

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIENE
BILTHOVEN

Rapport nr. 528911001

LYME-BORRELIOSE BIJ UITVOEREND PERSONEEL
VAN STAATSBOSBEHEER en AANDACHTSPUNTEN
VOOR EPIDEMIOLOGISCH VERVOLGONDERZOEK

L.G. Wiessing, H. Houweling, H. Kuiper,
B.M. de Jongh, L. Spanjaard,
A.P. Nauta, A.W. Moll van Charante

januari 1991

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van het
Ministerie van Welzijn, Volksgezondheid en Cultuur, Directie
Algemene Gezondheidszorg en de Directie van het RIVM.

VERZENDLIJST

- 1-3 Directie Algemene Gezondheidszorg van het Ministerie van
Welzijn, Volksgezondheid en Cultuur.
- 4 Directie van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en
Milieuhygiëne
- 5 Directeur-Generaal van de Volksgezondheid
- 6 Plv. Directeur-Generaal van de Volksgezondheid
tevens Hoofddirecteur Financiering en Planning
- 7 Hoofddirecteur Gezondheidsbescherming
- 8 Hoofddirecteur Gezondheidszorg
- 9-13 Geneeskundige Hoofdinspectie van de Volksgezondheid,
afd. Infectieziekten
- 14-19 Staatsbosbeheer
- 20 Prof. dr. ir. D. Kromhout
- 21 Dr. L.H. Lumey
- 22 Drs. S. Rijpkema
- 23-32 Centrum voor Infectieziekten Bestrijding RIVM
- 33 Dr. H. Bruins
- 34 Drs. P.A.D. Bouma
- 35 Depot Nederlandse publikaties en Nederlandse bibliografie
- 36-42 Auteurs
- 43-44 Adviseurs
- 45-46 Bureau projecten- en rapportenregistratie
- 47-48 Bibliotheek RIVM
- 49-80 Reserve exemplaren

WOORD VOORAF

Het eerste deel van dit rapport geeft een verslag van het in de zomer van 1989 uitgevoerde onderzoek naar Lyme-ziekte, onder 127 werknemers van de buitendienst van Staatsbosbeheer. Dat project is exploratief van karakter en moet als basis dienen voor verder epidemiologisch onderzoek bij risicogroepen voor Lyme-ziekte.

In het tweede deel van het rapport worden aspecten belicht die van belang kunnen zijn voor verschillende vormen van eventueel vervolgonderzoek. Hieruit volgen tenslotte enkele concrete aanbevelingen.

In dit rapport is geprobeerd epidemiologisch en medisch jargon te vermijden en zijn epidemiologische begrippen zoveel mogelijk toegelicht.

Het project is uitgevoerd door het Centrum voor Epidemiologie van het RIVM in Bilthoven (LGW, HH), de afdelingen Neurologie (HK) en Medische Microbiologie (BMdeJ, LS) van het Academisch Medisch Centrum in Amsterdam en de afdeling Onderzoek en Ontwikkeling van de Bedrijfsgezondheidsdienst RBB in Den Haag (APN, AWMvanC). Projectsubsidie werd verleend door het Ministerie van WVC.

Wij zijn Dr. L.H. Lumey en Drs. S. Rijpkema zeer erkentelijk voor de adviezen en het commentaar op de concepttekst.

INHOUDSOPGAVE

VERZENDLIJST	ii
WOORD VOORAF	iii
INHOUDSOPGAVE	iv
ABSTRACT	vi
SAMENVATTING	vii
1 LYME-BORRELIOSE BIJ UITVOEREND PERSONEEL STAATSBOSBEHEER	1
1.1 Inleiding	1
1.2 Vraagstelling	1
1.3 Methoden	2
1.3.1 Steekproef	2
1.3.2 Opzet	2
1.3.3 Odds ratio	2
1.4 Resultaten en discussie	3
1.4.1 Prevalentie	3
1.4.2 Risicofactoren	3
1.4.3 Preventieve maatregelen	5
1.4.4 Klinische verschijnselen	6
1.4.5 Healthy worker effect	7
1.5 Conclusies	7
2 AANDACHTSPUNTEN VOOR VERVOLGONDERZOEK	8
2.1 Onderzoekspopulatie	8
2.2 Prevalent onderzoek	8
2.2.1 Prevalentie	8
2.2.2 Steekproefomvang	9
2.2.3 Tijdstip meting	9
2.2.4 Nonrespondentbias	10
2.3 Incident onderzoek	10
2.3.1 Incidentie	10
2.3.2 Verwachte incidentie	11
2.3.3 Grootte van onderzoeksgroep	12
2.3.4 Schone populatie	12
2.3.5 Regressie naar het gemiddelde	13
2.3.6 Inductieperiode	14
2.3.7 Latentieperiode	14

2.4	Natuurlijk beloop	15
2.4.1	Follow-up	15
2.4.2	Reseroconversie	16
2.4.3	Eerste stadium	17
2.4.4	Tweede stadium	17
2.4.5	Derde stadium	18
2.5	Serologische testen	19
2.5.1	Werkingsprincipe	19
2.5.2	Kwaliteit van serologische testen	20
2.6	Preventieve maatregelen	21
2.6.1	Tekebeten	21
2.6.2	Teken verwijderen	22
2.6.3	Tekenwerende middelen	22
2.6.4	Bestrijding tekenpopulatie	22
2.6.5	Dataverzameling tekebeten	23
2.7	Aanbevelingen voor vervolgonderzoek	24
	LITERATUUR	26

ABSTRACT

Lyme borreliosis among Dutch forestry workers and considerations for epidemiological follow-up.

An account is given of a first exploratory study on the prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* among Dutch forestry workers and on the association of seropositivity with signs and symptoms suggestive of Lyme disease and with medical and occupational history. Of the 127 participants 25 (20%) had serological evidence of past or present infection. Most infections were asymptomatic.

Furthermore, methodological considerations are given for a possible follow-up study, with regard to prevalence, incidence, natural history, serological testing and preventive measures.

SAMENVATTING

Een eerste, exploratieve studie wordt beschreven naar het vóórkomen van antistoffen tegen Lyme-ziekte bij werknemers van de buitendienst van Staatsbosbeheer en naar de samenhang van seropositiviteit met klinische verschijnselen en risicofactoren. Van de 127 deelnemers bleken 25 (20%) seropositief. De meeste infecties waren asymptomatisch verlopen.

Vanuit de ervaringen die met dit onderzoek zijn opgedaan worden aandachtspunten voor vervolgonderzoek naar voren gebracht met betrekking tot prevalentie, incidentie, natuurlijk beloop, serologische testen en preventieve maatregelen.

De volgende aanbevelingen worden gedaan voor vervolgonderzoek: een grotere, aselechte steekproef zou moeten worden genomen van rond de 400 mensen. De bloedmonsters moeten bij voorkeur met meer dan één test worden geanalyseerd op antistoffen. Er kan worden volstaan met een minder uitgebreid lichamelijk onderzoek. Seropositieve deelnemers moeten langdurig gevolgd worden om inzicht te krijgen in het natuurlijk beloop van Lyme-ziekte. Informatie over expositievariabelen moet meer gedetailleerd worden verzameld.

