen IFN- γ op de bodem van de wetjes. **(3)** Na een incubatietijd van een nacht worden de wetjes gewassen om overvloedige PBMC's weg te wassen. Vervolgens wordt conjugaat toegevoegd (zwart), wat zich bindt aan het IFN- γ /antistof-complex. **(4)** Na opnieuw wassen wordt enzymsubstraat (paars) toegevoegd. **(5)** Na wassen en drogen zijn bij een positief resultaat stipjes zichtbaar op de bodem van de wetjes, waarbij elke stip overeenkomt met 1 *B. burgdorferi*-B31-specifieke IFN- γ -producerende T-cel. Deze figuur is een bewerking van <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/custom-peptides/learning-center/elispot-assay.html>.

lysaat van de *Borrelia burgdorferi*-stam B31 (Autoimmun Diagnostika GmbH, Straßberg, Duitsland), een positieve controle (anti-humaan CD3-monoklonale antistof CD3-2, Mabtech), en een negatieve controle (AIM-V medium; Life Technologies Europe B.V., Invitrogen, Bleiswijk). Na een incubatietijd van een nacht bij 37°C en 5% CO₂ werd de ELISpot-plaat gewassen met gebufferde fosfaatsaline ('phosphate buffered saline': PBS; pH 7,2±0,1) en gedurende 1 uur bij 2°C geïncubeerd na toevoeging van 7-B6-1-alkalische fosfataseconjugaat (Mabtech). De ELISpot-plaat werd opnieuw gewassen in PBS en bij kamertemperatuur geïncubeerd met '5-bromo-4-chloro-3'-indolylfosfaat en 'nitroblue tetrazolium' plus substraat (Mabtech) voor 7-10 minuten. Vervolgens werden de aantallen *Borrelia*-specifieke IFN- γ -producerende T-cellen door 2 analisten bepaald, onafhankelijk van elkaar, met behulp van een ELISpot-scanner (Autoimmun Diagnostika GmbH). Bij discrepante resultaten gaf de beoordeling van een 3^e analist de doorslag.²³

DATAVERWERKING EN STATISTISCHE ANALYSE

Dichotome data werden geanalyseerd met behulp van de Pearson's chi-kwadraattest of de Fisher's exact test. Post-hocanalyses bestonden uit vergelijkingen tussen 2 groepen (met de Pearson's chi-kwadraattest of de Fisher's exact test met Bonferroni-correctie). Kwantitatieve, niet-gerelateerde data voor meer dan 2 groepen werden geanalyseerd met behulp van de Kruskal-Wallistest, en post-hoc testen bestonden uit de Dunn-Bonferronitest. Kwantitatieve, niet-gerelateerde data voor 2 groepen werden geanalyseerd met behulp

van de Mann-Whitneytest. P-waardes kleiner dan 0,05 waren statistisch significant. Bij gebruik van post-hoc testen gold een p-waarde van 0,05/k als statistisch significant, waarbij k stond voor het aantal verschillende hypothesen.

Voor het bepalen van de waarde van de *Borrelia*-ELISpot-test bij de diagnostiek voor een actieve Lyme-neuroborreliose werd gebruikgemaakt van een 'receiver operating characteristic' (ROC)-curve en werd de oppervlakte onder de curve bepaald door de aantallen *Borrelia*-specifieke IFN- γ -producerende T-cellen van patiënten met actieve Lyme-neuroborreliose te vergelijken met de aantallen *Borrelia*-specifieke IFN- γ -producerende T-cellen van de andere 3 groepen. Dit werd gedaan met behulp van een model voor logistische regressie, waarbij de resultaten van de *Borrelia*-ELISpot als onafhankelijke variabele aan het model werden toegevoegd. De uitkomst van het model was dichotoom: een casus was een patiënt met een actieve Lyme-neuroborreliose of een controlepatiënt afkomstig uit 1 van de andere 3 groepen. Voor de analyses werd gebruikgemaakt van versie 23 van het IBM SPSS-softwarepakket (IBM, Armonk, New York, Verenigde Staten) en de figuren zijn gemaakt met behulp van GraphPad Prism (versie 5.04 voor Windows; GraphPad Software, San Diego, Californië, Verenigde Staten).

