

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/21004> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Burgel, Nathalie Daniëlle van

Title: Host-pathogen interactions in Lyme disease and their application in diagnostics

Issue Date: 2013-05-29

**Samenvatting
voor de niet
medisch
onderlegde lezer**

De ziekte van Lyme is een infectie van de mens met de bacterie *Borrelia burgdorferi*. Deze bacterie wordt door middel van een tekenbeet overgedragen. Teken nemen normaal een aantal maal in hun leven een bloedmaaltijd, meestal op (kleine) knaagdieren of vogels, maar soms ook op de mens. Tijdens het leven van de teek kan deze bij een bloedmaaltijd besmet worden met *B. burgdorferi*. Gedurende de volgende bloedmaaltijd van de besmette teek kan *B. burgdorferi* worden overgedragen op een gastheer. Na overdracht van de bacterie kan een mens na enkele weken ziek worden, maar dat hoeft niet noodzakelijk zo te zijn. Als iemand wel een infectie krijgt dan is de meest bekende uiting een erythema migrans; een vaak typische rode vlek die er uit kan zien als een bull's eye (zie fig. 1, pag. 19). Deze kan uitbreiden, maar uiteindelijk ook weer verdwijnen. Sommige mensen met de infectie hebben deze vlek nooit gezien of überhaupt nooit gekregen. Latere uitingen van de ziekte kunnen onder meer een verlamming van het gezicht (facialis parese), een pijnlijke huid op een gedeelte van het lichaam (radiculitis), een ontsteking aan een groot gewricht (arthritis), of een lang bestaande infectie van de huid (acrodermatitis chronicum atrophicans) zijn. De ziekte kan in principe goed worden behandeld met antibiotica. Helaas zijn er na de behandeling soms restverschijnselen, waarvan lastig kan worden onderscheiden of dit een restverschijnsel, een recidief van de infectie of een nieuwe infectie is.

B. burgdorferi is een spirocheet; een kurketrekker-vormige bacterie. Het gehele complex, *B. burgdorferi sensu lato* (sl; in brede zin), bestaat uit enkele subspecies, waaronder *B. burgdorferi sensu stricto* (ss), *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. spielmanii*, *B. valaisiana*, maar ook nog vele andere soorten. De eerste vijf soorten zijn duidelijk geassocieerd met ziekte in mensen. In de VS komt alleen *B. burgdorferi ss* voor, terwijl in Europa en Azië meerdere soorten naast elkaar kunnen voorkomen. Verschillende soorten zijn geassocieerd met verschillende ziektebeelden, maar dit is geen zwart-wit verdeling. *B. burgdorferi ss* is vooral geassocieerd met het erythema migrans en de arthritis klachten; *B. garinii* en *B. bavariensis* met de neurologische klachten en *B. afzelii* met de uitingen in de huid.

Als de teek een gastheer bijt en begint met een bloedmaaltijd dan krijgt *B. burgdorferi* een signaal waardoor hij zich gaat klaarmaken voor overdracht. Op het buitenmembraan van de bacterie komen eiwitten tot uiting die de bacterie helpen met de overdracht naar de gastheer. De bacterie verplaatst zich vanuit de darm naar de speekselklieren van de teek, om daarna via het speeksel in de huid of bloedbaan van de gastheer terecht te komen. Eenmaal in de mens

probeert de bacterie een infectie te veroorzaken. Eén van de eerste hordes die de bacterie moet overwinnen is het complementsysteem van de gastheer.

Het complementsysteem is de eerste afweer tegen binnendringende micro-organismen. Het complementsysteem bestaat uit een aantal eiwitten die kunnen binden aan het membraan van cellen en bacteriën. Deze eiwitten kunnen een complex op het membraan vormen waardoor de bacterie zal sterven. Praktisch alle gewervelde dieren bezitten een complementsysteem. Het is het zogenaamde aangeboren (innate) afweersysteem. Dit type afweer hoeft niet speciaal de bacterie eerder gezien te hebben om het membraan van de bacterie te kunnen herkennen en te doden. Het menselijk lichaam bezit eiwitten, onder andere factor H en factor H-like eiwit, om de lichaamseigen cellen te beschermen tegen de vernietigende eiwitten van het complementsysteem.

