



## Tekenbeet ziekte gerelateerde onderzoeken

Door teken overgedragen infectieziekten zijn wereldwijd toegenomen - de ziekte van Lyme behoort tot de meest voorkomende infectieziekte in de Verenigde Staten en Europa en neemt epidemische vormen aan. (Kugeler et al., 2015; Sykes et al., 2014).

Hoewel de meeste teken de capaciteit hebben om een aantal pathogenen over te brengen die de menselijke ziektes veroorzaken, is Lyme-ziekte de meest bekende tekenbeet-ziekte en wordt veroorzaakt door bacteriën van het genus *Borrelia*; voornamelijk *Borrelia burgdorferi*. Dit zijn gram-negatieve bacteriën. Spirocheten zijn een groep fylogenetisch onderscheidende bacteriën die een unieke beweeglijkheid hebben door middel van axiale filamenten (endoflagella).

*Borrelia* is onderverdeeld in "genospecies"; De meest voorkomende zijn *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis* en de pas geïdentificeerde *B. miyamotoi*.

*B. burgdorferi* infecteert via het bloed en weefsels van verschillende geïnfecteerde zoogdieren en vogels via tekenbeten van de genus *Ixodes*. De witvoetige muis wordt gezien als de grootste overbrenger van de *B. burgdorferi*. Tijdens de bloedmaaltijd van een besmet dier, kan de teek de spirocheten overbrengen naar herten, mensen en andere warmbloedige dieren. Bij de meeste zoogdieren, inclusief mensen, kan infectie door *B. burgdorferi* leiden tot Lyme-ziekte, maar ook een gezonde drager bestaat (dat wil zeggen, niet iedereen die door een teek wordt gebeten wordt ziek). Het is echter opmerkelijk dat alle soorten *Borrelia* er bekend om staan ziektes te veroorzaken, waarvan 21 met de ziekte van Lyme zijn geassocieerd.

Het is belangrijk om er rekening mee te houden dat de ziekte van Lyme acuut kan zijn (d.w.z. kort na een tekenbeet), of in een later stadium / persistente / chronische Lyme (d.w.z. voorkomend / aanhoudend na de aanvankelijke tekenbeet; Donta 2002). Er is geprobeerd om "latere" Lyme-ziektes te scheiden van de "chronische" Lyme-ziektes; de eerstgenoemde worden gemanifesteerd door objectieve tekenen van artritis of neurologische ziektes (Wormser et al. 2000). Sommigen hebben het bestaan van chronische ziektes ontkend, daarmee implicerend dat deze patiënten last hebben van psychiatrische aandoeningen; sommigen bedoelen met de term "chronisch" het ziek zijn na de behandeling ("post-Lyme"), ervan uitgaande dat de infectie is behandeld en de overige symptomen zich in hetzelfde gebied bevinden als bij patiënten die lijden aan "fibromyalgie" of "chronische vermoeidheid" (Seltzer et al. 2000; Steere AC 2001). Die chronische Lyme-ziekte bestaat inderdaad, en is waarschijnlijk de meest voorkomende vorm van de ziekte. Dit wordt ondersteund door epidemiologische studies die aantonen dat 30-50% van de behandelde en onbehandelde patiënten verdergaan met het ontwikkelen van een multi-symptoom-afwijking die typisch is voor, en niet te onderscheiden is van, fibromyalgie en chronische vermoeidheid (Asch et al. 1994; Shadick et al., 1994).

Het onderscheid tussen acute en latere / chronische / aanhoudende ziekte is belangrijk gezien de diagnostische benadering en manier van behandelen in deze twee situaties totaal verschillend is.

Gezien het aantal mogelijke co-infecties (dwz door teken veroorzaakte infecties -TBI) die door teken doorgegeven worden (zoals Bartonella, Babesia, Anaplasma, Ehrlichia, Rickettsia, enz.), is het beter om te praten over tekenbeetziekten in plaats van alleen de ziekte van Lyme, die alleen betrekking heeft op de Borrelia infectie. Vaak zien we de term "Lyme-ziekte" in grote mate gebruikt worden voor tekenbeet ziekten; Dr. Richard Horowitz stelde echter voor om persistente / chronische infecties met Borrelia en andere co-infecties aan te duiden als Lyme-MSIDS (Multiple Systemic Infectious Disease Syndrome).

Lyme borreliose is een multi-systeem ziekte met diverse manifestaties die de klinische diagnose moeilijk maken. Lyme-ziekte vertoont een verscheidenheid aan symptomen die kunnen worden verward met immuun- en ontstekingsstoornissen (zie het boek van Dr. Horowitz, *Why Can't I Get Better?*). Verschillende checklists (van Dr. Horowitz of op de website [www.lymedisease.org](http://www.lymedisease.org)) zijn beschikbaar voor patiënten en artsen om rekening te kunnen houden met meerdere symptomen. Een nieuwe, herziene checklist, genaamd HMQ (Horowitz MSIDS Vragenlijst \*, gevalideerd op meer dan 1600 patiënten) wordt gepubliceerd in het nieuwe boek van Dr. Horowitz (*How Can I Get Better?*). Deze checklist dient ervoor om te zien of aan de Lyme-criteria wordt voldaan.

Ontstekingen rond de tekenbeet veroorzaken huidletsels. Erythema (chronicum) migrans (ECM), een unieke uitbreidende rode kring met ringvormige verkleuring (bulls-eye), is meestal de eerste fase van de ziekte. Artritis, neurologische ziekte en hartziekte kunnen zich manifesteren in latere stadia. Hoewel vroege behandeling van een primaire acute infectie eenvoudig is, kunnen later geïdentificeerde patiënten last hebben van chronische Lyme en bijbehorende aandoeningen, die moeilijker te diagnosticeren en behandelen zijn. Het is belangrijk om te zeggen dat niet iedereen die de ziekte van Lyme krijgt een erythema migrans moet hebben gehad.

Het is ook belangrijk om in gedachten te houden dat de arts het volledige klinische beeld moet beoordelen. Het diagnosticeren van Lyme- en tekenbeet gerelateerde aandoeningen is zeer uitdagend. Complicaties bij de diagnosestelling van tekenbeet-infecties zijn dikwijls het gevolg van het gebrek aan betrouwbare testen. Lyme slachtoffers worden vaak foutief gediagnosticeerd en verward met andere aandoeningen. Zelfs wanneer een goede diagnose is gesteld, is het vaak moeilijk te verifiëren, omdat nauwkeurige testen en onderzoeken niet altijd beschikbaar zijn. Daarom baseren sommige artsen hun diagnoses alleen op de aanwezigheid van de klassieke "bullseye" uitslag, maar doen geen aanvullende testen. Andere artsen vereisen laboratoriumbevestiging voor de behandeling. Er zijn maar weinig testen voor tekenbeetziekten goedgekeurd voor klinische diagnose. De meeste beschikbare testopties zijn "onderzoekstesten" of "proefonderzoeken", die gericht zijn op de evaluatie van patiënten met Lyme-achtige klachten.

Laboratoriumtesten helpen niet alleen om een ziekte te diagnosticeren, maar ook om de ziekte te controleren en de behandeling te volgen. Een goede test kan een arts helpen om de ernst van de ziekte te beoordelen, de voortgang van het ziekteproces, stabiliteit of resolutie, een terugval te beoordelen en medicatie keuze of de therapie aan te passen. Helaas bestaat er niet één test met deze mogelijkheden voor de ziekte van Lyme. Er is een aanzienlijke hoeveelheid energie en geld besteed om de doeltreffendheid van de test te verbeteren, maar nog steeds zonder succes. Waarom? Er bestaan verschillende redenen, maar de belangrijkste is het gevolg van de oorsprong van deze besmettelijke

infectie die verschillende strategieën heeft ontwikkeld om het immuunsysteem te omzeilen. De meest voorkomende tests zijn gebaseerd op serologie, maar veel patiënten produceren geen antilichamen en produceren daardoor een negatief testresultaat. Er zijn vele redenen waarom antilichamen niet worden waargenomen wanneer een persoon een actieve Lyme-infectie heeft, waaronder: (i) te vroeg uitgevoerde test (voor acute infectie), (ii) het speeksel bevat specifieke immuun onderdrukkende componenten die de activering voorkomen van een immuunrespons, (iii) wanneer Borrelia in cyste vorm is, is er geen synthese van oppervlaktegebieden om antilichamen te maken, enz. De Borrelia heeft ook het vermogen om zich te verstoppen. Hierdoor kan ook een onterecht negatief testresultaat worden verkregen. Bovendien, gezien het aantal geïdentificeerde stammen (en waarschijnlijk nog niet allemaal geïdentificeerd) zijn de beschikbare testen niet allesomvattend, dus als een patiënt geïnfecteerd wordt door de stam die niet onder een bepaalde test valt, wordt het resultaat negatief. Dit alles onderstreept het belang van een gespecialiseerde arts met brede kennis, die weet waar hij op moet letten en hoe hij moet handelen in combinatie met de juiste laboratoriumtesten en testresultaten. Een algemeen begrip van de beperkingen en de betekenis van een gegeven diagnose is van het grootste belang.

*\* De nieuwe HMQ vragenlijst kan verkregen worden via mail. Stuur een aanvraag hiervoor naar [tmijatovic@redlabs.be](mailto:tmijatovic@redlabs.be)*

De meeste van de momenteel beschikbare diagnostische methoden worden hieronder weergegeven, ze worden zowel gebruikt voor de evaluatie van acute als chronische ziekten. Een apart onderdeel is gewijd aan aanhoudende/ chronische ziekte, gezien het een bredere aanpak nodig heeft, gebaseerd op meerdere symptomen die bij chronische patiënten worden waargenomen.