**RESULTATEN
STUDIEGROEPEN**

In totaal werden 33 patiënten met actieve Lyme-neuroborreliose geïncubeerd: 25 (75,8%) met een zekere Lyme-neuroborreliose en 8 met een mogelijke Lyme-neuroborreliose; bij

deze patiënten kon intrathecale antistofproductie niet worden aangetoond. Verder werden 37 patiënten geïncludeerd die waren behandeld voor Lyme-neuroborreliose: 31 (83,8%) met een zekere Lyme-neuroborreliose en 6 met een moge-

lijke Lyme-neuroborreliose, van wie het merendeel geen pleiocytose had (5/6; [83,3%]). Opvallend was dat 23 (62,2%) van de 37 patiënten die waren behandeld voor Lyme-neuroborreliose klachten meldden bij de start van de

TABEL 1. Demografische en klinische gegevens van de 4 studiegroepen.

Variabele	Patiënten met een actieve Lyme-NB (n=33)	Patiënten met een behandelde Lyme-NB (n=37)	Behandelde gezonde vrijwilligers (n=28)	Onbehandelde gezonde vrijwilligers (n=145)	p-waarde	Significante vergelijkingen tussen 2 groepen	
						p-waarde	vergelijkingen
Percentage mannen	66,7% (n=22)	51,4% (n=19)	46,4% (n=13)	37,9% (n=55)	0,020	0,003	Onbehandelde gezonde vrijwilligers versus patiënten met een actieve Lyme-NB
Mediane leeftijd (in jaren)	56,7 (IKA: 44,8-64,4)	59,3 (IKA: 49,4-66,9)	52,7 (IKA: 38,1-57,5)	41,0 (IKA: 27,0-51,7)	<0,001	≤0,029	Onbehandelde gezonde vrijwilligers versus de andere groepen
Percentage deelnemers met een tekenbeet	45,8% ^a (n=11)	73,0% (n=27)	92,9% (n=26)	60,0% (n=87)	0,001	≤0,041	Behandelde gezonde vrijwilligers versus de andere 3 groepen (p≤0,041). Behandelde versus patiënten met een actieve Lyme-NB (p=0,033).
Percentage deelnemers met erythema migrans	16,7% ^{a,b} (n=4)	24,3% (n=9)	78,6% ^c (n=22)	2,8% (n=4)	<0,001	≤0,015	Behandelde gezonde vrijwilligers versus de andere 3 groepen (p<0,001). Onbehandelde gezonde vrijwilligers versus beide groepen patiënten met Lyme-NB (p≤0,015).
Mediane tijd in jaren tussen einde antibiotica voor LB en bloedafname	n.v.t.	5,0 (IKA: 2,5-7,3)	5 (IKA: 2-7) ^d	n.v.t.	n.v.t.	0,563	n.v.t.
Mediane tijd in dagen tussen start antibiotica voor LB en bloedafname	7,0 (IKA: 3,0-12,5)	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.
Percentage deelnemers met klachten bij aanvang van de studie	100,0% (n=33)	62,2% (n=23)	0	0	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.

IKA=interkwartielafstand, LB=Lyme-borreliose, NB=neuroborreliose, n.v.t.=niet van toepassing, ^a=9 patiënten met een actieve Lyme-neuroborreliose (27,3%) hebben de Lyme-specifieke vragenlijst niet ingevuld, waardoor data over tekenbeet en/of erythema migrans ontbreekt, ^b=1 patiënt met een actieve Lyme-neuroborreliose met erythema migrans kon zich geen tekenbeet herinneren, de overigen wel, ^c=6 behandelde gezonde vrijwilligers werden behandeld voor een atypische huiduitslag (n=4), influenza-achtige symptomen na een tekenbeet (n=1), of na de aanwezigheid van een volgezogen volwassen teek (n=1), ^d=een behandelde gezonde vrijwilliger (3,6%) wist niet wanneer de antibioticabehandeling had plaatsgevonden en is daarom geëxcludeerd.

studie (zie Tabel 1). Deze klachten bestonden uit cognitieve klachten, vermoeidheid, spierpijn, zenuwpijn, paresthesieën en/of algehele malaise. Van de 173 geïncludeerde, gezonde vrijwilligers meldde 28 personen (16,2%) in het verleden behandeld te zijn geweest voor een vroege manifestatie van LB. Zij werden daarom geclassificeerd als behandelde gezonde vrijwilligers. De overige 145 (83,8%) gezonde vrijwilligers werden geclassificeerd als onbehandelde gezonde vrijwilligers. De demografische en klinische karakteristieken van de verschillende studiegroepen zijn weergegeven in Tabel 1.