Sommige *B. burgdorferi* soorten kunnen binden aan factor H en factor H-like eiwit uit het bloed van de gastheer om zichzelf tegen activatie van het complementsysteem te beschermen. De eiwitten van de bacterie die kunnen binden aan factor H en factor H-like eiwit heten Complement Regulatory Acquired Surface Proteins (CRASP) 1 t/m 5. De verschillende CRASPs komen ieder op een ander moment tijdens de infectie tot uiting. Niet elke soort *B. burgdorferi* is even goed in het omzeilen van het complementsysteem. Zo is bekend dat *B. burgdorferi* ss en *B. afzelii* dit goed kunnen en dus ongevoelig is voor menselijk complement zijn. *B. garinii* is echter redelijk gevoelig, terwijl *B. bavariensis* (eerder bekend als *B. garinii* OspA serotype 4) redelijk ongevoelig is. CRASP-1 is een eiwit wat heel vroeg in de infectie een rol speelt. CRASP-1 komt tot uiting op het membraan van de bacterie net voor tot kort na de overdracht vanuit de teek. CRASP-1 beschermt dus de bacterie in een heel vroeg stadium van de infectie tegen het complement van de mens. Van *B. burgdorferi* ss, *B. afzelii* en *B. garinii* waren de CRASP-1 eiwitten al ontdekt en beschreven. Van *B. bavariensis* die relatief ongevoelig voor complement is, waren nog geen CRASP eiwitten beschreven.

In **hoofdstuk 2** wordt aangetoond dat *B. bavariensis* complement ongevoelig is en dat de bacterie kan voorkomen dat complement wordt geactiveerd op het buitenmembraan van de bacterie. Van *B. bavariensis* kloneren en zuiveren we enkele van de mogelijk geïdentificeerde CRASP-1 eiwitten van het lineaire plasmide 54. Deze eiwitten heten BGA66, 67, 68 en 71 en hadden een, tot dusver, onduidelijke functie. We tonen via verschillende technieken aan dat twee van deze eiwitten, BGA 66 en BGA 71, kunnen binden aan factor H aan factor H-like eiwit van de mens. Daarnaast laten we zien dat bij binding het actieve deel van factor H en factor H-like eiwit nog steeds beschikbaar is.

Hierdoor kan bij binding van factor H en factor H-like eiwit, aan BGA 66 en BGA71 op het celmembraan van de bacterie, geen complement worden geactiveerd op het celmembraan van de bacterie en kan de bacterie niet door het complement worden gedood.

Naast het feit dat verschillende *B. burgdorferi* soorten verschillen in gevoeligheid voor menselijk complement verschilt deze gevoeligheid ook tussen diersoorten. Zo is *B. garinii* bijvoorbeeld juist minder gevoelig voor complement van vogelsoorten. We vermoedden dat de familie van eiwitten die we hebben gekloneerd niet alleen menselijk factor H kunnen binden, maar ook factor H van andere diersoorten. Van de vier eiwitten die gezuiverd zijn werd bepaald of ze aan factor H van een muis, koe, paard, hond, poes, varken of vogel konden binden. Hierbij werd duidelijk dat de verschillende geteste BGA eiwitten kunnen binden aan factor H van verschillende diersoorten. Dit verklaart voor een gedeelte mogelijk de grote verscheidenheid aan gastheren die *B. burgdorferi* kan infecteren. De volgende stap is kijken of de verschillen in gevoeligheid voor complement tussen de verschillende borrelia-soorten meetbaar zijn tijdens een infectie in een gastheer.

In **hoofdstuk 3** infecteren we wildtype en muizen met een niet werkend complementsysteem (C3^{-/-}) met verschillende soorten van het *B. burgdorferi* si complex. Hierdoor kunnen we zien of de efficiëntie van de infectie hoger is in C3^{-/-} muizen en of de mate van complementongevoeligheid van de borrelia-soort effect heeft op de manier waarop de infectie wordt veroorzaakt.

Pathologisch en moleculair (PCR) onderzoek van deze muizen wijst uit dat *B. burgdorferi* en *B. afzelii* een goede infectie kunnen bewerkstelligen, dit was onafhankelijk van de aanwezigheid van complement. *B. bavariensis* was niet detecteerbaar met pathologisch onderzoek, maar wel met PCR. Wederom was dit onafhankelijk van de aanwezigheid van complement. *B. garinii* en *B. valaisiana* waren niet in staat een infectie te geven in de muizen, zowel in de C3^{-/-} muizen als in wildtype muizen. Vermoedelijk speelt de mate van gevoeligheid voor complement wel een grote rol, maar is de infectie van *B. burgdorferi* zo afhankelijk van een hele reeks van factoren en eiwitten, waaronder CRASP 1 t/m 5, dat het moeilijk is het effect van één eiwit in een *in vivo* experiment te onderzoeken. Wel werd ook duidelijk in dit experiment dat PCR gevoeliger is dan pathologie in de detectie van *B. burgdorferi* in de weefsels van de geïnfecteerde gastheer.