## **MICROSCOPIE**

Dit is een onderzoek van een bloed- of weefselmonster met behulp van een high-definition microscoop om de aanwezigheid van spirocheten direct te detecteren. Dit is een tijdrovende en niet sensitieve techniek wanneer dit enkel gebruikt wordt met bloed vanwege de lage aantallen Borrelia spirocheten, vooral in het vroege stadium van de infectie. Daarnaast zijn er zeer weinig meldingen van klinische studies die deze techniek gebruiken, waardoor het moeilijk is om de bruikbaarheid van deze methode te bepalen bij de analyse van mensen met een zeer vroege infectie of in een terugvallende periode tijdens het ziekteproces. Ook zouden andere spirochetische ziekten moeten worden uitgesloten wanneer men op deze methode vertrouwt.

Focus floating microscopie is ontwikkeld voor het detecteren van spirocheten in weefselmonsters, maar dit is niet buiten het onderzoekslaboratorium gebruikt en heeft de praktische moeilijkheidsgraad dat potentieel geïnfecteerde weefsels moeten worden geïdentificeerd en er biopsies van genomen moeten worden.

## CULTUUR DETECTIE

Omdat *Borrelia* een veeleisende groeibehoefte heeft, zijn deze organismen moeilijk te kweken, en zelfs onder optimale omstandigheden is hun groei erg traag. Bijgevolg is het kweken van bacteriën, zoals in het diagnoseapparaat niet praktisch voor de ziekte van Lyme, voornamelijk om twee redenen: ten eerste hebben *Borrelia* bacteriën zich ontwikkeld om zich in een levende gastheer te vermenigvuldigen, daarom is het kweken ervan moeilijk en deze methoden zijn vaak niet reproduceerbaar met klinische nauwkeurigheid; en ten tweede, omdat ze zo langzaam groeien, kunnen de resultaten niet binnen een redelijke termijn worden gemeld.

## BIOPSIE

Ongeveer 60-80% van de monsters geïsoleerd uit de rand van een vermoede Erythema Migrans, toonden door een biopsie van 2 mm diep met een via een naald ingespoten en weer opgezogen zoutoplossing *B. burgdorferi*. Aan gezien de aanwezigheid van een letsel in combinatie met een bevestigende geschiedenis en klinische presentatie voldoende zijn om de behandeling te starten, worden deze huidbiopsieprocedures zelden uitgevoerd. Het is dan ook moeilijk om een uitspraak te doen over deze testmethode.

## SEROLOGIE

Het menselijke immuunsysteem produceert specifieke antilichamen in reactie op stoffen van buitenaf die aanwezig zijn in het lichaam. Testen gebaseerd op antilichamen identificeren deze specifieke antilichamen die worden geproduceerd in reactie op een bacteriële infectie. Bloedonderzoeken die antistoffen identificeren en specifiek voor de bacteriën van *B. burgdorferi*, behoren tot de meest gebruikte diagnostiek voor de ziekte van Lyme. Deze diagnostische methode wordt ook wel serologie genoemd. Als de antilichaam reactie van het immuunsysteem niet voldoende is ontwikkeld, is het mogelijk dat deze tests ondanks een actieve infectie negatieve resultaten opleveren. Omgekeerd kunnen antilichamen jaren na de behandeling aanhouden, dus bij afwezigheid van een actieve infectie kunnen asymptomatische patiënten een positief serologisch resultaat produceren. Het wil dan niet zeggen dat de patiënten geen actieve infectie hebben gehad.

Lab-tests detecteren twee verschillende klassen van antilichaam, IgM en IgG.

- *Borrelia IgM (immunoglobuline M) antilichamen zijn meestal ongeveer twee tot drie weken na blootstelling in het bloed detecteerbaar. IgM-niveaus stijgen tot maximaal zes weken en beginnen dan te dalen.*
- *Borrelia IgG (immunoglobuline G) antilichamen zijn pas na enkele weken blootstelling detecteerbaar, ze stijgen tot een maximaal niveau na ongeveer vier tot zes maanden en kunnen gedurende meerdere jaren op hoge niveaus blijven.*

Van belang is dat *B. Burgdorferi*, door middel van genrecombinatie, zijn oppervlaktestructuur kan veranderen, waardoor er andere externe antigenen ontstaan, waarmee immuun herkenning wordt voorkomen, wat leidt tot vals negatieve testresultaten.

De twee meest gebruikte antistof gebaseerde testen zijn de enzym-linked immunosorbent assay (ELISA) en de Western blot (immunoblot).

Gedurende de eerste vier tot zes weken van de infectie van Lyme zijn deze tests vaak onbetrouwbaar, omdat de meeste patiënten nog niet voldoende antistoffen hebben ontwikkeld voor de test om te detecteren. Zelfs later in de ziekte zijn deze proeven zeer ongevoelig voor ongeveer de helft van degenen die Lyme ziekte hebben.

De testen voor het vaststellen van Lyme ziekte bestaat uit twee delen. Het eerste deel, een screeningstest (d.w.z. ELISA), die iedereen die de ziekte zou kunnen hebben, optimaal kan identificeren. Screening tests zijn typisch ontworpen om alle geïnfecteerde individuen in grote mate te identificeren en worden beschouwd als tests met een hoge gevoeligheid. Deze testen produceren echter vaak vals-positieven. Om deze reden wordt deze test gevolgd door een tweede bevestigende test (d.w.z. immunoblot) die bedoeld is om ervoor te zorgen dat alleen mensen met de ziekte gediagnosticeerd worden. Dit zijn zeer specifieke testen.

Bij Lyme-ziekte is de tweede test (dat wil zeggen Western blot) zeer specifiek, ervan uitgaande dat er antilichamen zijn geproduceerd als gevolg van de infectie. Dus zijn er zeer weinig vals positieven. Helaas is de screeningstest voor Lyme zeer ongevoelig, niet alle patiënten die Lyme ziekte hebben worden nauwkeurig vastgesteld. Om deze reden mist de standaard Lyme-test ongeveer 54% van de geïnfecteerde patiënten (Stricker & Johnson 2010).

Serologie is momenteel de meest gebruikte diagnostische methode voor Lyme ziekte. Een positieve serologische test suggereert alleen dat de patiënt blootgesteld is aan het pathogeen en betekent niet meteen een diagnose van een actieve infectie. Het gebruik van een ELISA als een screening tool, gevolgd, indien positief, door een bevestigende Western blot, is geen adequate aanpak. De ELISA is niet gevoelig genoeg om te dienen als een adequaat filter, en er zijn veel patiënten met Lyme die negatief testen door ELISA maar toch volledig diagnostische Western Blots hebben. ELISA is de eenvoudigste, het goedkoopste, makkelijkst uitvoerbaar en meest voorkomende Lyme-test die wordt gebruikt. De typische Lyme test is gebaseerd op de detectie van serum antilichamen die zijn gemaakt in reactie op blootstelling aan *Borrelia burgdorferi*. Het is een test die de voorkeur krijgt van laboratoria, niet omdat het nauwkeuriger is dan andere Lyme-tests, maar omdat het gemakkelijk geautomatiseerd kan worden. Daarom kunnen veel verschillende patiënten monsters tegelijkertijd door een enkele machine worden uitgevoerd. Dit zorgt voor snellere omzet, minder kosten en theoretisch gestandaardiseerde testresultaten die consistent zijn van laboratorium tot laboratorium. De ELISA-test klinkt simpel en eenvoudig, maar het heeft een aantal grote tekortkomingen. *Borrelia* soorten zijn enkele van de polymorfe bacteriën die bekend zijn. Met andere woorden, de meeste *Borrelia* kunnen hun oppervlakte-eiwitten significant veranderen tijdens de celverdeling om ons immuunsysteem te ontwijken, en kunnen van laboratoriumstammen afwijken, zodat er negatieve testen kunnen ontstaan, ook al zijn er antilichamen aanwezig! Thomas Grier (microbioloog en voormalig Lyme patiënt) schreef veel recensies over Lyme-gerelateerde testen. Hij presenteert een zeer dwingende analyse over waarom ELISA-testen onnauwkeurig zijn: "De ELISA-test is afhankelijk van de actieve, vrije antilichamen die zich vasthechten aan de vrije antigenen die zijn ingebed op de wanden van de proefbuis. Als de antilichamen in het serum dan getest worden en reeds aan antigenen gehecht zijn, dan kan de enzymreactie niet plaatsvinden. Als we denken aan antilichamen die als sleutels in sloten passen, en dat op de oppervlaktes van de bacteriën specifieke sloten zitten die wij nu antigeen noemen, kunt u zien dat als een sleutel in een slot is geplaatst, de sleutel niet meer beschikbaar is voor het openen van eventuele andere sloten. Wat deze test zo misleidend maakt, is dat veel artsen hoge uitslagen accepteren als aanwijzing dat de patiënt echt ziek moet zijn. Deze logica is

precies anders om. Als een patiënt heel erg geïnfecteerd is met veel bacteriën, betekent het dat er veel bacteriële antigenen in het bloed zweven, die complexe vrije antilichamen afdrijven. Dus, als het vrije antigeen toeneemt, drijft het vrije antilichaam af. Aangezien de ELISA-test alleen vrije antistoffen detecteert, kan een negatieve test daadwerkelijk een ernstigere infectie aangeven. Vaak heb ik gezien dat asymptomatische patiënten met ELISA scores van meer dan 1000 behandeld werden alsof ze aan de deur van de dood stonden, omdat ze een hoge score hadden, terwijl patiënten met borderline scores, die praktisch gehandicapt zijn, worden genegeerd, omdat een lage score wordt waargenomen, dus minder geïnfecteerd! Deze conclusies zijn foutief en eigenlijk tegengesteld aan de waarheid; het is zo dat een hoge score een grotere natuurlijke immuniteit betekent."