BORRELIA-ELISPOT

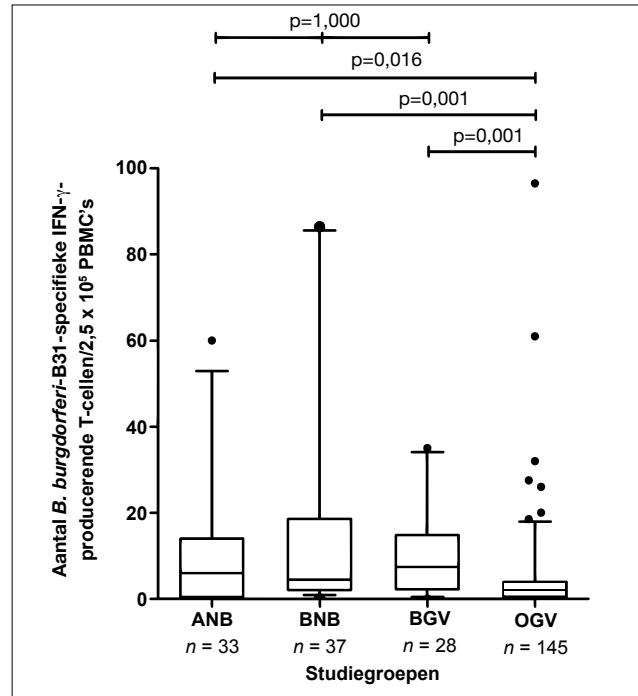
Qua aantallen *B. burgdorferi*-B31-specifieke IFN- γ -producerende T-cellen/ $2,5 \times 10^5$ PMBC's werden geen significante verschillen gevonden tussen patiënten met een actieve Lyme-neuroborreliose (mediaan: 6,0; interkwartielafstand [IKA]: 0,5-14,0), patiënten met een behandelde Lyme-neuroborreliose (mediaan: 4,5; IKA: 2,0-18,6) en behandelde gezonde vrijwilligers (mediaan: 7,4; IKA: 2,3-14,9; $p=1,000$, zie Figuur 2). Voor onbehandelde gezonde vrijwilligers was de mediaan van de aantallen *B. burgdorferi*-B31-specifieke IFN- γ -producerende T-cellen/ $2,5 \times 10^5$ PMBC's lager (mediaan: 2,0; IKA: 0,5-3,9; $p \leq 0,016$; zie Figuur 2). Ondanks dat meer dan 60% van de patiënten met behandelde Lyme-neuroborreliose 1 of meer klachten meldde (zie Tabel 1), konden deze klachten niet worden geassocieerd met het aantal *B. burgdorferi*-B31-specifieke IFN- γ -producerende T-cellen/ $2,5 \times 10^5$ PMBC's (r_s : 0,200; $p=0,235$). De reactiviteit van de *Borrelia*-ELISpot bij de behandelde gezonde vrijwilligers kon ook niet met klachten worden geassocieerd, omdat de vrijwilligers per definitie geen klachten hadden gemeld vanwege de inclusiecriteria.

WAARDE VAN DE BORRELIA-ELISPOT VOOR DIAGNOSTIEK

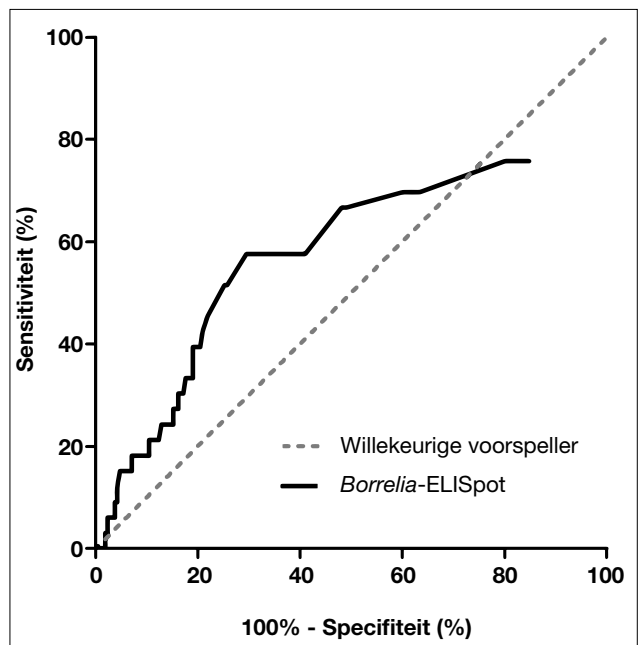
De waarde van de *Borrelia*-ELISpot-test voor de diagnostiek van Lyme-neuroborreliose werd bepaald met een ROC-curve. De oppervlakte onder de curve bleek vergelijkbaar met een willekeurige voorspeller (oppervlakte onder de curve: 0,591, zie Figuur 3).