Het aantonen van *B. burgdorferi* in de gastheer is belangrijk om een actieve infectie te kunnen bevestigen. Bij het diagnosticeren van infecties van micro-organismen die niet of slecht te kweken zijn is serologie vaak de eerste keus. Bij serologie toont men de antilichamen aan die gemaakt worden door het lichaam als reactie op de infectie. Antilichamen worden gemaakt tegen stukjes eiwit (antigenen) van de bacterie. Antilichamen kunnen levenslang aantoonbaar blijven, maar soms ook weer dalen over de tijd, als het antigeen niet meer aanwezig is.

Bij serologische diagnostiek kan gebruikt worden gemaakt van verschillende technieken: de enzyme immunoassay (EIA) of de immunoblot. Volgens de richtlijnen is de methode van voorkeur een screening van het bloed met EIA en, indien deze positief is, dit te bevestigen met een immunoblot. Het laatste decennium is er veel onderzoek gedaan naar geschikte antigenen voor deze diagnostiek. Daarbij lijkt in het bijzonder het C6-peptide veelbelovend: de antistoffen tegen dit antigeen kunnen al twee weken na een infectie duidelijk aantoonbaar zijn. Daarnaast is het tussen de verschillende soorten *B. burgdorferi* nagenoeg identiek, waardoor het niet noodzakelijk is een mix van alle soorten te gebruiken. Een ander bijzonder voordeel is dat de hoeveelheid antilichaam tegen C6-peptide ook weer snel kunnen dalen na behandeling. Dit is voornamelijk in patiënten die maar kort een infectie hebben gehad, maar minder uitgesproken in patiënten die een langer bestaande infectie hadden.

Wanneer de infectie met *B. burgdorferi* tot uiting komt in de hersenen (neuroborreliose) wordt er niet alleen gekeken naar de antilichamen in het bloed, maar ook naar antilichamen in de hersenvloeistof (liquor). Als er relatief meer antilichamen in de liquor zitten dan in het bloed dan maakt dat een infectie van het zenuwstelsel zeer waarschijnlijk. Dit heeft invloed op de keuze van behandeling. Naast deze antilichaamindex wordt er ook gekeken naar tekenen van ontsteking (inflammatie) aan de hersenen in het algemeen, zoals het aantal witte bloedcellen in de liquor. Na behandeling nemen de tekenen van algemene ontsteking snel af, maar de antilichaamindex kan enkele jaren positief blijven, ook in mensen die helemaal geen klachten meer hebben.

In **hoofdstuk 4** wordt er gekeken naar de toepasbaarheid van een screeningstest op liquor voor C6-peptide om de diagnose neuroborreliose te bevestigen. Het blijkt dat de C6-peptide (IgG/IgM) EIA zeer geschikt is om te screenen op neuroborreliose (gevoeligheid 97%), maar dat deze test niet goed gebruikt kan worden om de diagnose te bevestigen. De specificiteit bij mensen die antilichamen tegen *B. burgdorferi* in het bloed hebben is 83%, dat betekent dat sommige mensen een positieve testuitslag krijgen, terwijl ze geen

neuroborreliose hebben. De hoeveelheid antilichamen verschilde echter tussen de groep met een neuroborreliose en de overige patiënten. De relatieve Lyme index waarden waren gemiddeld veel hoger in de neuroborreliose groep dan in de Lyme patiënten groep, echter op individueel niveau heeft dit weinig praktische waarde.

De sterke beperking van de serologie is het gebrek aan de mogelijkheid een actieve infectie te bevestigen in een patiënt die al serologisch positief is door een eerdere, behandelde of door het eigen afweersysteem opgeruimde, infectie. Een test die een actieve infectie met *B. burgdorferi* kan bevestigen in deze patiëntengroep, is wenselijk.

In **hoofdstuk 5** kijken we naar chemokine CXCL13 in liquor als biomarker voor een actieve infectie met *B. burgdorferi*. In patiënten met neuroborreliose is deze biomarker in alle patiënten licht tot zeer sterk verhoogd. Als op basis van een vergelijking met andere inflammatoire ziekten een afkapwaarde wordt gekozen van 250 pg/ml liquor dan was bij 88% van de patiënten deze biomarker verhoogd. In de meeste patiënten met neuroborreliose is deze biomarker zelfs zeer sterk verhoogd. In de controles zonder inflammatoire aandoening was deze biomarker bij niemand verhoogd. Bij patiënten met inflammatoire aandoeningen was de waarde van CXCL13 zeer wisselend, doch in de overgrote meerderheid van de patiënten lag de waarde onder 250 pg/ml. Een opvallende bevinding was dat bij veel HIV-positieve patiënten CXCL-13 verhoogd was.