De Western Blot is specifiek, omdat deze een gedetailleerde weergave van de verschillende antilichamen weergeeft, welke het immuunsysteem produceert tegen de bacteriën. De kaart scheidt de antilichamen door het gewicht van hun respectieve antigenen (bacteriële eiwitten) en wordt gemeld in eenheden genaamd kilodaltonen of kDa. Bijvoorbeeld, een Western blot kan banden rapporteren op 22-, 23-, 25-, 31-, 34-, 39- en 41-kDa. Elk van deze banden vertegenwoordigt een antilichaamrespons op een specifiek eiwit dat op de spirocheten wordt gevonden. De 41-kDa band wijst op een antilichaam tegen het 41-kDa flagella eiwit en is non-specifiek ten opzichte van de bacteriële species. De 31-kDa-band vertegenwoordigt het OSPA-eiwit en is specifiek voor slechts een paar soorten *Borrelia*, net als de 34-kDa OSPB-band en de 23-kDa OSPC-band.

Western blots worden gemeld door te tonen welke banden reactief zijn. 41-kDa band lijkt het vroegst in de loop van de ziekte te verschijnen, maar kan overgaan in andere spirocheten. De 18 kDa, 23 tot 25 kDa (Osp C), 31 kDa (Osp A), 34 kDa (Osp B), 37 kDa, 39 kDa, 83 kDa en de 93 kDa banden zijn de specifieke species, deze verschijnen later of mogen helemaal niet verschijnen. Je zou minstens de 41-kDa en een van de specifieke banden moeten zien. De 55-kDa, 60-kDa, 66-kDa en 73-kDa zijn onspecifiek en non diagnostisch. Verschillende merken van *Borrelia*-immunoblots zijn gemakkelijk verkrijgbaar. De kit van Mikrogen detecteert antilichamen tegen vier immunopathogene genospecies (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii* en *B. bavariensis*) op een enkele teststrook:

- VlsE van verschillende genospecies
- OspC van alle genospecies
- p18 (Decorin bindende proteïne A = DbpA) van alle genospecies

De voordelen van het gebruik van deze methode, waarbij de patiënt een antilichaamrespons ontwikkelt, zijn: hoge gevoeligheid en specificiteit. Ook makkelijke en duidelijke interpretatie door banden die gemakkelijk te lezen zijn spelen mee, optimale presentatie zonder kruisreactie van *Borrelia*-eiwitten en immunodominante antigenen van de vier genospecies: *B. Burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii* en *B. bavariensis*, afzonderlijke detectie van IgG- en IgM-antilichamen, en veilige evaluatie door strip-specifieke controles (cut-off en conjugate control). Dus, in het geval dat de patiënt antilichamen kon ontwikkelen, zal deze test de aanwezigheid ervan op een optimale manier onthullen. In het geval dat de patiënt geen antilichamen produceerde, blijft deze test ondanks de infectie negatief. Om ervoor te zorgen dat de meest specifieke banden in de immunoblot zijn opgenomen, vraagt het laboratorium om de in de test

opgenomen antigenen toe te lichten en het volledige rapport te geven, niet alleen het eindresultaat (positief / grens / negatief).

Bijzondere aandacht wordt gegeven aan *B. miyamotoi*, die meestal niet reageert met *B. burgdorferi* testen (Branda & Rosenberg 2013, Lee et al., 2014). *B. miyamotoi* kan worden gedetecteerd door PCR of door EliSpot.

Ten slotte is er een nieuwe serologietest voor de ziekte van Lyme, genaamd SeraSpot, op de markt gebracht. Het is zeer vergelijkbaar met de Western blot, maar leent zich goed voor automatisering en dus hoge doorvoer, waardoor een snellere beoordeling in het klinisch laboratorium mogelijk is. Gezien beide benaderingen kwantificering mogelijk maken, is er geen echte verbetering in serologisch gebaseerde testen met SeraSpot bij het vergelijken met de Western blot, mits de Western blot zeer specifieke antigenen bevat, zoals de Mikrogen kit, gebruikt in verschillende laboratoria of de diagnostische test uit IGeneX.

Een belangrijk probleem met Lyme diagnostiek is dat geen enkel bloedonderzoek definitieve resultaten geeft. Twee van de meest gebruikte tests, ELISA en Western blot, vertrouwen op de aanwezigheid van serum antilichamen die worden geproduceerd tegen *B. burgdorferi*. Helaas kunnen de resultaten van deze tests onnauwkeurig zijn en zijn analysemethoden niet altijd consistent van laboratorium tot laboratorium. De ELISA-test kan een vals negatief produceren als deze te vroeg wordt uitgevoerd en een Western blot moet altijd worden uitgevoerd om een positief ELISA resultaat te bevestigen. Beide testen detecteren indirect infectie door te reageren op antilichamen in het bloed serum; De aanwezigheid van antilichamen betekent echter niet altijd dat er een actieve infectie aanwezig is, maar het geeft aan dat de blootstelling aan de besmettelijke infectie wordt aangegeven. Omgekeerd kan de afwezigheid van antilichamen niet definitief de afwezigheid van infectie bevestigen.

Als laatste opmerking kunnen Lyme-bacteriën zich binden aan proteïnen, waardoor de eiwitten die eerder zijn herkend door antilichamen, worden gemaskeerd. Ze hebben ook de mogelijkheid om cellen binnen te gaan, inclusief cellen van het zenuwstelsel en het immuunsysteem. Eenmaal binnen in een cel zijn ze niet langer toegankelijk voor bindende antilichamen. Het is belangrijk om te weten dat Borreliose een immunosuppressieve ziekte is, die antilichaamproductie kan voorkomen. Alhoewel een Western Blot heel specifiek kan zijn in het detecteren van Lyme specifieke antilichamen, is noch deze noch de ELISA test zinvol wanneer het lichaam is gestopt met het aanmaken van antilichamen.

## **C6 ELISA TEST**

C6 is een synthetische peptide (C6 Peptide) afgeleid van het VIsE eiwit, dat zowel in de vroege als in de late fase van Lyme ziekte voorkomt. De test identificeert de aanwezigheid van antilichamen tegen deze synthetische peptide. Zijn gevoeligheid wordt echter gerapporteerd op slechts 70-74%, dus lager dan die van een Western blot inclusief hoog specifieke antigenen (23, 31, 34, 39, 83-93-kDa bands); Daarom is het verstandig om een bevestigende Western blot uit te voeren. In het licht hiervan is het efficiënter en minder duur om alleen een Western blot uit te voeren. Verder hebben Embers et al. (PLoS One 2012) aangetoond dat de C6 peptide antilichaam test niet in staat is om blijvende infecties te detecteren, ook wanneer andere methoden bacteriële aanwezigheid bevestigen in de weefsels van geïnfecteerde apen. Zo bleek de C6-peptide antilichaam test een onbetrouwbaar diagnostisch hulpmiddel in behandelde en onbehandelde apen te zijn, gezien het feit dat een positief resultaat negatief kan worden.

## **CD57 CELLS TELLING**

Bij chronische Lyme Borreliosis is de CD57-telling zowel nuttig als belangrijk. CD57 + / CD3-cellen zijn een subset van de natuurlijke afweer. NK-cellen spelen een cruciale rol in aangeboren immuniteit, herkennen en doden van virus-geïnfekteerde cellen en tumorcellen. Dr. Stricker en medewerkers (Stricker & Winger 2001; Stricker et al. 2002) hebben gemeld dat het aantal CD57 + / CD3-cellen was verminderd bij chronische (niet acute) Lyme-ziekte. Hoewel acute infecties met antibiotica kunnen worden behandeld, kan het behandelen niet leiden tot een chronische, verzwakkende ziekte die wordt gekenmerkt door musculoskeletale en neurologische symptomen. Chronische Lyme-ziekte kan moeilijk zijn om te behandelen, maar ook om te diagnosticeren (Aguero-Rosenfeld et al. 2005).

Het aantal CD57 + / CD3-cellen is verminderd bij chronische Lyme-ziektepatiënten, met name die met uitgesproken neurologische symptomen. Patiënten met een lage CD57 hebben aanzienlijk meer co-infecties en persistente immunologische defecten dan patiënten met hogere tellingen. Bij patiënten die reageren op antibiotica therapie, komt het aantal terug naar normaal na de behandeling, maar bij patiënten met persistente Lyme ziekte blijven CD57 niveaus laag. De test is een drie-kleuren flow-cytometrie-gebaseerde analyse. Het gehele bloed wordt gekleurd met antilichamen gericht tegen de CD3 en de CD57 antigenen; Het absolute aantal CD57-positieve / CD3-negatieve lymfocyten (cellen per  $\mu\text{l}$  volbloed) wordt bepaald door flowcytometrie. De resultaten geven het absolute aantal CD57 + / CD3-cellen aan (cellen /  $\mu\text{l}$ ). Het normale bereik is 60-360 cellen /  $\mu\text{l}$ . Onbehandelde, chronische Lyme patiënten hebben waarden onder 60.

Ook belangrijk; lage CD57-telling werd ook bewezen bij autistische kinderen (Siniscalco et al. 2016). Dit kan ook wijzen op de aanwezigheid van meerdere infecties bij autistische aandoeningen.