DISCUSSIE

De verhoogde reactiviteit van de *Borrelia*-ELISpot op het perifere bloed van patiënten met een actieve Lyme-neuroborreliose verschilde niet ten opzichte van de reactiviteit van patiënten met een behandelde Lyme-neuroborreliose en gezonde vrijwilligers die in het verleden waren behandeld voor een vroege LB ($p=1,000$). Deze resultaten komen overeen met de resultaten uit een eerdere publicatie.²⁴ Deze



FIGUUR 2. *B. burgdorferi*-B31-specifieke T-celactivatie bij patiënten met een actieve Lyme-neuroborreliose (ANB), patiënten met een behandelde Lyme-neuroborreliose (BNB), behandelde gezonde vrijwilligers (BGV), en onbehandelde gezonde vrijwilligers (OGV).



FIGUUR 3. De ROC-curve van de *Borrelia*-ELISpot om de patiënten met een actieve Lyme-neuroborreliose te onderscheiden van de andere 3 groepen is gebaseerd op het aantal *B. burgdorferi*-B31-specifieke IFN- γ -producerende T-cellen/ $2,5 \times 10^5$ 'peripheral blood mononuclear cells' in het perifere bloed. De oppervlakte onder de curve is 0,591.

AANWIJZINGEN VOOR DE PRAKTIJK

- 1** De hier gebruikte *Borrelia*-ELISpot-test, waarbij het aantal *B. burgdorferi* B31-specifieke IFN- γ -producerende T-cellen/ $2,5 \times 10^5$ PMBC's wordt gemeten, is niet geschikt voor de diagnostiek van een actieve Lyme-neuroborreliose.
- 2** Of de *Borrelia*-ELISpot eventueel wel bruikbaar is voor andere manifestaties van Lyme-borreliose moet nog verder worden onderzocht.

toonde aan dat verhoogde aantallen *Borrelia*-specifieke IFN- γ -producerende T-cellen werden gevonden bij zowel patiënten met symptomen van LB als bij asymptomatische, seropositieve controlepatiënten na stimulatie met *Borrelia*. Opvallend was dat ruim 60% van de patiënten met een behandelde Lyme-neuroborreliose nog klachten had die ze associeerden met hun eerdere LB-episode. Deze klachten konden echter niet worden geassocieerd met een verhoogde activiteit van T-cellen ($r_s:0,200$; $p=0,235$). Omdat de behandelde gezonde vrijwilligers geen van allen klachten hadden bij aanvang van de studie, lijkt de reactiviteit op de *Borrelia*-ELISpot te worden verklaard door een eerder contact met de *Borrelia*-bacterie.

Bij onbehandelde, gezonde vrijwilligers werden ook verhoogde aantallen *B. burgdorferi*-B31-specifieke IFN- γ -producerende T-cellen gevonden. Een verklaring hiervoor is dat deze mensen in het verleden in contact zijn geweest met de *Borrelia*-bacterie en daarna niet ziek zijn geworden. Ook zou het kunnen dat de test fout-positief was. Bij de *Borrelia*-ELISpot-test wordt een bacterielysaat gebruikt als antigeen en door kruisreactiviteit kunnen fout-positieve reacties optreden. Om te onderzoeken of dergelijke kruisreacties optreden, werd de *Borrelia*-ELISpot ook getest met bloed van 4 patiënten met een andere ziekte dan LB: 2 patiënten met syfilis en 2 met leptospirose. Bij de *Borrelia*-ELISpot liet 1 patiënt met leptospirose een verhoogde reactiviteit zien (data niet weergegeven in de figuren).