1 LYME-BORRELIOSE BIJ UITVOEREND PERSONEEL STAATSBOSBEHEER*

1.1 Inleiding

Lyme-ziekte (Lyme-borreliose) komt op veel plaatsen in de wereld voor, o.a. in heel Europa en in de V.S.,¹ waar er de laatste jaren veel onrust over is ontstaan. Vooral in bosrijke gebieden is daar het aantal nieuwe patiënten sterk toegenomen. Het meest kenmerkende symptoom van Lyme-ziekte is het erythema chronicum migrans (ECM). Dit is een rode vlek met een doorsnee van 5 tot 50 cm. die binnen enkele dagen tot weken na de besmetting ontstaat en geleidelijk groter wordt. Na of tegelijkertijd met deze huidafwijking kunnen neurologische, gewrichts- of cardiale aandoeningen ontstaan (in volgorde van frequentie van voorkomen). Lyme-ziekte wordt veroorzaakt door een bacterie, de spirocheet *Borrelia burgdorferi*, die verwant is aan de veroorzaker van syfilis. De bacterie wordt overgebracht door teken, kleine spinachtige beestjes die vooral in bossen voorkomen. Behandeling met antibiotica is meestal effectief.^{1,2}

Er is tot onderzoek besloten omdat over de epidemiologische situatie van Lyme-ziekte in Nederland nog weinig bekend was. Ook de relatie van serostatus met lichamelijke klachten is nog onvoldoende duidelijk. Wel worden regelmatig patiënten gerapporteerd met Lyme-ziekte^{3,4,5,6} en is al op meerdere plaatsen in Nederland een hoog percentage van gevangen teken besmet gebleken.^{7,8,9}

1.2 Vraagstelling

- Wat is het vóórkomen van infecties met *Borrelia burgdorferi* onder het uitvoerend en technisch personeel van Staatsbosbeheer?
- Is er een samenhang tussen infectie, ziekteverschijnselen en arbeidsverleden?
- Wat zijn aandachtspunten voor een eventueel volgend incidentieonderzoek?

* De tekst van hoofdstuk 1 is in iets andere vorm verschenen als artikel in het Infectieziektenbulletin, juli 1990.

1.3 Methoden

1.3.1 **Steekproef**

Er is een getrapte clustersteekproef getrokken, waarbij eerst zes vestigingen van de Bedrijfsgezondheidsdienst RBB zijn gekozen. Vervolgens zijn uit de regio's van de RBB-vestigingen 21 beheerseenheden van Staatsbosbeheer getrokken. Uit het totaal van 790 werknemers in uitvoerende en technische dienst resulteerde zo een steekproef van 177 werknemers, waarin alleen mannen voorkwamen. Hiervan stemden 127 mannen met deelname in, een respons van 72%.

1.3.2 **Opzet**

De gegevens zijn in twee fasen verzameld. Eerst werd de mensen gevraagd om mee te doen waarbij direct een paar vragen werden gesteld zoals functie, leeftijd en aantal dienstjaren. Van degenen die bereid waren om mee te doen werd bloed afgenomen. De bloedmonsters werden met de immunofluorescentie-assay (IFA), een algemeen gebruikte test, onderzocht op de aanwezigheid van antistoffen tegen *Borrelia burgdorferi*. Sera die positief reageerden werden onderzocht met behulp van de TPFA-test om kruisreacties met syfilis uit te sluiten. Deze analyses vonden plaats op het AMC.

Toen bleek dat een aanzienlijk deel van de mannen positief was, werd iedere deelnemer uitvoerig lichamenlijk onderzocht op de verschillende symptomen die passen bij Lyme-ziekte. De anamnese werd aangevuld met vragen over het werk, tekebeten, beschermende maatregelen en of er in het verleden lichamenlijke klachten waren geweest die bij de ziekte pasten. Dit alles werd dubbelblind uitgevoerd, dus zonder dat arts of deelnemer de bloeduitslag wisten, om te voorkomen dat het lichamenlijk onderzoek en het invullen van de vragenlijst zouden worden beïnvloed.

1.3.3 **Odds ratio**

Om het verband tussen serostatus vs. blootstellings- en klinische variabelen te analyseren, werd gebruik gemaakt van de zgn. odds ratio (OR). Hiervoor zijn de variabelen waar nodig gedichotomiseerd. De odds ratio is een benadering van het relatieve risico van de betreffende variabele. Een OR die groter is dan 1.0 duidt op een positieve samen-

hang met serostatus, een OR kleiner dan 1.0 duidt op een negatieve samenhang ('bescherming').

De omvang van het 95%-betrouwbaarheids-interval (95%BI) geeft een indruk over de mate van zekerheid van de puntschatting voor de OR. Hoe nauwer het 95%BI, hoe zekerder de puntschatting. Wanneer het 95%BI de 1.0 niet omvat, wil dit zeggen dat de OR statistisch significant is ($p < 0.05$).

Opgemerkt moet worden, dat bij deze grootte van de onderzoeksgroep het vermogen om statistische significantie aan te tonen beperkt is tot sterke effecten. In onze analyses hebben wij ons daarom vooral gericht op de puntschatting van de odds ratio en minder op de statistische significantie ervan.

1.4 Resultaten en discussie

1.4.1 **Prevalentie**

25 van de 127 deelnemers (20%) waren met de gebruikte methode seropositief voor Lyme-ziekte. Van geen van hen was het serum positief in de TPHA- en VDRL-testen. Deze 25 personen waren dus mogelijk geïnfecteerd of hadden een infectie doorgemaakt. Het 95%-betrouwbaarheidsinterval voor de prevalentieschatting, onder aanname van representativiteit van de steekproef, ligt tussen 14 en 26%.

Omdat bij de keuze van de RBB-vestigingen en de boswachterijen criteria speelden als voldoende spreiding in terreingesteldheid, bereidheid van de bedrijfsarts om mee te werken en voldoende omvang in werknemers, staat de representativiteit van de steekproef voor de totale populatie werknemers niet vast. Wel kan dit onderzoek een eerste indruk geven van het vóórkomen van Lyme-ziekte bij werknemers van Staatsbosbeheer en de relatie tussen serologie en klachten.

1.4.2 **Risicofactoren**

De tweede onderzoeksvraag betrof de samenhang tussen infectie, ziekteverschijnselen en arbeidsverleden. Tabel 1 geeft de desbetreffende odds ratio's. Zoals te verwachten is tonen het gemiddelde aantal tekebeten per jaar en het aantal tekebeten in 1989 een positief verband met serostatus. Hierbij valt op, dat de vraag naar het aantal

tekebeten in het seizoen waarin het onderzoek werd gehouden een sterker verband toont dan de vraag naar gemiddeld aantal tekebeten per jaar. Dit kan komen doordat mensen het aantal recente beten beter kunnen rapporteren dan een gemiddelde over jaren, of doordat de niveaus van de antistoffen van seropositieve mensen na verloop van tijd dalen en onder de detectiegrens komen.¹⁰ Overigens toont het aantal recente tekebeten ook een sterke positieve lineaire trend met serostatus (OR's: 0 beten=1, 1 beet=3.25, 2-5 beten=3.83, 6-10 beten=4.62, >10 beten=6.93; p voor trend=0.004).

Leeftijd, dienstjaren, functie en het aantal uren per week dat iemand buiten werkt tonen geen effect in de OR tegen serostatus. Hierbij moet worden aangetekend dat in de nonresponsanalyse bleek dat vooral de oudere deelnemers met veel dienstjaren van deelname hadden afgezien. Een positieve samenhang van leeftijd of dienstjaren zou daardoor weggeselecteerd kunnen zijn.

Tabel 1. Univariante odds ratio's (OR) met 95%-betrouwbaarheidsinterval (95%BI) van expositie- en klinische variabelen vs. de aanwezigheid van antistoffen tegen *Borrelia burgdorferi* in 127 werknemers van Staatsbosbeheer.