## **LYMPHOCYTE TRANSFORMATIE TESTEN**

De lymfocyttransformatietest (LTT) werd oorspronkelijk ontwikkeld in de jaren 1960 voor het evalueren van histocompatibele klasse II HLA antigenen. De methode werd vervolgens aangepast voor klasse II antigeen typen en ook extensief toegepast op het detecteren van type IV allergieën op drugs, metaboliëten, infectieuze organismen en metalen. LTT werd een gemeenschappelijke test voor het detecteren van allergie tegen beryllium, nikkel, goud, kobalt, chroom en palladium.

Deze testen zijn specifiek voor werkelijke antigenen, niet voor antilichamen, en worden als nauwkeuriger beschouwd bij de diagnose Lyme, met name met betrekking tot een actieve, lopende infectie.

### **1. MELISA LTT**

In 1994 publiceerde Stejskal en collega's een wijziging van de LTT voor het detecteren van metaalgevoeligheid - de MELISA-test. De MELISA-technologie wordt nu toegepast om de actieve Lyme-ziekte te diagnosticeren (Valentine-Thon et al. 2006).

Een positieve reactie in de MELISA-test toont de huidige actieve infectie met *Borrelia burgdorferi* sensu lato aan. Naast de standaard vier recombinante antigenen afgeleid van



B. afzelii en B. garinii, omvat de test gewoonlijk drie aanvullende antigenen afgeleid van B. burgdorferi sensu stricto (een recombinant buitenoppervlakte eiwit OspC, een recombinant p41-intern fragment en een volledige Antigeenlysaat). MELISA is een lymfocyten transformatie test, die geen antilichamen detecteert, maar cellulaire immuno-reactiviteit die kenmerkend is voor actieve infecties van Borrelia burgdorferi. De test verbetert de laboratoriumdiagnose door de actieve ziekte te bevestigen bij patiënten met klinische symptomen van Lyme. Deze test is gebaseerd op het gebruik van mononucleaire cellen van perifere bloed, samen met controles, in een multi-well cultuurplaat bedekt met recombinant Borrelia antigenen bij drie verdunningen gedurende 5 dagen bij 37 ° C met 5% kooldioxide atmosfeer. Als de lymfocyten eerder het antigeen hebben geconfronteerd, zullen de cellen zich verdelen en deze verdeling wordt gemeten door de opname van radioactieve methyl-3H-thymidine. De LTT-MELISA kan ziekteactiviteit meten bij die geïnfecteerde patiënten die geen adequate antistofrespons hebben. Het is echter raadzaam om Western blot parallel uit te voeren, aangezien sommige Western blot-positieve patiënten negatief werden getest door LTT-MELISA (Puri et al. 2014).

## **2. ELISPOT AND LYMESPOT REVISED**

De EliSpot (Enzyme-gekoppelde Immunosorbent Spot Assay) meet het aantal geactiveerde T-lymfocyten in celculturen op basis van hun vrijlating van cytokinen wanneer ze worden uitgedaagd door een reactief antigeen. Momenteel zijn er nog maar een paar publicaties beschikbaar en hun conclusies zijn uiteenlopend (Forsberg et al. 1995; Nordberg et al., 2012; Jin et al., 2013).

De EliSpot (Interferon Y-test) is een test om een infectie te detecteren met Borrelia en diverse co-pathogenen op cellulair niveau.

Terwijl de bestaande EliSpot-test uitsluitend is gebaseerd op de productie van interferon-y, evalueert de nieuwe LymeSpot-test ook de productie van het cytokine interleukine (IL)-2. Als de verhouding van interferon-y IL-2 omgekeerd is, kan een latente ziekte worden aangenomen.

Meer en meer laboratoria verrichten LTT-tests voor Borrelia en sommige ook voor co-infecties. Maar, zoals bij een Western blot, is het heel belangrijk om te weten welke antigenen in de test worden gebruikt. Vraag naar een lijst van de gebruikte antigenen en controleer op hun specificiteit en de lijst van soorten die worden behandeld. Niet alle laboratoria gebruiken meerdere antigenen.

### **PCR-tests**

Het targeten van DNA met behulp van polymerase kettingreactie (PCR) kan nuttig zijn omdat het een directe meting van het pathogeen is en niet gebaseerd is op indirecte serologie.

PCR is een bloedtest die een belangrijk deel van DNA uit de Lyme-bacteriën versterkt, zodat het kan worden gedetecteerd. Terwijl PCR zeer nauwkeurig is wanneer het Lyme DNA gedetecteerd wordt, produceert het veel valse negatieven. Dit komt omdat de Lyme-bacteriën gering zijn en niet in het geteste staal zitten. In plaats van antilichamen te identificeren op de Borrelia-bacterie, is de PCR een directe meting van het organisme zelf.

Helaas produceert PCR-testen vaak vals negatieven, omdat Lyme-bacteriën de neiging hebben om alleen voor korte tijd in het bloed te verblijven, en de voorkeur hebben om in de weefsels te vertoeven met verminderde bloedcirculatie.

PCR is een specifieke en gevoelige methode voor snelle en directe detectie van *B. burgdorferi*. Het heeft nut getoond voor het detecteren van Borrelia DNA uit huidbiopsies van ECM-letsels, evenals DNA uit synoviale en cerebrospinale vloeistof in late fase van de ziekte. Borrelia DNA kan ook worden gedetecteerd in bloed, maar PCR resultaten moeten correleren met de klinische presentatie van de patiënt. Vanwege de klinische gevoeligheidsbeperkingen van de PCR-analyse, belemmert een negatief resultaat de aanwezigheid van het organisme of actieve Lyme-ziekte. Ook een negatief resultaat sluit de Lyme-ziekte niet uit, aangezien remmende stoffen in het staal aanwezig kunnen zijn. Door middel van een goed ontwerp van ontaarde PCR-primers kunnen meerdere soorten gedetecteerd worden in een enkele test of, omgekeerd, kunnen primers worden ontworpen om een specifieke soort te identificeren. PCR-testresultaten dienen als diagnose-hulpmiddel te worden gebruikt en niet als een op zichzelf staande diagnostiek. Deze resultaten moeten correleren met de klinische presentatie van de patiënt. Gelijktijdige infecties met meervoudige pathogenen, waaronder *Bartonella*, *Ehrlichia chaffeensis* / *Anaplasma phagocytophilum* en *Babesia microti*, zijn gerapporteerd en er moet overwogen worden om andere pathogenen te testen, indien klinisch aangegeven.

Hoewel PCR een inherent gevoelige en specifieke methode is, zijn de resultaten vaak negatief, ondanks dat de patiënt een infectie heeft. Dit is meestal een gevolg van een gebrek aan bacteriën in het geteste staal. Bloed kan negatief zijn voor Lyme DNA, omdat wanneer Borrelia aanwezig is in het weefsel in cyste vorm, het zelden vrij van genetisch materiaal in de omloop is. Ook personen met Lyme-ziekte hebben vaak periodes wanneer ze symptomatisch en dan asymptomatisch zijn, wat de activiteiten van de bacterie weerspiegelt. De PCR-test kan positief of negatief terugkomen, afhankelijk van het activiteitsniveau van de infectie. In latere stadia van de ziekte is de kans groot dat bacteriën zich naar de weefsels zullen verplaatsen, waardoor bloedstalen negatieve resultaten zullen opleveren.

## **ANTIGEN DETECTIE TESTEN**

Antigendetectietesten kijken naar een uniek Lyme-eiwit in vloeistof (bijvoorbeeld bloed, urine, synoviaal vloeistof). Soms zijn mensen waarvan de indirecte testen negatief zijn, positief op deze test.

Onlangs werd de Nanotrap® LA Test nationaal bekend toen een subsidie van 1 miljoen USD werd toegekend door de Bill en Melinda Gates Foundation. Deze test maakt gebruik van de Nanotrap® technologie om directe Lyme antigenen in urine te meten met behulp van een Western blot formaat. De Nanotrap®-test is ontworpen om hoge gevoeligheid en nauwkeurigheid te bieden, waardoor u zeker resultaten krijgt in de vroegste infectiestadia. De Nanotrap® LA test maakt gebruik van een directe aanpak die een Lyme bacterieel antigeen identificeert, dat in het lichaam aanwezig is en kan worden gedetecteerd binnen dagen na de eerste infectie. Omgekeerd zal de Nanotrap® LA Test een negatief resultaat geven dat geen aanwezigheid van het antigeen aangeeft als de infectie met effectieve behandeling is geëlimineerd.

## ENERGETISCHE TESTEN

Er is geen "gouden standaard" om Lyme ziekte vast te stellen die 100% nauwkeurig is. Om deze reden diagnosticeren veel Lyme-literaire artsen *Borrelia* en co-infecties op basis van symptomen, laboratoriumtesten en onconventionele, maar soms meer geavanceerde alternatieve testen, zoals energetische testen.

Elektrodermale screeningsapparatuur (zoals de ZYTO of ASYRA) gebruiken bijvoorbeeld een softwareprogramma en de lichaamseigen galvanische huidrespons om energieke onevenwichtigheden in het lichaam te detecteren. Ze kunnen ook worden gebruikt om de energetische frequenties van een grote verscheidenheid aan pathogene microben te detecteren, en daarom ook de aanwezigheid van die microben. Een softwareprogramma aangesloten op een handvat of ander apparaat scant het lichaam voor infecties en andere onevenwichtigheden en geeft vervolgens een rapport van de verschillende pathogene organismen die vermoedelijk in het lichaam zijn en op welke niveaus. Veel Lyme Geletterde Doctors (LLMD), zoals Lee Cowden, beschouwen de ZYTO als meer dan 90% nauwkeurig. Andere apparaten kunnen minder of meer nauwkeurig zijn.