Naast positieve testresultaten onder de gezonde vrijwilligers waren er ook negatieve testresultaten in het bloed van een aantal patiënten met een actieve Lyme-neuroborreliose. Dit kan worden verklaard door de *Borrelia*-soort die in de *Borrelia*-ELISpot werd gebruikt. Zowel *B. garinii*, *B. bavariensis* en in mindere mate *B. afzelii* worden vaker gevonden als mogelijke veroorzaker van Lyme-neuroborreliose dan *B. burgdorferi*.^{25,26} Omdat deze *Borrelia*-soorten echter nauw met elkaar verwant zijn en veel antigenen met elkaar delen, is het aannemelijk dat ze kruisreageren in de *Borrelia*-ELISpot-test. Dit werd bevestigd in de hier besproken studie (data hier niet

weergegeven; zie Van Gorkom et al. voor meer details) en door Von Baehr et al.^{23,27} Von Baehr et al. testten 3 verschillende *Borrelia*-soorten en vonden geen enkel verschil. Andere onderzoekers gebruikten *B. garinii* en vonden vergelijkbare resultaten met de hier besproken studie.²⁸ Een andere verklaring voor de vaak lage aantallen *B. burgdorferi* B31-specifieke IFN- γ -producerende T-cellen bij patiënten met een actieve Lyme-neuroborreliose is het mogelijke compartimenteren van T-cellen naar de liquor. Een aantal studies heeft aangetoond dat patiënten met een neurologische LB minder reactieve T-cellen in het bloed hadden ten opzichte van de liquor.^{29,30} Met een sensitiviteit van 36% en een specificiteit van 82% lijkt ook liquor echter niet geschikt.²⁸

CONCLUSIE

De hier besproken studie toont aan dat de reactiviteit van T-cellen, gemeten met behulp van de *Borrelia*-ELISpot-test, is geassocieerd met blootstelling aan en/of een (eerdere) infectie met de *Borrelia*-bacterie. Deze conclusie is gebaseerd op de volgende bevindingen:

- De aantallen *B. burgdorferi*-B31-specifieke IFN- γ -producerende T-cellen/ $2,5 \times 10^5$ PMBC's in het perifere bloed van patiënten met een actieve Lyme-neuroborreliose zijn vergelijkbaar met die van patiënten met een behandelde Lyme-neuroborreliose.
- Deze aantallen zijn ook vergelijkbaar met de aantallen bij gezonde vrijwilligers die in het verleden behandeld zijn geweest voor een vroege LB ($p=1,000$).
- De aantallen zijn verhoogd ten opzichte van de aantallen geactiveerde T-cellen bij onbehandelde gezonde vrijwilligers ($p \leq 0,016$).

Dit maakt de ELISpot-test voor *Borrelia* ongeschikt voor de diagnostiek van een actieve Lyme-neuroborreliose. Of de *Borrelia*-ELISpot eventueel wel bruikbaar is voor andere manifestaties van LB moet nog verder worden onderzocht.

REFERENTIES

1. RIVM. De ziekte van Lyme in Nederland. Beschikbaar via: <https://www.tekenradar.nl/ziekte-van-lyme/lyme-in-nederland>.