<u>expositie</u>	<u>OR</u>	<u>95%BI</u>
> 5 tekebeten/jaar	2.3	0.84 - 6.1
tekebeten in 1989	4.2	1.4 - 15.1
leeftijd > 35 jaar	1.2	0.41 - 3.7
dienstjaren > 10	0.82	0.31 - 2.3
opzichtersfunctie	1.4	0.47 - 4.6
uren/week buiten > 20	1.1	0.26 - 6.3
altijd onmiddell. verwijderen	3.9	0.53 -171
insektenwerende middelen	1.6	0.45 - 4.9
altijd beschermende kleding	2.1	0.56 - 12.1
antibiotica	0.90	0.32 - 2.5
<u>kliniek</u>		
erythema chronicum migrans	19.2	1.7 -956
andere erythemen na tekebeet	ongedef.	0.0 - 4.5
andere huidaandoeningen	0.73	0.17 - 2.5
radiculaire pijnen	1.2	0.11 - 6.8
artralgie	0.68	0.12 - 2.7
artritis	2.1	0.18 - 15.8
hoofdpijn	0.57	0.01 - 4.8
cardiovasculaire afwijkingen	0.60	0.06 - 2.9
veneuze insufficiëntie	1.5	0.13 - 8.9

1.4.3 Preventieve maatregelen

De variabelen die met preventieve maatregelen te maken hebben, namelijk het altijd onmiddellijk verwijderen van teken, het gebruik van insektenwerende middelen en het gebruik van kleding met lange pijpen en mouwen, tonen alle drie een positief verband met serostatus. Het altijd onmiddellijk verwijderen van teken heeft zelfs een hoge odds ratio. Het betrouwbaarheidsinterval is echter erg breed. Er waren

maar enkele mensen die zeiden teken niet altijd onmiddellijk te verwijderen.

Een mogelijke verklaring voor de onverwachte positieve samenhang van de preventie-variabelen met serostatus zou kunnen zijn, dat juist mensen die veel worden gebeten zich vaker daartegen proberen te beschermen dan anderen, terwijl de maatregelen onvoldoende bescherming bieden. Daarom hebben we onderzocht of deze samenhang vertekend zou kunnen zijn door het aantal tekebeten dat iemand oploopt. Gebruik van insectenwerende middelen en beschermende kleding bleken echter met aantal tekebeten geen samenhang te vertonen (OR's resp. 1.3 en 1.1). Het altijd direct verwijderen van teken had met het aantal tekebeten zelfs een negatieve samenhang (OR: 0.44, 95%BI: 0.10-1.6). Interpretatie van de positieve samenhang tussen serostatus en de preventie-variabelen is dan ook niet goed mogelijk.

De laatste variabele, recent gebruik van antibiotica, vertoont geen statistische samenhang met serostatus. Het is bekend dat antibiotica een immuunrespons kunnen onderdrukken zodat geïnfecteerde mensen seronegatief blijven.² Daarvoor vinden wij hier geen aanwijzingen. Het antibiotica-gebruik was echter laag, zowel in de groep seronegatieven als in de groep seropositieven.

1.4.4 Klinische verschijnselen

Van de klinische verschijnselen blijkt alleen erythema chronicum migrans, dat kenmerkend is voor Lyme-ziekte, een sterk verband met serostatus te tonen. Daar het maar om 5 gevallen met ECM ging (4 seropositief, één seronegatief), is het betrouwbaarheidsinterval wijd. Slechts in één geval was de diagnose ECM voorafgaande aan het onderzoek gesteld. Bijna alle klinische verschijnselen hebben zich overigens in het verleden voorgedaan en waren bij het lichamelijk onderzoek niet meer aanwezig. De gegevens hierover komen voornamelijk uit de anamnese. Artritis toont wel een positief verband met serostatus, maar het zijn ook hier maar 6 gevallen, waardoor het 95%BI wijd is.

1.4.5 **Healthy worker effect**

In het algemeen vertonen in deze studie de bij Lyme-ziekte passende klinische variabelen, met uitzondering van het ECM, geen samenhang met serostatus. Mogelijkerwijs wordt deze bevinding beïnvloed door een vorm van selectiebias, het zgn. 'healthy worker effect'. Dit houdt in dat in een bedrijf in de loop van de tijd de mensen met klachten afvloeien, zodat de gezonde werknemers overblijven.

1.5 Conclusies

- 20% van de mensen in de onderzoeksgroep was seropositief voor *Borrelia burgdorferi*. Het 95%-betrouwbaarheidsinterval voor de prevalentieschatting ligt tussen 14 en 26%.
- Een positieve serostatus toonde een sterke samenhang met recente tekebeten (OR: 4.2, 95%BI: 1.4-15.1) en met een (doorgemaakt) erythema chronicum migrans (OR: 19.2, 95%BI: 1.7-956).
- Geen samenhang werd gevonden tussen serostatus en de klinische diagnostiek, de meeste infecties hadden een asymptomatisch verloop.

2 AANDACHTSPUNTEN VOOR VERVOLGONDERZOEK

2.1 Onderzoekspopulatie

Uit het exploratieve onderzoek blijkt dat Lymeziekte bij werknemers in de buitendienst van Staatsbosbeheer een reëel probleem vormt. De prevalentie van serumantistoffen is met 20% erg hoog. Gezien het, in een klein deel van de gevallen, mogelijk ernstige natuurlijke beloop van de ziekte is er reden om vervolgonderzoek bij dezelfde onderzoekspopulatie uit te voeren.

Wegens de hoge prevalentie in deze populatie kan met een relatief kleine steekproef een voldoende groot aantal gevallen opgespoord worden. De werknemers zijn wat betreft expositie aan teken goed te vergelijken daar ze allen evenveel tijd in de natuur doorbrengen, onder vergelijkbare arbeidsomstandigheden. De bereidheid om mee te doen is voldoende hoog en verder zijn de deelnemers via hun werkgever gemakkelijk te bereiken. Tenslotte kan gebruik worden gemaakt van de infrastructuur van de RBB, de bedrijfsartsen, om bloed af te nemen of lichamelijk onderzoek uit te voeren.

2.2 Prevalent onderzoek

2.2.1 **Prevalentie**

Het deel van de populatie waarbij een bepaalde toestand (ziekte) op een bepaald tijdstip aanwezig is, wordt de prevalentie van die toestand genoemd. Ze geeft een momentopname van de toestand in de populatie en hangt samen zowel met het aantal nieuwe (incidente) gevallen dat per tijdseenheid ontstaat als met de gemiddelde duur van de toestand.¹¹

Het door ons uitgevoerde onderzoek onder 127 werknemers in uitvoerende en technische dienst van Staatsbosbeheer, leverde een steekproefprevalentie op van 20%. Deze geeft een schatting van de prevalentie in de hele groep werknemers (populatieprevalentie). Aan de eis van representativiteit kon bij het bepalen van de onderzoeksgroep om praktische redenen niet worden vastgehouden (zie 1.4.1), wat overigens

niet betekent dat deze prevalentieschatting onbruikbaar is. Zij moet desondanks met enige voorzichtigheid worden gebruikt.

2.2.2 Steekproefomvang

Omdat de gevonden prevalentieschatting ook op basis van toeval van de werkelijke populatieprevalentie kan verschillen, is een 95%-betrouwbaarheidsinterval (95%BI) berekend. Dit ligt met een kans van 95% rond de populatieprevalentie. De breedte ervan is een maat voor de betrouwbaarheid van de prevalentieschatting (zie 1.3.3).