Daarnaast bleek bij patiënten met neuroborreliose, dat na het starten van behandeling dat de waarde van CXCL13 in de liquor zeer snel daalt, waardoor deze biomarker een rol zou kunnen krijgen in de follow-up bij behandeling. De marker lijkt daarom een veelbelovende rol te kunnen gaan spelen in de diagnostiek naar neuroborreliose. Het is echter van belang deze marker niet als enige te gebruiken, maar dit te combineren met de klinische uiting, de serologie en eventueel PCR, gezien de aanwezige aspecificiteit bij andere inflammatoire aandoeningen.

Serologie kan levenslang positief blijven, ook als er geen infectie meer is. Een positieve serologische test betekent dus niet per definitie dat de klachten ook worden veroorzaakt door een infectie met *B. burgdorferi*. In **hoofdstuk 6** wordt een patiëntenpopulatie van de vroege artritiskliniek (EAC) gescreend op antilichamen en de aanwezigheid van een infectie met *B. burgdorferi*. In deze populatie blijkt dat ongeveer 2,0-4,5% van de EAC-populatie antistoffen heeft tegen *B. burgdorferi*. Na uitgebreid onderzoek, waaronder het uitsluiten van

andere aandoeningen, bleek dat slechts 0,5 tot maximaal 1,2 % van de totale populatie ook werkelijk de een infectie met *B. burgdorferi* heeft. Dat betekent dat wanneer een patiënt met artritis wordt getest op de ziekte van Lyme, zonder te letten op specifieke kenmerken van Lyme, bij een positieve testuitslag de kans slechts 12-28% is dat deze patiënt daadwerkelijk Lyme heeft. Als men preselekt op kenmerken van Lyme en alleen die patiënten test die mogelijk een infectie met *B. burgdorferi* hebben op basis van klinische parameters, bijvoorbeeld onder andere “betrokkenheid van de grote gewrichten” dan kan deze kans worden verhoogd naar 42-85%. Deze studie benadrukt het belang van het inschatten van de a priori kans dat de patiënt een infectie met *B. burgdorferi* heeft voordat de dokter besluit *B. burgdorferi* antilichamen te testen.

In **hoofdstuk 7** wordt een HIV-positieve patient met neuroborreliose beschreven. Deze patiënte had een zeer progressieve infectie van de hersenen, met als uiting een forse afwijking aan het looppatroon. Haar infectie met HIV was op dat moment goed onder controle. Op de MRI-scans van de hersenen waren duidelijk afwijkingen waar te nemen. Deze uiting is al eerder beschreven bij een neuroborreliose, maar in deze patiënte met HIV verliep de ziekte sneller dan te verwachten was. Dit leidde tot de hypothese dat een infectie met *B. burgdorferi* mogelijk heftiger verloopt in een patiënt met HIV dan in een verder gezonde patiënt. Een dergelijk verschijnsel is eerder beschreven bij HIV-patiënten, namelijk bij een infectie met *T. pallidum*, oftewel syfilis, een andere spirocheetsoort. Dit afwijkende beloop zou te maken kunnen hebben met de eerder genoemde CXCL13-receptor. Een HIV-infectie heeft onder meer een effect op B-cellen (antilichaam producerende cellen) van het immuunsysteem, waarbij de CXCL13 receptor door de infectie met HIV op deze cellen minder tot uiting komt. Hierdoor verloopt de reactie op antigenen, waar de CXCL13-receptor voor nodig is, minder efficiënt. Dit zou een verklaring kunnen zijn voor de verminderde afweer tegen *B. burgdorferi*, bij een HIV-infectie. Deze hypothese moet echter nog nader worden onderzocht.

De diagnostiek naar een infectie met *B. burgdorferi* heeft te kampen met een aantal problemen. De serologie is niet altijd eenduidig te interpreteren. Er zijn meerdere serologische testen en ook biomarkers die kunnen helpen bij het stellen van de diagnose. Het is van belang alle beschikbare klinische gegevens en de combinatie van testen en hun beperkingen te interpreteren op een individuele basis. Hierbij is samenwerking van de clinicus met een arts-microbioloog wenselijk om de juiste diagnose te kunnen stellen in het belang van de patiënt.