2. De Mik EL, Van Pelt W, Docters-van Leeuwen BD, et al. The geographical distribution of tick bites and erythema migrans in general practice in The Netherlands. *Int J Epidemiol* 1997;26:451-7.
3. RIVM. CBO-richtlijn Lymeziekte definitief. Beschikbaar via: http://www.rivm.nl/Documenten_en_publicaties/Algemeen_Actueel/Nieuwsberichten/2013/CBO_richtlijn_Lymeziekte_definitief.
4. Wilske B. Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Vector-Borne Zoonotic* 2003;3:215-27.
5. Strle F. Principles of the diagnosis and antibiotic treatment of Lyme borreliosis. *Wien Klin Wochenschr* 1999;111:911-5.
6. Van Dam AP. Molecular diagnosis of *Borrelia* bacteria for the diagnosis of Lyme disease. *Expert Opin Med Diagn* 2011;5:135-49.
7. Cerar T, Ogrinc K, Cimperman J, et al. Validation of cultivation and PCR methods for diagnosis of Lyme neuroborreliosis. *J Clin Microbiol* 2008;46:3375-9.
8. Karlsson M, Hovind-Hougen K, Svenungsson B, et al. Cultivation and characterization of spirochetes from cerebrospinal fluid of patients with Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 1990;28:473-9.
9. Mygland A, Ljostad U, Fingerle V, et al. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *Eur J Neurol* 2010;17:8-16.
10. Agüero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, et al. Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:484-509.
11. Gooskens J, Templeton KE, Claas EC, et al. Evaluation of an internally controlled real-time PCR targeting the *OspA* gene for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in cerebrospinal fluid. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:894-900.
12. Roux F, Boyer E, Jaulhac B, et al. Lyme meningoradiculitis: prospective evaluation of biological diagnosis methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;26:685-93.
13. Hammers-Berggren S, Hansen K, Lebech AM, et al. *Borrelia burgdorferi*-specific intrathecal antibody production in neuroborreliosis: a follow-up study. *Neurology* 1993;43:169-75.
14. Cerar T, Ogrinc K, Strle F, et al. Humoral immune responses in patients with Lyme neuroborreliosis. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:645-50.
15. Nadelman RB, Luger SW, Frank E, et al. Comparison of cefuroxime axetil and doxycycline in the treatment of early Lyme disease. *Ann Intern Med* 1992;117:273-80.
16. Stanek G, Wormser GP, Gray J, et al. Lyme borreliosis. *Lancet* 2012;379:461-73.
17. Wormser GP, Nadelman RB, Dattwyler RJ, et al. Practice guidelines for the treatment of Lyme disease. The Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2000;31:1-14.
18. Gergel EI, Furie MB. Populations of human T lymphocytes that traverse the vascular endothelium stimulated by *Borrelia burgdorferi* are enriched with cells that secrete gamma interferon. *Infect Immun* 2004;72:1530-6.
19. Jansky L, Reymanova P, Kopecky J. Dynamics of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by LPS or infected by *Borrelia*. *Physiol Res* 2003;52:593-8.
20. Yssel H, Shanafelt MC, Soderberg C, et al. *Borrelia burgdorferi* activates a T helper type 1-like T cell subset in Lyme arthritis. *J Exp Med* 1991;174:593-601.
21. Jin C, Roen DR, Lehmann PV, et al. An enhanced ELISPOT assay for sensitive detection of antigen-specific T Cell responses to *Borrelia burgdorferi*. *Cells* 2013;2:607-20.
22. Valentine-Thon E, Ilsemann K, Sandkamp M. A novel lymphocyte transformation test (LTT-MELISA) for Lyme borreliosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;57:27-34.
23. Van Gorkom T, Sankatsing SU, Voet W, et al. An enzyme-linked immunosorbent spot assay measuring *Borrelia burgdorferi* B31-specific interferon gamma-secreting T cells cannot discriminate active Lyme neuroborreliosis from past Lyme borreliosis: a prospective study in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 2018;56:pii: e01695-17.
24. Ekerfelt C, Forsberg P, Svenvik M, et al. Asymptomatic *Borrelia*-seropositive individuals display the same incidence of *Borrelia*-specific interferon-gamma (IFN-gamma)-secreting cells in blood as patients with clinical *Borrelia* infection. *Clin Exp Immunol* 1999;115:498-502.
25. Coipan EC, Jahfari S, Forville M, et al. Imbalanced presence of *Borrelia burgdorferi* s.l. multilocus sequence types in clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Infect Genet Evol* 2016;42:66-76.
26. Strle F, Ruzic-Sabljic E, Cimperman J, et al. Comparison of findings for patients with *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* isolated from cerebrospinal fluid. *Clin Infect Dis* 2006;43:704-10.
27. Von Baehr V, Doebe C, Volk HD, et al. The lymphocyte transformation test for *Borrelia* detects active Lyme borreliosis and verifies effective antibiotic treatment. *Open Neurol J* 2012;6:104-12.
28. Nordberg M, Forsberg P, Nyman D, et al. Can ELISPOT be applied to a clinical setting as a diagnostic utility for neuroborreliosis? *Cells* 2012;1:153-67.
29. Forsberg P, Ernerudh J, Ekerfelt C, et al. The outer surface proteins of Lyme disease *Borrelia* spirochetes stimulate T cells to secrete interferon-gamma (IFN-gamma): diagnostic and pathogenic implications. *Clin Exp Immunol* 1995;101:453-60.
30. Wang WZ, Fredrikson S, Sun JB, et al. Lyme neuroborreliosis: evidence for persistent up-regulation of *Borrelia burgdorferi*-reactive cells secreting interferon-gamma. *Scand J Immunol* 1995;42:694-700.