Het 95%BI van de prevalentieschatting in ons onderzoek bedroeg 14%-26%, onder de aanname van representativiteit van de steekproef. Dit is een nogal breed interval, hetgeen te wijten is aan de relatief kleine steekproefomvang in onze studie. Zelfs bij een twee maal zo grote steekproef (n=254) zou echter het 95%BI nog 16%-24% bedragen. Voor een meer acceptabele meetfout met bijvoorbeeld een 95%BI van 17.5%-22.5%, is een steekproef van n=438 nodig. Bij de berekening van het 95%BI is de correctie voor een eindige populatie toegepast: $SE(p) = \sqrt{(p(1-p)/n)(1-n/N)}$, met p als prevalentie, n als steekproefomvang en N als omvang van de populatie.¹²

2.2.3 Tijdstip meting

Indien in vervolgonderzoek een nieuwe prevalentieschatting wordt uitgevoerd, moet deze om met de eerste vergelijkbaar te zijn in dezelfde tijd van het jaar (dus mei/juni) worden vastgesteld. Juist in mei en juni echter zijn de nimfale teken (de teken in het tweede, nimfale, ontwikkelingsstadium) het meest actief, zodat er relatief veel pas besmette personen zullen zijn. Dit is bij de Noord-Amerikaanse teken (*Ixodes dammini*) onderzocht.¹³ Bij pas besmette mensen zijn IgG-antistoffen vaak niet aantoonbaar.^{1,2,14} Een beter moment voor bloedafname zou dus de periode buiten het tekenseizoen zijn, van januari tot maart. Bij de keuze van het tijdstip voor vervolgonderzoek zal met beide overwegingen rekening gehouden moeten worden. Indien het vervolgonderzoek een meer continu karakter krijgt is het mogelijk om op meerdere tijdstippen van het jaar te meten, bijvoorbeeld elke drie maanden.

Het zou wel nuttig kunnen zijn in ieder geval de vragenlijst naar risicofactoren een keer in de zomer af te nemen. Mogelijkerwijs is het

voor de deelnemers in de winter moeilijker zich het aantal in de zomer opgelopen tekebeten te herinneren. Een voordeel van veel meetpunten is dat fout-positieven en fout-negatieven bij herhaalde meting kunnen worden opgespoord, wanneer tenminste de oorzaak van de foute uitslag bij de vervolgmeting niet meer aanwezig is.

2.2.4 Nonrespondentbias

Het is verder belangrijk om bij nieuwe screening van een steekproef de nonrespondentbias zoveel mogelijk uit te sluiten. Dit is een vorm van selectiebias (bias = systematische fout), die ontstaat wanneer de personen uit de oorspronkelijke steekproef, die uiteindelijk aan het onderzoek meewerken, in bepaalde opzichten systematisch verschillen van de personen die van deelname afzien.¹¹

In het onderzoek bleken vooral oudere mensen niet mee te willen doen. Dit zou kunnen verklaren waarom geen relatie werd gevonden tussen seropositiviteit en leeftijd, terwijl die in de literatuur wel is gemeld.^{15,16,17} Een mogelijkheid om dit probleem op te lossen is om uit de oudere werknemers extra deelnemers te vragen, zodat de leeftijdsverdeling in de steekproef gelijk wordt aan die in de hele groep werknemers.

2.3 Incident onderzoek

2.3.1 Incidentie

Het deel van de bestudeerde populatie waarbij een bepaalde ziekte (of een bepaald stadium van de aandoening) in een bepaalde periode voor het eerst optreedt, wordt het incidentiecijfer (of de incidentie) genoemd. Om de incidentie te bepalen is een onderzoekspopulatie nodig die vrij is van de bestudeerde aandoening en die dan enige tijd wordt gevolgd (follow-up onderzoek of cohortonderzoek).¹¹

Voor het uitvoeren van een prospectieve studie naar risicofactoren, heb je groepen nodig die verschillen met betrekking tot de blootstelling voor een mogelijke risicofactor. Deze groepen (cohorten) worden vergeleken aan de hand van de incidentie gedurende de follow-up-periode. Incidenties moeten voor elke groep apart berekend kunnen wor-

den. Hiervoor is het nodig de groepen en follow-up-periode scherp te definiëren.¹⁸

Het gebruik van incidente gevallen in een onderzoek naar risicofactoren heeft allerlei voordelen boven het gebruik van prevalentie gevallen. Het belangrijkste is de tijdsvolgorde waarin expositie en ziekte in een cohortonderzoek worden gemeten. Deze maakt dat gevolgtrekkingen ten aanzien van causaliteit van de bevindingen veel sterker staan dan in een onderzoek waarin over deze tijdsvolgorde geen zekerheid bestaat. Verder speelt selectiebias door verschil in ziekteduur, dus overrapportage van patiënten met een lange ziekteduur, in een incidentiecijfer geen rol. In een prevalent onderzoek kan dit wel het geval zijn.

2.3.2 Verwachte incidentie

De incidentie (I) kan worden afgeleid uit: $I=P/d$, waarbij d de duur van seropositiviteit weergeeft en P de prevalentie. Dit betekent dat wanneer de duur van seropositiviteit zeer lang is¹⁵ en b.v. ongeveer 7 jaar bedraagt, er bij een prevalentie van 20% een incidentie verwacht kan worden van $20\%/7= 3\%$ per jaar. Indien echter de duur van seropositiviteit kort is, b.v. 1 jaar, dan zal de incidentie ongeveer 20% per jaar zijn.

In een Zwitsers onderzoek¹⁰ is gedurende een tekenseizoen van 6 maanden een incidentie van 11% gevonden, welke waarschijnlijk over het gehele jaar genomen niet veel hoger zal liggen, gezien de seizoensgebondenheid van tekebeten. In dat onderzoek bedroeg de prevalentie bij de eerste meting overigens, net als in ons onderzoek, 20%. Een redelijke aanname lijkt dus een incidentie van ongeveer 10% te zijn, waaruit een gemiddelde seropositiviteitsduur zou volgen van ongeveer 2 jaar.

Het is ook mogelijk de verwachte incidentie te berekenen uit de kans op besmetting en het verwachte aantal tekebeten. De formule $1-(1-fp)^n$ geeft de kans op besmetting na n tekebeten gebaseerd op de binomiaalverdeling, met p als de verwachte prevalentie bij teken (bijvoorbeeld 16%-45%⁸) en f als de kans op besmetting bij een beet van een geïnfecteerde teek (bijvoorbeeld 10%¹⁹). De deelnemers aan ons onderzoek waren aan het begin van het tekenseizoen (tussen febr/maart en mei/juni) al gemiddeld 3.6 maal gebeten. Wanneer bovenstaande

formule wordt ingevuld met deze ruw geschatte parameters, dan volgt daaruit in genoemde periode een besmettingskans van 0.06 tot 0.15. Dit wil zeggen dat van de gevonden prevalentie van 20%, 5 tot 14% reeds eerder besmet was. Hieruit volgt een incidentie van 6 tot 15% gedurende ruwweg een half tekenseizoen, dus een incidentie van 12 tot 30% op jaarbasis.

De laatste berekening valt hoger uit dan de eerste, wat echter kan komen door de onzekere parameters waarop zij is gebaseerd. De eerste berekening, die uitkomt op een incidentie van ongeveer 10%, geniet ons inziens de voorkeur.

2.3.3 Grootte van onderzoeksgroep

De te verwachten incidentie is belangrijk bij de keuze voor de grootte van de onderzoeksgroep. Om statistische verbanden te kunnen analyseren moeten per jaar ten minste enige tientallen, bijvoorbeeld 30 tot 40, seropositieven gevonden worden. Dit impliceert dat bij een incidentie van ongeveer 10% de onderzochte groep mensen 300 tot 400 personen groot moet zijn. Bij een hogere incidentie zou een kleinere onderzoeksgroep volstaan. Daar de verwachte incidentie echter nogal onzeker is, is het beter toch aan een relatief grote onderzoeksgroep vast te houden.

2.3.4 Schone populatie

Voor het incidentieonderzoek heb je een 'schone' populatie nodig. Dat wil zeggen dat er geen zieken in mogen voorkomen en ook geen mensen bij wie de expositie al zodanig is dat ze een grotere (of kleinere bij eventuele immuniteit) kans op ziekte hebben. Het is niet helemaal duidelijk of de werknemers van Staatsbosbeheer aan deze voorwaarden voldoen. De meesten van hen hebben jarenlang blootgestaan aan tekebeten en zullen zo goed als zeker met *B.burgdorferi* in aanraking zijn gekomen, ondanks dat ze seronegatief zijn.