Toegepaste Kinesiologie, of spiersterkte testmethoden, zoals Autonome Reactie Testing (ART), die is ontwikkeld door de Lyme - geletterde arts Dietrich Klinghardt, zijn een andere manier om het lichaam te testen op infecties met behulp van de energie van het menselijk lichaam en het autonome zenuwstelsel. Toegepaste Kinesiologie kan zeer nuttig zijn om te helpen bij het opstellen van een diagnose.

Voor ART en een aantal andere algemene spierproefmethodes past de beoefenaar kracht toe aan een van de spieren van de patiënt (meestal de arm), terwijl hij een stof houdt (in dit geval de energieke handtekening of fysieke stof van een pathogeen) tegen het lichaam van de patiënt. Hij of zij zal dan de patiënt vragen zich te verzetten. Het autonome zenuwstelsel zal reageren op die stof of het pathogeen door een sterke of zwakke spierrespons te creëren in de arm van de geteste persoon, waardoor de praktijk aanwijst of het pathogeen in het lichaam is. Echter, nauwkeurige resultaten zijn grotendeels afhankelijk van de vaardigheid en ervaring van de beoefenaar.

## TESTEN OP CO-INFECTIES

Met de ziekte van Lyme ontstaan vaak gelijktijdige infecties. De klinische en pathologische gevolgen van co-infecties werden in de jaren negentig erkend (Mitchell en al. 1996). Hun pathologische synergie kan de ziekte van Lyme verergeren of soortgelijke aandoeningen veroorzaken. Co-infectie-middelen kunnen samen met *Borrelia burgdorferi* worden doorgegeven door een tekenbeet, die resulteert in meerdere infecties, maar een fractie van co-infecties komt onafhankelijk van de tekenbeet voor. Infecties veroorzaakt door deze pathogenen bij patiënten die niet door *Borrelia burgdorferi* zijn besmet, kunnen resulteren in klinische symptomen die vergelijkbaar zijn met die welke voorkomen bij de Lyme-ziekte. Dit geldt in het bijzonder voor infecties veroorzaakt door *Bartonella henselae*, *Yersinia enterocolitica* en *Mycoplasma pneumoniae*. *Chlamydia trachomatis* veroorzaakt voornamelijk polyarthritis. *Chlamydia pneumoniae* veroorzaakt niet alleen arthritis maar heeft ook invloed op het zenuwstelsel en het hart, waardoor de differentiële diagnose moeilijk is. De diagnose is nog complexer wanneer infecties optreden in combinatie met Lyme disease (Berghoff 2012).

Met betrekking tot hun testopties zijn ze vergelijkbaar met de testen voor Lyme borreliosis. PCR-, ELISA- en / of immunofluorescentiediagnostiek zijn beschikbaar voor de

meeste van hen, maar omvatten niet alle soorten. Ook moeten ze allemaal gecombineerd worden met de klinische presentatie.

- **-Babesia** - FISH (fluorescentie in situ hybridisatie - meest specifieke en gevoeligste), Giemsa-smeer, Immunofluorescentie (IFA), Serologie, PCR.
- **-Bartonella** -Voor Bartonella is er alleen een serologietest voor *B. henselae* en *B. quintana* en er is geen Western blot beschikbaar. Bartonella is zeer moeilijk te ontdekken doordat meerdere soorten bekend zijn (meer dan 30) en vaak georganiseerd zijn in biofilms (cellen en extracellulaire polymere stoffen bevatten, waardoor een matrix wordt gevormd die een fysieke barrière biedt voor het testen en behandelen). Onder de beschikbare diagnoses zijn er ook IFA (vrij onbetrouwbaar), PCR (behoefte aan meerdere sets en meestal falen bij biofilms), bloeduitslag, zelden: cultuur + PCR-tests. Als indirecte optie is het testen van vasculaire endotheliale groeifactoren (VEGF) vaak nuttig omdat Bartonellosis gepaard gaat met stimulering van de vorming van bloedvaten, het induceren van granulomen in verschillende gebieden van de huid (Kempf et al. 2001). VEGF-niveaus zullen stijgen in aanwezigheid van Bartonella-infectie, maar alleen als schimmelinfecties afwezig zijn. Als aanwezig, is kenmerkende Bartonella huiduitslag van grote diagnostische waarde.
- **-Brucella** - BrucellaCAPT, agglutinerende antilichamen, PCR.
- **-Ehrlichia / Anaplasma** - ELISA, EliSpot, PCR, Giemsa-smeer.
- **-Rickettsia** - PCRs, serologie / IFA testen.
- **-Coxiella**-PCR's, IFA-testen
- **-Tularemia (Francisella tularensis)** - antigeen detectie assays, ELISA, PCR, cultuur, direct fluorescerend antilichaam.
- **-Leptospira** - serologie, immunochromatografie.
- **-Leishmania** - serologie.
- **-Mycoplasma**-serologie (ELISA), PCR's (op bloed, sputum, swaps), bacteriële cultuur
- **-Chlamydia** -Western blot, ELISA, PCR, EliSpot.
- **-Yersinia** - Western blot (*Y. enterocolitica* en *Y. pseudopneumoniae*), EliSpot, antigeenonderzoek in ontlasting (alleen *Y. enterocolitica*).

Belangrijk, een immuungemedieerde respons op Yersinia-antigenen kan een belangrijke rol spelen bij de pathogenese van chronische ongedifferentieerde artritis en bij chronische ontsteking (Van der Heijden et al., 1997; Saebo & Lassen 1994).

- **-Epstein-Barr Virus (EBV)** - Western blot, PCR, EliSpot, serologie, antigeen test.
- **-Cytomegalovirus (CMV)** - Western blot, PCR, EliSpot, serologie, antigeen test.
- **-Coxsackie virus** - PCR's, antigeen test, serologie.
- **-Herpesvirussen** - serologie, PCR's.

De lijst van mogelijke co-infectanten is niet uitputtend. Nieuwe pathogenen worden vaak bewezen, evenals opportunistische infecties. Ook is er een nieuwe onderzoekstest in ontwikkeling en hopelijk wordt de bestaande manier van testen verbeterd.

## **INTEGRATIEVE BENADERING VOOR LATE / PERSISTENTE / CHRONISCHE TICK-BORNE INFECTIES**

Om een betere zorg voor patiënten te bieden met late / chronische en / of aanhoudende infecties die zeer moeilijk te ontdekken zijn, richt R.E.D. Laboratories ([www.redlabs.com](http://www.redlabs.com)) zich op een integratieve aanpak, met inbegrip van zowel directe pathogenen detectie als indirecte ondersteunende tests. Het algemene hoge falingspercentage van TBI-gerelateerde testen, met name bij late / persistente / chronische patiënten, onderstreept de noodzaak om zich te concentreren op de zelfgemelde symptomen van de patiënten en te overwegen en te onderzoeken welke mogelijke disregulaties en handicaps voortvloeien uit deze TBI.

Chronische TBD's kunnen elk ziekteproces nabootsen, inclusief het chronisch vermoeidheidssyndroom (myalgische encefalomyelitis), fibromyalgie, auto-immuuncondities, waaronder sero-negatieve reumatoïde artritis en MS, psychiatrische aandoeningen, waaronder depressie en angst, en significante geheugen- en concentratieproblemen die vroege dementie nabootsen. Om deze reden heet het de 'Grote Imitator' volgens dr. Richard Horowitz, zoals genoemd in zijn boek, 'Why Can't I Get Better?'.

Aanhoudende TBI's zijn gerapporteerd bij veel autistische patiënten (Bransfield et al., 2008; Kuhn et al., 2012; Kuhn & Bransfield 2014). Inderdaad, veel gespecialiseerde artsen richten zich op TBD's bij het beoordelen van autisme-spectrum aandoeningen.

Als een individu een chronisch gezondheidsprobleem heeft, variërend van artritis tot chronisch vermoeidheidssyndroom tot fibromyalgie, is het belangrijk om Lyme-ziekte uit te sluiten of te diagnosticeren. Het is duidelijk dat veel gevallen van fibromyalgie en chronisch vermoeidheidssyndroom eigenlijk Lyme-ziekte in vermomming zijn (Nicolson & Nicolson 1998).

Chronische Lyme-patiënten hebben ook vaak "co-infecties" zoals Mycoplasma, Chlamydia, Ehrlichia, Bartonella en Babesia. Dit zijn verschillende soorten "bugs" die van het gezelschap van *B. burgdorferi* genieten.

Patiënten met Lyme en TBD's kunnen zichzelf hoofdzakelijk presenteren met gastro-intestinale (GI) manifestaties. Deze patiënten kunnen complexe of persistente GI-symptomen hebben met betrekking tot het boven-, midden- of lager GI-kanaal. Het aantal patiënten dat zich voordoet met dergelijke symptomen bereikt waarschijnlijk epidemische proporties (Dr. Rahbar, ILADS Conference Augsburg 2015). Het testen van gastro-intestinale problemen moet worden opgenomen in de standaard onderzoeken.