Het is ook onduidelijk of mensen met verhoogde antistoftiters specifieke immuniteit tegen Lyme-borreliose bezitten. Waarschijnlijk is dit overigens niet.²⁰ Eventuele specifieke immuniteit na reserconversie, dus bij seronegatieve mensen, is dan nog minder waarschijnlijk. Toch is het denkbaar dat zij, na jarenlange blootstelling aan tekebeten, uiteindelijk een geselecteerde groep vormen van mensen die

wegens ongevoeligheid seronegatief zijn gebleven (het 'healthy worker effect'). Een incidentieonderzoek zal dan de werkelijke kans op infectie onderschatten.

Ideaal is een onderzoeksgroep waarbij men meer zekerheid heeft dat de expositiestatus voor iedereen gelijk is, zoals beginnende werknemers bij Staatsbosbeheer. Gezien het natuurlijke verloop binnen Staatsbosbeheer kan op ongeveer 20 nieuwe mensen per jaar worden gerekend. Dit is een te klein aantal om onmiddellijk een onderzoeksgroep uit samen te stellen. Het kan echter verstandig zijn om van alle nieuwe werknemers bij indiensttreding een bloedmonster te vragen, zodat, uitgaande van een stabiele epidemiologische situatie, over enkele jaren beter onderzoek mogelijk is. Door de serummonsters te testen op zowel IgM- als IgG-antistoffen, kunnen oude gevallen van nieuwe worden onderscheiden.

2.3.5 Regressie naar het gemiddelde

Regressie naar het gemiddelde of statistische regressie is het verschijnsel dat mensen die bij eerste meting van een kenmerk boven een grenswaarde vallen, bij een vervolgmeting een lager groepsgemiddelde blijken te hebben, zonder dat er sprake is van een gemeenschappelijk biologisch proces. Bij incidentieonderzoek naar Lymeziekte kan dat het geval zijn wanneer na een eerste screening van een groep werknemers de groep wordt geclassificeerd in seropositieven en seronegatieven. Mensen die zich wat betreft antistoftiters in het grensgebied van detectie bevinden, zullen wegens toevallige fluctuaties in antistoftiter of wegens toevallige meetfouten makkelijk worden misgeclassificeerd (fout-positief of fout-negatief). Bij vervolgonderzoek zullen de fout-positieven tussen de seropositieven waarschijnlijk negatief en de fout-negatieven waarschijnlijk positief worden geclassificeerd. Deze seroconversies berusten dan op schijn en kunnen tot te lage effectschattingen en vertekende conclusies leiden.^{11,21,22}

Dit verschijnsel, ook wel 'regression dilution bias' genoemd, is aangetoond voor de relatie tussen hart- en vaatziekten en risicofactoren daarvan.²³ Het is vooral belangrijk bij kenmerken die behalve inter-individuele variatie een relatief grote intra-individuele variatie vertonen.¹¹ Dit wijst erop dat het bij antistofbepalingen

waarschijnlijk een minder grote rol speelt dan bij bijvoorbeeld bloeddrukmetingen. Regressie naar het gemiddelde wordt echter ook veroorzaakt door de voor de antistofbepaling specifieke meetfout, zodat er niet van uit gegaan kan worden dat het bij antistofbepalingen helemaal geen rol speelt.

Het effect van regressie naar het gemiddelde kan worden geminimaliseerd door de classificatie (in seropositieven en seronegatieven) op meer dan één meting te baseren.¹¹ Het beste is om kort (b.v. enkele dagen) na elkaar twee bloedmonsters te nemen en het gemiddelde van beide titerbepalingen te gebruiken. Indien dit niet mogelijk is moeten de antistoftiters in het bloedmonster in ieder geval op verschillende wijzen bepaald worden (bijvoorbeeld met IFA en met Westernblot).

2.3.6 Inductieperiode

Bij vervolgonderzoek moet voor het vaststellen van de follow-up-periode, waarin de individuen bloot staan aan de risicofactor, rekening gehouden worden met een 'inductieperiode'. Dit is de tijd van blootstelling aan de risicofactor die minimaal nodig is om een effect te kunnen meten.¹⁸ Indien de follow-up-periode kleiner is dan de inductietijd, is het onmogelijk enig effect te meten.

Van een inductieperiode is bij seropositiviteit voor B.burgdorferi waarschijnlijk geen sprake. Het lijkt namelijk logisch te veronderstellen dat seroconversie door B.burgdorferi in één keer, na een tekebeet, plaatsvindt. Aan de andere kant is er, zoals eerder vermeld, in de literatuur vaak een verband tussen seropositiviteit en leeftijd gevonden.^{15,16,17} Het is mogelijk dat dit een schijneffect is dat eigenlijk op het aantal tekebeten berust, hiervoor is in deze studies niet gecorrigeerd. Het kan echter niet worden uitgesloten dat er sprake is van expositieaccumulatie. Dit zou alleen onderzocht kunnen worden door het aantal tekebeten per persoon goed te registreren, wat overigens niet makkelijk is te realiseren, en daarvoor vervolgens statistisch te corrigeren.

2.3.7 Latentieperiode

Bij follow-up onderzoek moet ook meestal rekening worden gehouden met een latentieperiode, een periode tussen het ontstaan van de ziekte en het aantonen ervan. Deze kan ertoe leiden dat iemand bij wie de

ziekte veroorzaakt is vóór het einde van de follow-up-periode, pas daarna aantoonbaar ziek is. Hij zou echter wel mee moeten tellen in de incidentie. Bij onbekendheid van de minimum inductie- en latentieperiodes moeten daarover aannamen worden gedaan. Door deze aannamen te variëren bij de incidentieberekening kan er informatie over worden gewonnen; hoe dichter de aannamen bij de werkelijke waarden liggen, des te groter zal het gemeten effect zijn. Analooq moeten ook aannamen worden gedaan over maximum inductie- en latentieperiodes.¹⁸

De latentieperiode (incubatietijd) tussen besmetting met B.burgdorferi en seroconversie is niet met zekerheid vastgesteld. Patiënten met verschijnselen van het eerste stadium van Lymeziekte, zoals ECM, hebben in 40 tot 50% van de gevallen nog weken lang geen verhoging van antistoftiters.² Dit is ook de ervaring met patiënten met ECM in het AMC. Screening van de werknemers kan dus het beste plaatsvinden vóór of ná een tekenseizoen, in de winter. Dan is de kans dat veel recente infecties worden gemist het kleinst.

Aangezien over de duur van seropositiviteit niet veel meer bekend is dan dat die jaren kan duren¹⁵, moet tussen de metingen geen al te lange tijd verlopen. Dan worden minder gevallen gemist met een eventuele korte seropositiviteitsduur en is van de seropositieven de serologie regelmatig te volgen.

2.4 Natuurlijk beloop

Lyme-ziekte treedt in verschillende fasen op. Het is niet goed bekend welk deel van de geïnfecteerden klachten krijgt. Ook is niet goed bekend of de verschillende stadia elkaar obligaaf opvolgen en of bepaalde factoren in de verwekker, de gastheer of diens omgeving het verdere verloop voorspellen.

Eerst zal het vervolg van geïnfekteerde deelnemers besproken worden. Daarbij zal kort worden ingegaan op het verschijnsel van reseroconversie. Tenslotte zullen de 3 stadia van Lyme-borreliose beschreven worden.

2.4.1 **Follow-up**

Onderzoek naar het natuurlijk beloop van infectie met B.burgdorferi kan worden uitgevoerd door de seropositieve werknemers te blijven volgen op mogelijke symptomen. Het gaat om 25 mensen die mogelijk al enige tijd geleden zijn geïnfected en waarvan 14 mensen tot nu toe klachten hadden. Deze 25 deelnemers zouden, evenals deelnemers bij wie in het incidentie-onderzoek infecties gediagnostiseerd worden, intensief gevolgd kunnen worden voor wat betreft klachten, klinische verschijnselen en symptomen. Bij herhaalde bloedtesten van deze groep, bijvoorbeeld elke 3 maanden, zou verder interessante informatie over het beloop van de immuunrespons bij seropositieven kunnen worden gewonnen.

Om het natuurlijk beloop van de eventuele patiënten te kunnen vergelijken zouden, bij symptomen van Lymeziekte, de patiënten volgens één protocol behandeld moeten worden. Ook seropositieven die geen symptomen ontwikkelen moeten volgens één protocol gevolgd worden, waarbij met name duidelijkheid moet bestaan over het al dan niet behandelen met antibiotica. In het algemeen lijkt het verstandig aan symptoomvrije seropositieven geen antibiotica toe te dienen.¹⁹ Hierover is echter weinig informatie beschikbaar.

Het is mogelijk om een trial op te zetten waarbij groepen seropositieven verschillende behandelingen krijgen. Hierin kan het effect van antibiotica op het natuurlijk beloop van seropositiviteit worden bestudeerd. De groepen moeten gerandomiseerd worden samengesteld en de behandeling dubbelblind en verder goed geprotocolleerd plaatsvinden. Een dergelijke trial zou, indien mogelijk, ingepast kunnen worden in de normale bedrijfsgeneeskundige structuur om de kosten zo laag mogelijk te houden. Bij een dergelijk onderzoek moet gerekend worden op een zeer lange follow-up, het kan jaren duren voordat seropositieven eventueel symptomen ontwikkelen.

2.4.2 Reseroconversie

Het is mogelijk dat er, onder de seronegatieven, werknemers zijn die ooit positief zijn geweest en weer gereseroconverteerd zijn. Dit is in twee studies gemeld^{10,24}, die echter beide methodologische onduidelijkheden bevatten.

In één studie²⁴ is de vervolgmeting alleen bij de mensen uitgevoerd die bij de eerste meting positief waren. Dit maakt dat het statisti-

sche verschijnsel 'regressie naar het gemiddelde'²² (zie ook 2.3.5) niet kan worden uitgesloten, zodat een deel van de reseroconversie op schijn kan berusten. Verder konden in deze studie slechts 53 van de 71 oorspronkelijk positieve mensen worden opgespoord, zodat mogelijk selectiefactoren een rol hebben gespeeld.

In de andere studie¹⁰ is de vervolgmeting uitgevoerd op 565 van de totale groep van 964 mensen van de eerste meting, terwijl ook hier niet wordt vermeld of selectiefactoren kunnen hebben meegespeeld.

In andere literatuur is van het verschijnsel reseroconversie niet veel meer bekend dan dat het een mogelijkheid is. Gegevens over bijvoorbeeld de duur van seropositiviteit en de relatie tussen symptomen en eventuele reseroconversie ontbreken. Ook hiernaar zou, via herhaalde bloedtesten bij de groep seropositieven, meer onderzoek kunnen worden gedaan.

2.4.3 Eerste stadium

Na infectie treedt in de VS in 60 tot 80% van patiënten met Lyme-ziekte ECM op¹, dat na enkele weken weer verdwijnt, al kan het terugkeren. Het percentage patiënten in Nederland dat ECM ontwikkelt is niet bekend. Het eerste stadium van Lyme-ziekte kan gepaard gaan met lage tot matige koorts, hoofdpijn, vermoeidheidsverschijnselen, gewrichtspijnen, stijve nek en spierpijnen.^{1,25}

Na infectie met *B.burgdorferi* kan het lichaam antistoffen gaan produceren, hoewel dit bij ECM-patiënten niet noodzakelijk is. De eerste paar weken zijn dit eiwitten van het IgM-type, later komt in grotere hoeveelheden de produktie van de IgG-typen op gang.^{1,2} Vooral IgG-antistoffen kunnen lange tijd in het lichaam blijven circuleren¹⁵, het is echter onwaarschijnlijk dat ze bescherming bieden tegen re-infectie.²⁰

2.4.4 Tweede stadium

Enige weken tot maanden na de eerste fase treedt de tweede fase in met vooral zenuw- of hartaandoeningen.²⁵ In de VS worden nog secundaire huidafwijkingen, gewrichtspijnen, oogontstekingen, hepatitis, keelpijn en algemene malaise als symptomen van het tweede stadium gerekend.¹ Ook multipele ECM wordt wel tot het tweede stadium gerekend. Kenmer-

kend voor het tweede stadium is dat de infectie zich niet meer lokaal voordoet maar door het hele lichaam is verspreid.

2.4.5 Derde stadium

Maanden tot jaren later kunnen opnieuw klachten ontstaan, vooral door artritis, die in chronische artritis over kunnen gaan (langer dan één jaar continue gewrichtsontsteking).¹ Meestal gaat het om de grotere gewrichten, vooral de knie. In ernstige gevallen kan dit leiden tot erosie van kraakbeen en been en zelfs tot invaliditeit. In Europa lijkt dit minder voor te komen dan in de V.S..^{1,25} In het late stadium kunnen ook ernstige zenuwaandoeningen optreden, o.a. progressieve encephalomyelitis met verlammingen, dementie, gevoelloosheid, spasmes, waarbij soms antistofproductie in het cerebrospinale liquor aangetoond kan worden. Minder ernstige symptomen kunnen ook optreden en zijn moeilijker te diagnostiseren, o.a. geheugenverlies, slaperigheid en gedragsveranderingen. Zelfs bij tot dan toe asymptomatische Lyme-ziekte kan jaren na infectie ineens acrodermatitis chronica atrophicans optreden, een huidaandoening die uiteindelijk tot verharding en atrofiëring van de huid leidt. Onderliggende gewrichten en botten kunnen zijn aangetast, een aanwijzing dat *B.burgdorferi* zich dan rechtstreeks door het lichaam verplaatst.¹

Bij reïnfectie met *B.burgdorferi* komt opnieuw een sterke IgM-productie op gang, gevolgd door de productie van IgG. De concentratie van IgG in seropositieve personen vóór en na reïnfectie kan een factor vier verschillen.² De duur van de periode die geïnfekteerde personen seropositief blijven voor IgG is onduidelijk. In twee onderzoeken werd na een half, resp. drie jaar, reseroconversie gerapporteerd^{10,24} (zie 2.4.2). In een ander onderzoek bleven zeven seropositieven jaren lang positief zonder symptomen te hebben van Lyme-ziekte.¹⁵

In het late stadium kan de immuunrespons beperkt zijn tot het synoviale vocht en gepaard gaan met artritis. Dan hoeven in het serum geen nieuw gevormde antistoffen meer aantoonbaar te zijn.^{2,14,20,26} Het is mogelijk dat in dat geval bij reïnfectie met lage doses *B.burgdorferi* een immuunrespons wordt geïnitieerd, die bij niet eerder blootgestelde werknemers uit zou blijven. De incidentie zal dan hoger uitkomen dan bij een werkelijk niet-blootgestelde populatie het geval zou zijn.

Bij patiënten met neurologische symptomen zijn de antiborrelia antistofconcentraties in het liquor cerebrospinalis vaak hoger dan verwacht kan worden bij 'lekkage' van serumantistoffen naar het liquor, deze worden dan waarschijnlijk in het liquor zelf aangemaakt. Dit betekent dat de B.burgdorferi dan zelf in het liquor aanwezig kan zijn.