Bijgevolg richt het **eerste integratieve paneel** zich op:

### **- *Borrelia* serologie IgG & IgM (immunoblot)**

Dit is een immuunanalyse (immunoblot) voor de detectie van IgG- en IgM-antilichamen tegen *Borrelia burgdorferi* in het menselijk serum, plasma of CSF. Het detecteert antilichamen tegen vier immunopathogene genospecies (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. Garinii*, *B. afzelii*, *B. spielmanii* en *B. bavariensis*). Juist deze methode maakt het

detecteren van p100, VisE, p58, p41, p39, OspA (zonder onderscheid van genospecies), OspC van alle genospecies en p18 van alle genospecies mogelijk. Het doel van de test is geen onderscheid te maken tussen genospecies, maar om de grootste dekking te bieden bij het opsporen van Lyme.

#### **- *Chlamydia serologie IgG & IgA / M (immunoblot)***

Dit is een immunoblot voor de detectie van IgG- en IgA-antilichamen tegen *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae* en *Chlamydophila psittaci*. Opvallend zijn, dat de teken geen Chlamydia dragen, maar Chlamydia's worden geactiveerd door infecties die vanuit een tekenbeet ontstaan zijn.

#### **- *Yersinia-serologie IgG & IgA / M (immunoblot)***

Een immunoblot voor het detecteren van IgG- en IgA-antilichamen tegen alle pathogene *Yersinia* door middel van *Yersinia*-externe eiwitten (YOP's). Serologische differentiatie van *Y. enterocolitica* en *Y. pseudotuberculosis* infecties is voor het eerst mogelijk met het gebruik van nieuwe species-specifieke *Yersinia* antigenen (PsaA, MyfA).

#### **- *Babesia FISH Test: Immunofluorescentie in situ detectie van Babesia infectie***

#### **- *PCR testen Mycoplasma infecties***

Er is gebleken dat teken dragers zijn van Mycoplasmas. Deze infecties verergeren, met name bij chronische patiënten, en met name die met auto-immuun aandoeningen. *Mycoplasma spp.* veroorzaakt het overstimuleren van de B-cellen, en het bevorderen van de autoimmune en reumatoïde ziekte. *Mycoplasma* verhoogt de productie van IL-1beta en IL-6.

#### **- *Een activiteitstest (LTT-MELISA of ELISPOT LTT)***

#### **- *CD57 absolute celtelling***

CD57 + / CD3-cellen zijn een subset van NK-cellen. Het absolute aantal CD57 + / CD3-cellen is laag bij patiënten die lijden aan chronische Lyme-ziekte. Patiënten met een zeer lage CD57 hebben aanzienlijk meer co-infecties en persistente immunologische defecten dan patiënten met hogere tellingen.

#### **- *PGE2 niveaus***

PGE2 is een verbinding afgeleid van membraan fosfolipiden, en is ook een belangrijke mediator van immuno pathologie bij chronische infecties en kanker. PGE2 verbetert zijn eigen productie, maar onderdrukt acute ontstekingsmediatoren, waardoor de overheersing in de late / chronische stadia van immuniteit leidt. PGE2 onderdrukt selectieve effectorfuncties van macrofagen en neutrofielen en de Th1-, CTL- en NK-cel gemedieerde type 1 immuniteit, maar bevordert Th2-, Th17- en regulerende T-cel responsen. PGE2 wordt waargenomen als significant up-gereguleerd bij chronische TBD patiënten (Professor De Meirleir, ILADS workshop Antwerpen 23/4/2016).

#### **-*IL-8***

Wanneer *Borrelia* migreert, wordt een multisystemische ontsteking gestart. Chemotaxis wordt uitgeoefend door IL-1 en TNF-alfa. Deze migratie induceert upregulatie van cytokinen, b.v. IL-8. IL-8 wordt waargenomen als zeer significant up-gereguleerd bij chronische TBD patiënten (Professor De Meirleir, ILADS workshop Antwerpen 23/4/2016).

## **- sCD14**

CD14 wordt uitgedrukt in monocyten / macrofagen en speelt een kritieke rol bij de herkenning van bacteriële celwandcomponenten (LPS). Het extracellulaire deel van CD14 kan worden gesplitst en vrijgegeven in het plasma, waar het circulerende LPS inactief zal worden. Serumoplosbare CD14-niveaus zijn significant verhoogd bij patiënten met ontstekingsdarmziekte en de ziekte van Crohn, maar ook bij patiënten met een brucellose- of Lyme-ziekte. Patiënten met vroege of onbehandelde late Lyme-ziekte hadden significant hogere niveaus van sCD14 dan gezonde controles (Lin et al. 2000).

## **- VEGF**

VEGF speelt een belangrijke rol bij pathologische aandoeningen die verband houden met auto-immuunziekten, zoals bij systemische lupus erythematosus (SLE), reumatoïde arthritis (RA) en multiple sclerose (MS). Abnormale hoge VEGF-niveaus in een vormloze omgeving zouden Bartonella-infectie voorstellen (Kempf et al. 2001)

## **- CD38**

CD38, die een belangrijke rol speelt bij dendritische cellen (DC) chemotaxis en migratie naar lymfeklieren, word sterk up-gereguleerd door LPS, maar praktisch helemaal niet door *Borrelia garinii* (meestal inducerende neuroborreliosis). Deze bevinding werd bevestigd met kwantitatieve RT-PCR en met flowcytometrie op het eiwitniveau. Bovendien liet RT-PCR zien dat CCR7 (getoond om dendritische celmaturing te stimuleren) 11 keer groter was in LPS gestimuleerde cellen dan in *Borrelia garinii* gestimuleerde cellen. Deze bevindingen suggereren dat *Borrelia garinii* cruciale DC-functies kan beïnvloeden door de regulatie van belangrijke moleculen bij DC-migratie naar lymfeklieren te blokkeren, waardoor verdere immuunresponsen bij de infectie van Lyme borreliosis worden beïnvloed (Hartiala et al., 2007). Om te bepalen of het onvermogen van *B. garinii* om CD38-expressie te veroorzaken, verband houdt met andere *B. burgdorferi* genospecies, stimuleerden Hartiala en collega's (J Immunol. 2010) DC met *B. burgdorferi sensu stricto* en *B. afzelii*. Geen van deze *Borrelia* genospecies induceerde CD38 upregulatie.

## **-Testen voor gastro-intestinale problemen**

### **1. MSA ontlastingstest**

R.E.D. Labs wetenschappers hebben een nieuwe procedure ontwikkeld en gevalideerd om bacteriële populaties te analyseren in een ontlastingstest: de MSA-analyse is een nieuwe moleculaire techniek waarbij sequentiebepaling van specifieke gebieden van bacterieel DNA (metagenomics) wordt toegepast. Deze test kan op dode organismen worden uitgevoerd (blootstelling aan zuurstof en bevriezing zijn geen probleem). Tot voor kort was onderzoek naar microbiota-samenstelling (darmflora) bijna uitsluitend gebaseerd op cultuur, terwijl (i) 40 tot 80% van de darmbacteriën niet gekweekt kunnen worden, (ii) identificatie van kolonies moeilijk kan zijn, (iii) bacteriën moeten leven: onderzoeken van anaerobe bacteriën moeilijk is, omdat er belangrijk verlies is tijdens het verzamelen en verwerken van stalen, (iv) de cultuurbenadering kan slechts een kleine fractie van alle bacteriële soorten (10%?) aanpakken. In tegenstelling hiermee is identificatie van elke bacterie door het vergelijken van de volgorde met openbare databases zeer nauwkeurig, niet subjectief, en door middel van high-throughput-technologie kunnen tientallen of zelfs honderden organismen in één staal worden geïdentificeerd.

## **2. Calprotectine in ontlasting**

Calprotectine is een cytosolisch neutrofiel eiwit met antimicrobiële eigenschappen, die aanwezig zijn bij verhoogde concentratie in de ontlasting tijdens de ontsteking van de darm.

## **3. D-lactaat in serum**

D-lactaat is een product van bacterieel metabolisme, het wordt niet geproduceerd of gemetaboliseerd door zoogdiercellen. Gewoonlijk zijn verhoogde D-lactaatgehalten te wijten aan bacteriële infectie of korte darm syndroom bij mensen. Een langzaam metabolisme kan hoge D-lactaat acidose en encefalopathie veroorzaken.

Aangezien blijvende infecties significante schade aan het lichaam veroorzaken, die moeten hersteld worden, dienen de volgende testen ook in overweging te worden genomen voor een **bredere integratieve aanpak** die zich niet alleen richt op de identificatie van de oorzaak van de infectie maar ook op de globale schade:

- Testen voor Tularemia (zoeken naar antilichamen tegen *Francisella tularensis*)
- Testen voor Brucellosis (BrucellaCapt analyse is zeer gevoelig en specifiek)
- Testen voor Coxiella, Anaplasma, Rickettsia, Bartonella (PCR en/of serologie)
- Testen voor EBV (bij voorkeur door immunoblot en PCR)
- Testen voor Herpesvirus infecties (HHV6)
- Testen voor MOLD infecties (vooral Candida)
- Testen voor ontsteking (cytokine niveaus (zie Grab et al. 2007) en oxidatieve stress): Ontsteking veroorzaakt vrije radicalen en oxidatieve stress die celmembranen, mitochondriën en zenuwcellen schaden, waardoor het ziekte-syndroom wordt veroorzaakt (vermoeidheid, pijn, cognitieve stoornissen, dysfunctie, stoornissen in de stemming).
- Testen voor complement (C3a en C4a): C4a lijkt een waardevolle immunologische marker te zijn bij patiënten met persistente symptomen van Lyme disease (Stricker et al., 2009).
- Testen voor zware metalen vergiftiging en voedingsgebreken (mineralen, vitaminen, enz.).
- Testen voor giftige metaboliëten (ammoniak, kynurenzuur en quinolinezuren).
- Testen voor autoantistoffen voor bindweefselziekten (ANA / ENA immunoblots).
- **Testen voor lekkende darm (Zonuline in ontlasting, antilichamen tegen darmbacteriën in serum)**

**IgA/IgM** tegen darmbacteriën: een antilichaam screeningsanalyse voor antilichamen (IgA en IgM) gericht tegen antigenen uit darmpathogenen. IgA worden afgescheiden van darmcellen, IgM worden geproduceerd door immuuncellen in het bloed. Bij gezonde personen zijn pathogene bacteriën alleen in kleine hoeveelheden in de darm, en antilichaam aantallen in het bloed zijn zeer laag. In het geval van bacteriële overgroei (dysbiose) worden echter grote hoeveelheden IgA geproduceerd en er wordt een aantal IgA in de bloedbaan gevonden. Bij een lekkende darm kunnen bacteriële eiwitten hun



weg naar de bloedbaan brengen, en wordt specifieke IgM geproduceerd. Daarom is een hoge score IgM voor darmbacteriën een indicator van verhoogde darmdoorlatendheid.