Bij mensen met gediagnostiseerde Lyme-ziekte zijn gedurende het verloop van de ziekte verschillende nieuwe immuunresponsen voor telkens meer antigenen waargenomen.^{2,14} Het gebruik van antibiotica kan de ontwikkeling van immuunresponsen abrupt onderdrukken.^{14,27} Deze bevindingen geven aan dat de B.burgdorferi gedurende het ziekteverloop waarschijnlijk in leven blijft en zijn buitenste eiwitten kan veranderen ten gevolge van de immuunrespons van de patiënt.¹⁴

Over de relatie tussen symptomen en serologie kan in het algemeen worden gesteld dat hoe meer chronisch en gecompliceerd de ziekte is, hoe meer verschillende antistoffen de patiënten produceren. Bijna alle patiënten met Lyme-ziekte infectie van meer dan enkele weken oud, hebben IgG-antistoffen tegen het flagellaire eiwit van 41-kDa in hun bloed.² Hierop zijn nieuwe ELISA-testen gebaseerd die een hogere sensitiviteit en specificiteit hebben dan de standaard-IFA en -ELISA.^{2,28} De totale concentratie van serum-IgM is bij patiënten met een gecompliceerd ziekteverloop verhoogd, de concentratie IgM correleert verder met de mate van activiteit van de ziekte.²

2.5 Serologische testen

2.5.1 **Werkingsprincipe**

Voor de laboratoriumdiagnostiek van Lyme-ziekte worden verschillende testen gebruikt, die alle gebruik maken van de zeer specifieke bindingseigenschappen van antistoffen met antigenen. In het algemeen wordt een serummonster op een drager met een overmaat aan gebonden antigenen gebracht, waardoor de in het monster aanwezige antigeen specifieke antistoffen vastgezet worden. Nu worden antistoffen toegevoegd die tevoren aan een merker (b.v. een fluorescerende stof, radio-emitterende stof of een enzym) zijn gebonden. Deze gemerkte antistoffen zullen zich alleen aan de aan te tonen antistoffen kunnen binden.

Na verwijdering van de niet-gebonden gemerkte antistoffen is het mogelijk (semi-)kwantitatief de hoeveelheid merker, en dus de hoeveelheid antistof in het serum te bepalen.²⁹

2.5.2 Kwaliteit van serologische testen

Als maat voor de kwaliteit van testen worden o.a. de begrippen sensitiviteit en specificiteit gebruikt. Deze worden in percentages uitgedrukt. Bij een test met een hoge sensitiviteit (bijna 100%) worden weinig mensen ten onrechte als seronegatief beoordeeld (weinig fout-negatieven), bij een hoge specificiteit komen weinig fout-positieven voor. De ideale test heeft zowel een hoge sensitiviteit als een hoge specificiteit.

De meest gebruikte testen zijn de immunofluorescentie assay (IFA) en de enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In de IFA wordt als merker een fluorescerende stof gebruikt, in de ELISA een enzym. Beide testen worden meestal uitgevoerd op IgG-antistoffen, daar deze in bijna alle patiënten met Lyme-ziekte in voldoende hoge concentraties voorkomen.

Een heel verschillende techniek is de Westernblot. Deze methode scheidt door elektroforese de eiwitten van het antigeen naar molecuulgewicht (uitgedrukt in kiloDalton: kDa) en toont zo de samenstelling van de antistofrespons ervan in een specifiek bandenpatroon.

Vaak wordt bij het laboratoriumonderzoek eerst met IFA of ELISA getest, waarna de positieve monsters nogmaals met Westernblot worden getest om mogelijke kruisreacties met andere treponemale infecties te detecteren.^{1,27} In enkele onderzoeken bleek de ELISA een hogere sensitiviteit en specificiteit te hebben dan de IFA voor de vroege diagnose van Lyme-ziekte.² Ook om grote aantallen bloedmonsters te verwerken lijkt de ELISA het meest geschikt, daar deze geautomatiseerd (spectrofotometrie) plaats kan vinden.³⁰ Toch voldoet volgens andere onderzoeken de IFA, indien de gebruikers voldoende ervaring hebben, niet minder dan de ELISA.^{2,31} Een verbetering in sensitiviteit t.o.v. de standaard-ELISA is bereikt door als antigeen niet de hele cel van *B. burgdorferi* te nemen maar geïsoleerde flagella-eiwitten. Bij de IFA worden altijd hele cellen gebruikt.^{2,28}

Fout-negatieve resultaten treden voornamelijk op in de eerste paar weken na infectie. Deze kunnen worden beperkt door naast een IgG-

ELISA, gebruik te maken van IgM-ELISA. Ook testen met Westernblot kan fout-negatieven uit ELISA of IFA opsporen.²

Fout-positieve resultaten (vooral bij IgM-testen) kunnen voorkomen bij gezonde personen en door kruisreacties bij patiënten met vele andere ziekten; o.a. syfilis en autoimmunoreacties en zenuwaandoeningen.¹ Ook deze kunnen worden verminderd door bevestiging met Westernblot. Verder kunnen speciale testen op o.a. syfilis (TPHA-bepaling) uitgevoerd worden om de meest voorkomende kruisreacties op te sporen.^{32,33} Explosieve groei van het aantal aangevraagde testen op B.burgdorferi zoals momenteel het geval is in de V.S.^{34,35} kan het aantal fout-positieven sterk doen toenemen en daarmee de voorspellende waarde van de test reduceren.³⁴ Om misclassificatie zoveel mogelijk te voorkomen kan het beste met meer dan één test gewerkt worden, waarbij de resultaten van de testen samen worden geïnterpreteerd.²⁷

In enkele onderzoeken waarbij de interlaboratoriumvariantie van IFA- en ELISA-testen werd onderzocht, werd geconstateerd dat deze zeer hoog was.^{30,31,36} Dit wil zeggen dat testresultaten uit verschillende laboratoria slecht met elkaar vergeleken kunnen worden. Testen dienen daarom binnen een onderzoek op één laboratorium uitgevoerd te worden, bij de IFA dient interpretatie van de testresultaten ook door steeds hetzelfde, ervaren, personeel plaats te vinden.^{1,27,30,36}

2.6 Preventieve maatregelen

2.6.1 **Tekebeten**

Teken kunnen het hele jaar door bijten, maar voeden zich in de meeste gevallen (80%) tussen de maanden mei en september. De beet van de kleine nimfale teken, die voornamelijk aan het begin van de zomer (mei en juni) actief zijn, werd in een amerikaans onderzoek minder vaak opgemerkt dan de beet van volwassen teken, die zich in de wintermaanden voeden. Alle infecties met Lyme-ziekte die in de wintermaanden optraden gingen gepaard met ECM.¹³ Dit kan betekenen dat de beet van een volwassen teek meer risico met zich meebrengt op infectie dan die van een nimf. Wel zijn het door hun grotere aantallen vooral nimfen die infecties veroorzaken. In hetzelfde onderzoek werden het snel verwijderen van teken, gebruik van profylactische antibiotica na een

tekebeet, gebruik van teekverdelgende stoffen rondom woonhuizen en zelfs het regionaal afschieten van herten als maatregelen genomen. Het is niet duidelijk of de afname in incidentie tegen het eind van de studie aan (een van) deze maatregelen kan worden toegeschreven.¹³

Het is ook niet bekend in hoeverre huisdieren een extra risico geven op tekebeten door overspringen van meegevoerde teken. Dit zou in vervolgonderzoek bestudeerd kunnen worden. Hiervoor zou aan elke deelnemer gevraagd moeten worden hoeveel uur per week deze contact heeft met honden, katten, knaagdieren, koeien, paarden, eventueel herten, etc.