**ZONULIN ELISA** testen in ontlasting: Zonulin moduleert de permeabiliteit van strakke kruispunten tussen cellen van de wand van het spijsverteringskanaal. Naarmate het Zonulin-niveau stijgt, neemt de verbinding tussen de darmcellen af, waardoor ruimtes tussen cellen worden geopend waardoor veel macromoleculen rechtdoor kunnen gaan. Dit heet "lekkende darm".

#### – Testen voor darmonsteking (sIgA, EDN/EPX, beta-defensin-2)

**sIgA ELISA**-testen in ontlastingstalen: de sIgA-sleutelfunctie om zich te binden aan invasieve micro-organismen en toxinen en zich in de mucus laag of in de epitheelcellen vast te zetten, waardoor microbiële motiliteit wordt belemmerd, de organismen worden agglutinerend en hun exotoxinen neutraliseren en helpen vervolgens bij hun ongevaarlijke eliminatie van het lichaam in de fecale stroming. De concentratie van sIgA geeft ons informatie over de immuun verdediging van de darm: een gebrek aan sIgA duidt op een verminderde activiteit van het immuunsysteem van de darm, een verhoogd niveau van sIgA toont intestinale ontsteking.

**EPX / EDN ELISA** testen in ontlastingstalen: de accumulatie van EDN in de darm is geassocieerd met ontsteking en weefsel schade. Het meten van EDN in ontlasting kan dienen als een objectieve parameter voor een huidige klinische of subklinische chronische ontsteking in het maagdarmkanaal. Fecal EDN wordt beschouwd als het beste van de cytotoxische korrelproteïnen voor de beoordeling van darmontsteking, aangezien het accuraat klinische, endoscopische en histologische scores van ziekteactiviteit en slijmschade reflecteert. Verhoogde niveaus van fecale EDN zijn gekoppeld aan meerdere ontstekingsomstandigheden, zoals voedselallergie / gevoeligheid, pathogene infecties (*C. difficile* en *H. Pylori*), IBS en Eosinophilic Maagdarmstoornissen.

**β-defensin-2 ELISA**-testen in ontlasting monsters: de β-defensinen vormen een integraal onderdeel van het aangeboren immuunsysteem en dragen door hun antimicrobiële effect bij aan de barrièrefunctie van darmepitheelcellen. Defensines oefenen een variabele mate van antimicrobiële activiteit uit tegen bacteriën, schimmels en sommige omhulde virussen. De expressie van β-defensinen wordt geïnduceerd door pro-inflammatoire cytokinen en ook door micro-organismen (bijvoorbeeld *E. coli*, *H. pylori* of *P. aeruginosa*) en door probiotische micro-organismen. Een β-defensin-2-deficiëntie kan bijvoorbeeld worden waargenomen in het darmslijmvlies van patiënten met de ziekte van Crohn. Het verdedigingssysteem van het slijmvlies is daarom beperkt en kan een verhoogde invasie van bacteriën veroorzaken, wat mogelijk kan leiden tot een typische infectie bij patiënten met de ziekte van Crohn. Recente resultaten impliceren dat β-defensin-2 over expressie verband houdt met een actieve darmontsteking, vooral bij ulceratieve colitis.

Dit zijn niet de enige testen die nuttig kunnen zijn voor een integrale aanpak. Op basis van klinisch onderzoek selecteert de arts andere testen die van toepassing zijn. Een breed scala aan potentieel nuttige overwegingen staan vermeld in de boeken van Dr. Horowitz. Gespecialiseerde medische en wetenschappelijke conferenties zijn ook een goede bron van waardevolle informatie.

## TOEKOMSTIGE MOGELIJKHEDEN VOOR DIAGNOSTISCHE TESTEN

Omdat behandeling effectiever is in de vroege stadia van de Lyme-ziekte, is het een grote noodzaak om eenvoudige, snelle en nauwkeurige diagnostiek te ontwikkelen om te bepalen of mensen besmet zijn. Volgens het National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), hebben NIAID-gesteunde wetenschappers genomesequenties van meerdere stammen van *B. burgdorferi* geïdentificeerd. Verdere vooruitgang in diagnostiek wordt verwacht, omdat genetische informatie wordt gecombineerd met vooruitgang in microarray technologie, beeldvorming en proteomics. Deze groeiende vakgebieden zullen naar verwachting leiden tot verbeterde diagnostische hulpmiddelen en ook nieuwe inzichten geven in de pathogenese van de Lyme-ziekte. Voorbeelden van toekomstige hulpmiddelen die worden ontwikkeld met NIAID-ondersteuning, omvatten het gebruik van metabolomics om nieuwe biomarkers van infectie te identificeren, T-cel gebaseerde metingen van de volgende generatie en nieuwe antigenen voor een betere meting van een effectieve behandeling.

**TickPlex**, een nieuwe op nanotechnologie gebaseerde methode van een Finse groep, wordt momenteel uitgewerkt als een diagnostisch hulpmiddel voor meerdere infecties.

Enkele recente ontwikkelingen, die bijna klaar zijn om in de testpanelen te worden opgenomen, zijn de HybriSpot-techniek (van Master Diagnostica) met hun TICK-BORNE BACTERIA FLOW CHIP, dat de gelijktijdige detectie (door PCR en blot) van 7 teekgedragen bacteriën mogelijk maakt, genaamd: Rickettsia, Ehrlichia, Anaplasma, Francisella, Bartonella, Borrelia en Coxiella. Deze techniek is compatibel met mens-, dier- en tekenstalen. Hoewel de techniek extreem veelbelovend is, biedt de techniek nog steeds geen goede reproduceerbaarheid, waarbij veel verschillen en gebreken worden weergegeven wanneer meerdere bacteriële soorten samen worden gemengd.

Tenslotte, met de toenemende aandacht die vandaag aan TBI wordt toegekend, worden bestaande testen (zoals PCR's) ook voortdurend verbeterd en leiden deze tot betere resultaten.

Het delen van de informatie en het verspreiden van de kennis is de eerste stap naar verbeterde testen.

## LAATSTE OPMERKINGEN

Het samenvatten van Tekenbeet-gerelateerde testen is een enorme onderneming. Veel artikelen, boeken, websites, blogs, enz. zijn momenteel beschikbaar (zie hieronder een korte selectie) en meerdere conferenties worden elk jaar gehouden. Het doel van de huidige bijdrage was het gebruiken van een aantal van deze informatiebronnen als een handig hulpmiddel voor patiënten om een beter begrip van het nut, maar ook de beperkingen van beschikbare testen en de onderliggende redenen van mislukking te bevorderen. Het uiteindelijke doel was ook de nadruk te leggen op de noodzaak van een globale integratieve aanpak voor een beter beheer van TBI's.

*Bijdrage door Tatjana Mijatovic, PhD  
R.E.D. Laboratories CSO & Lab Manager \* [www.redlabs.com](http://www.redlabs.com)  
Vertaald in het Nederlands*

## REFERENTIES EN GEKOZEN BRONLEZEN:

Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin Microbiol Rev.* 18(3) :484-509, 2005.

Asch ES, Bujak DI, Weiss M, Peterson MG, Weinstein A.. Lyme Disease: an infectious and postinfectious syndrome. *J Rheum* 21:454-61, 1994.

Bakken LL, Case KL, Callister SM, et al. Performance of 45 laboratories participating in a proficiency testing program for Lyme Disease serology. *JAMA* 268:891-5, 1992.

Berghoff W. Chronic Lyme Disease and Co-infections: Differential Diagnosis. *Open Neurol J.* 6:158-78, 2012.

Berghoff W. *Open Neurol J.* 6:158-78, 2012.

Branda JA, Rosenberg, E.S. *Borrelia miyamotoi*: A lesson in disease discovery. *Ann Intern Med* 159: 61-2, 2013.

Bransfield RC, Wulfman JS, Harvey WT, Usman AI. The association between tick-borne infections, Lyme borreliosis and autism spectrum disorders. *Med Hypotheses.* 70(5):967-74, 2008.

Donta ST. Lyme Disease: A clinical challenge. *J Spirochet and Tick Dis* 2:50-51, 1995.

Donta ST. Late and chronic Lyme disease. *Med Clin North Am.* 86(2):341-9, 2002.

Embers ME, Barthold SW, Borda JT, Bowers L, Doyle L, Hodzic E, Jacobs MB, Hasenkampf NR, Martin DS, Narasimhan S, Phillippi-Falkenstein KM, Purcell JE, Ratterree MS, Philipp MT. Persistence of *Borrelia burgdorferi* in rhesus macaques following antibiotic treatment of disseminated infection. *PLoS One.* 2012;7(1):e29914. doi: 10.1371/journal.pone.0029914. Erratum in: *PLoS One.* 2013;8(9). doi:10.1371/annotation/f84663e3-0a2c-4243-8f97-3a58133c1b0f. *PLoS One.* 2012;7(4):10.1371/annotation/4cafed66-fb84-4589-a001-131d9c50aea6.

Forsberg P, Ernerudh J, Ekerfelt C, Roberg M, Vrethem M, Bergström S. 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.* 101(3):453-60, 1995.

Grab DJ, Nyarko E, Barat NC, Nikolskaia OV, Dumler JS. *Anaplasma phagocytophilum*-*Borrelia burgdorferi* co-infection enhances chemokine, cytokine, and matrix metalloprotease expression by human brainmicrovascular endothelial cells. *Clin Vaccine Immunol.* 14(11):1420-4, 2007.

Hartiala P, Hytönen J, Pelkonen J, Kimppa K, West A, Penttinen MA, Suhonen J, Lahesmaa R, Viljanen MK. Transcriptional response of human dendritic cells to *Borrelia garinii*-defective CD38 and CCR7 expression detected. *J Leukoc Biol.* 82(1):33-43, 2007.

Hartiala P, Hytönen J, Yrjänäinen H, Honkinen M, Terho P, Söderström M, Penttinen MA, Viljanen MK. TLR2 utilization of *Borrelia* does not induce p38- and IFN-beta autocrine loop-dependent expression of CD38, resulting in poor migration and weak IL-12 secretion of dendritic cells. *J Immunol.* 184(10):5732-42, 2010.

Horowitz Richard, book : Why Can't I Get Better? Solving the Mystery of Lyme and Chronic Disease. St Martin's Press US, 2013.

Horowitz Richard, book : How Can I Get Better? An Action Plan for Treating Resistant Lyme and Chronic Disease. St Martin's Press US, 2016.

Jin C, Roen DR, Lehmann PV, Kellermann GH. An Enhanced ELISPOT Assay for Sensitive Detection of Antigen-Specific T Cell Responses to *Borrelia burgdorferi*. *Cells*. 2(3):607-20, 2013.

Kempf VA, Volkmann B, Schaller M, Sander CA, Alitalo K, Riess T, Autenrieth IB. Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. *Cell Microbiol*. 3(9):623-32, 2001.

Kugeler KJ, Farley GM, Forrester JD, Mead PS. Geographic Distribution and Expansion of Human Lyme Disease, United States. *Emerg Infect Dis*. 21(8):1455-7, 2015.

Kuhn M, Bransfield R2. Divergent opinions of proper Lyme disease diagnosis and implications for children co-morbid with autism spectrum disorder. *Med Hypotheses*. 83(3):321-5, 2014.

Kuhn M, Grave S, Bransfield R, Harris S. Long term antibiotic therapy may be an effective treatment for children co-morbid with Lyme disease and autism spectrum disorder. *Med Hypotheses*. May 78(5):606-15, 2012.

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* 15: 4284-98, 2014.

Lin B, Noring R, Steere AC, Klempner MS, Hu LT. Soluble CD14 levels in the serum, synovial fluid, and cerebrospinal fluid of patients with various stages of Lyme disease. *J Infect Dis*. 181(3):1185-8, 2000.

Mitchell PD, Reed KD, Hofkes JM. Immunoserologic evidence of co-infection with *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti*, and human granulocytic *Ehrlichia* species in residents of Wisconsin and Minnesota. *J Clin Microbiol*. 34(3):724-7, 1996.

Nicolson GL, and Nicolson NL. Chronic infections as a common etiology for many patients with chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, and Gulf War Illness. *Intern J Med* 1:42-6, 1998.

Nordberg M, Forsberg P, Nyman D, Skogman BH, Nyberg C, Ernerudh J, Eliasson I, Ekerfelt C. Can ELISPOT Be Applied to A Clinical Setting as A Diagnostic Utility for Neuroborreliosis? *Cells*. 1(2):153-67, 2012

Pachner AR, Delaney E, O'Neill T, Major E. Inoculation of nonhuman primates with the N40 strain of *Borrelia burgdorferi* leads to a model of Lyme neuroborreliosis faithful to the human disease. *Neurology* 45:165-72, 1995.

Puri B, Segal D, Monro J. Diagnostic use of the lymphocyte transformation test-memory lymphocyte immunostimulation assay in confirming active Lyme borreliosis in clinically and serologically ambiguous cases. *Int J Clin Exp Med* 7(12):5890-5892, 2014.

Saebo A, Lassen J. *Yersinia enterocolitica*: an inducer of chronic inflammation. *Int J Tissue React*. 16(2):51-7, 1994.

Seltzer EG, Gerber MA, Carter ML, Freudigman K, Shapiro ED. Long-term outcomes of persons with Lyme disease. JAMA 283:609-616, 2000.

Shadick NA, Phillips CB, Logigian EL, Steere AC, Kaplan RF, Berardi VP, Duray PH, Larson MG, Wright EA, Ginsburg KS, Katz JN, Liang MH. The long-term clinical outcomes of Lyme Disease. Ann Intern Med 121:560-7, 1994.

Siniscalco D, Mijatovic T, Bosmans E, Cirillo A, Kruzliak P, Lombardi VC, De Meirleir K, Antonucci N. Decreased Numbers of CD57+CD3- Cells Identify Potential Innate Immune Differences in Patients with Autism Spectrum Disorder. In Vivo. 30(2):83-9, 2016.

Steere AC, Coburn J, Glickstein L. The emergence of Lyme disease. J Clin Invest. 113(8):1093-1101, 2004.

Steere AC. Lyme Disease. NEJM 345:115-25, 2001.

Stricker RB, Burrascano J, Winger E. Long term decrease in the CD57 lymphocyte subset in a patient with chronic Lyme disease. Ann Agric Environ Med. 9 :111-3, 2002.

Stricker RB, Johnson L. Lyme disease diagnosis and treatment: lessons from the AIDS epidemic. Minerva Med. 101(6):419-25, 2010.

Stricker RB, Savely VR, Motanya NC, Giclas PC. Complement split products c3a and c4a in chronic lyme disease. Scand J Immunol. 69(1):64-9, 2009.

Stricker RB, Winger EE. Decreased CD57 lymphocyte subset in patients with chronic Lyme disease. Immunol Lett. 76(1):43-8, 2001.

Sykes R. An Estimate of Lyme Borreliosis Incidence in Western Europe. Res Medica 22(1): 76-87, 2014.

Tilly K, Rosa PA, Stewart PE. Biology of infection with Borrelia burgdorferi. Infect Dis Clin North Am. 22(2):217-34, 2008.

Valentine-Thon E, Ilsemann K, Sandkamp M. A novel lymphocyte transformation test (LTT-MELISA) for Lyme borreliosis. Diagn Microbiol Infect Dis. 57(1):27-34, 2007.

van der Heijden IM, Res PC, Wilbrink B, Leow A, Breedveld FC, Heesemann J, Tak PP. Yersinia enterocolitica: a cause of chronic polyarthritis. Clin Infect Dis. 25(4):831-7, 1997.

Wormser G, Nadelman RB, Dattwyler RJ, Dennis DT, Shapiro ED, Steere AC, Rush TJ, Rahn DW, Coyle PK, Persing DH, Fish D, Luft BJ. Practice guidelines for the treatment of Lyme disease. Clin Infect Dis 31(S1):S1-S14, 2000.

#### **WEBSITES :**

<http://whatislyme.com/tom-grier-microbiologist/>

[www.redlabs.com/](http://www.redlabs.com/)

<http://www.ceresnano.com/>

[www.prohealth.com](http://www.prohealth.com)

[www.ilads.org](http://www.ilads.org)

<https://www.arminlabs.com/>

[www.igenex.com/](http://www.igenex.com/)

[www.bca-lab.de/](http://www.bca-lab.de/)

<http://labo-barla.eu/>

<http://www.klinghardtacademy.com/>

[www.melisa.org/](http://www.melisa.org/)

<http://tickplex.com/>  
<http://norvect.no/>  
[www.tiredoflyme.com](http://www.tiredoflyme.com)  
[www.columbia-lyme.org](http://www.columbia-lyme.org)  
[www.lymediseasechallenge.org](http://www.lymediseasechallenge.org)  
[www.lymeneteurope.org](http://www.lymeneteurope.org)  
[www.ticktalkireland.org](http://www.ticktalkireland.org)  
[www.tekentiques.net](http://www.tekentiques.net)  
[www.lymeresearchalliance.org](http://www.lymeresearchalliance.org)  
[www.emedicine.medscape.com](http://www.emedicine.medscape.com)  
[www.lymediseaseaction.org.uk](http://www.lymediseaseaction.org.uk)  
[www.lymedisease.org](http://www.lymedisease.org)  
[www.labtestsonline.org](http://www.labtestsonline.org)  
<https://canlyme.com>  
[www.francelyme.fr](http://www.francelyme.fr)

**CONFERENCES:**

ILADS Augsburg 25-26/4/ 2014  
ILADS Augsburg 8-9/5/2015  
ILADS Helsinki 11-12/6/2016  
2nd Lyme-Disease Update, Klagenfurt 25/4/2015  
BBOW-APSO Lyme Conference, Antwerp 12-13/9/2015  
France Lyme Conference, Paris 14/11/2015  
ILADS one-day workshop Antwerp 23/4/ 2016  
The Tick Factor, Amsterdam 17-18/9/2016