2.6.2 Teken verwijderen

In een dierexperimenteel onderzoek is gebleken dat effectieve overbrenging van *B.burgdorferi* pas na 24 tot meer dan 48 uur optreedt tijdens een tekebeet.³⁷ Indien deze bevinding ook op mensen toepasbaar is pleit ze voor preventie door middel van lichamelijk zelfonderzoek op teken na mogelijke blootstelling, b.v. elke avond, voor mensen die buiten werken. Het verwijderen van teken lijkt het beste te gaan met een pincet zonder verdovingsmiddelen zoals benzine.³⁸ Het gebruik hiervan kan zelfs een verhoogd risico op Lyme-ziekte geven.³⁹ Dit zou in vervolgonderzoek kunnen worden onderzocht door de deelnemers te vragen naar hun wijze van teken verwijderen.

2.6.3 Tekenwerende middelen

Ook het effect van de andere preventieve maatregelen, zoals het gebruik van lichtgekleurde kleding, lange pijpen en mouwen en gebruik van tekenwerende middelen, kan verder worden onderzocht. Tekenwerende middelen bevatten vaak *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET). Dit is effectief als bescherming tegen teken,³⁸ maar heeft giftige bijverschijnselen, vooral bij kinderen. Een ander middel, permethrin, wordt op kleren aangebracht en is zelfs na meerdere wasbeurten effectief in het doden van teken. Het schijnt geen toxische bijwerkingen te hebben.⁴⁰

2.6.4 Bestrijding tekenpopulatie

Om de tekenpopulatie in een streek uit te dunnen is een methode beschreven die heel specifiek werkt. Buisjes gevuld met watten die met een tekendodend middel zijn geïmpregneerd, worden in de natuur uitge-

zet. De daar aanwezige muizen, een belangrijk reservoir van teken, nemen plukjes watten mee naar hun nest. Hierdoor wordt de muizenpopulatie aantoonbaar minder door teken geparasiteerd en zijn ook aantoonbaar minder teken in de regio aanwezig. Hoe lang deze maatregelen echter werkzaam zijn is niet bekend.⁴⁰

2.6.5 Dataverzameling tekebeten

De informatie over tekebeten en de omstandigheden waaronder preventieve maatregelen het meest effectief zijn, moet zeer specifiek worden ingewonnen. Te denken valt hierbij aan vragen over kleding (mouwen, broekspijpen, lichte/donkere kleding, halsbedekking), insectenwerende middelen (welke, hoe vaak gebruikt, hoe veel, waar op het lichaam), verwijderen van teken (op welke wijze, hoe lang na ontdekking, in welke mate heeft de teek zich al volgezogen?).

Deze informatie kan worden verzameld via een kort, zelf in te vullen vragenlijstje, elke keer dat een bloedmonster wordt afgenomen. Bij de eerste keer zou een langere vragenlijst met onder andere persoonsinformatie moeten worden afgenomen. Om verbanden tussen preventieve maatregelen en tekebeten te onderzoeken zou het ideaal zijn om de informatie voor zoveel mogelijk tekebeten apart in te winnen. Het lijkt namelijk waarschijnlijk dat een werknemer wat betreft preventieve maatregelen zeer wisselend gedrag zal vertonen, de ene keer lange pijpen en mouwen zal dragen, de andere keer bij erg warm weer het erbij zal laten zitten.

Het zou mogelijk kunnen zijn de deelnemers te motiveren bij elke tekebeet een dagboekje bij te houden, met vragen als datum, tijd, plaats, weer, kleding, insectenwerende middelen, manier van verwijderen en mate van opzwellings van de teek. Zelfs indien een groot deel van de deelnemers hieraan geen gevolg geeft kan nog van een behoorlijk aantal tekebeten specifieke informatie worden ingezameld, gezien het aantal beten dat iemand oploopt (in het vooronderzoek gemiddeld 3.6 beten in de eerste zes maanden van 1989). Dit zou gecombineerd kunnen worden met het laten bewaren van de teken voor analyse op besmetting met *B.burgdorferi* door middel van een kweek. De vragenlijstjes en de gevangen teken kunnen door de betrokken bedrijfsartsen worden verzameld en naar de verschillende analysecentra worden opgestuurd.

Om te weten te komen welke van bovenstaande mogelijkheden wat betreft medewerking van de werknemers haalbaar zijn, is het te overwegen de onderzoekers enkele dagen mee te laten lopen op een boswachterij. Door mogelijke redenen van nonrespons te peilen en in te spelen op de bezwaren, kan hierdoor de respons worden verhoogd. Ook kunnen dan eventuele proef-dagboekjes en de langere vragenlijst worden getest.

2.7 Aanbevelingen voor vervolgonderzoek

In deze paragraaf zullen de consequenties en aanbevelingen voor vervolgonderzoek die volgen uit voorgaande overwegingen nog eenmaal kort op een rij worden gezet.

In een volgend onderzoek kan, daar geen uitgebreid algemeen lichamelijk en neurologisch onderzoek hoeft te worden uitgevoerd, een grotere steekproef (300 à 400 mensen) worden genomen. Dit kan een meer precieze prevalentieschatting opleveren en maakt het mogelijk associaties met risicofactoren met meer zekerheid vast te stellen. Bloedmonsters en vragenlijst kunnen het best enige weken na afloop van het tekenseizoen worden afgenomen zodat geen recente infecties worden gemist. Om de nonrespondentbias zo klein mogelijk te maken, is te overwegen om extra oudere werknemers te recruteren. De leeftijdsverdeling in de steekproef lijkt dan meer op die in de doelpopulatie. Vooral de oudere werknemers bleken namelijk af te hebben gezien van deelname aan het onderzoek.

Vervolgonderzoek bij de seronegatieve werknemers zou inzicht kunnen geven over het incidentiecijfer. Probleem hierbij is dat de seronegatieven al jaren lang bloot staan aan infectie en dus geen 'schone' populatie vormen. Mogelijk hebben ze enige bescherming opgebouwd of zijn de meest gevoelige mensen uit deze groep geselecteerd en is de groep dus relatief ongevoelig. De verwachte incidentie ligt in de orde van grootte van 10%.

Er zou moeten worden uitgezocht of in het verleden de werknemers met klachten bij Staatsbosbeheer zijn afgevloeid, waardoor juist de gezonde mensen over zijn gebleven; het zgn. 'healthy worker effect'. Dit zou deels kunnen verklaren waarom zo weinig Lyme-specifieke klachten in dit onderzoek werden gevonden.

Bij vervolgonderzoek kan met een beperkt lichamelijk onderzoek worden volstaan. Het uitgebreide lichamelijk onderzoek in deze studie was zeer arbeidsintensief en leverde naar verhouding weinig informatie op. Informatie over klinische variabelen kan via de anamnese worden verzameld. Eventueel kunnen naar aanleiding daarvan volgens protocol alleen mensen die verdacht zijn voor Lyme-ziekte uitgebreid worden onderzocht. Ook de seropositieve werknemers kunnen regelmatig lichamelijk worden onderzocht zodat meer inzicht verkregen wordt in het natuurlijk beloop van Lyme-ziekte.

De serologische bepaling van antistoffen in de bloedmonsters dient bij vervolgonderzoek telkens in hetzelfde laboratorium en door hetzelfde, ervaren personeel plaats te vinden. Het verdient voorkeur de beoordeling op meer dan één test te baseren, bijvoorbeeld op een combinatie van IFA en Westernblot.

Om de expositievariabelen preciezer te meten is te denken aan het laten bijhouden van een boekje per boswachterij, waarin elke tekebeet gerapporteerd wordt. Per tekebeet zou opgeschreven kunnen worden of er insectenwerende middelen waren gebruikt, of iemand lange mouwen en broekspijpen droeg, waar het gebeurde, bij wat voor werk en verder omstandigheden als het weer en de buitentemperatuur. Wel zou vooraf op kleine schaal moeten worden uitgeprobeerd of het voor de deelnemers doenlijk is de informatie op een dergelijke wijze bij te houden.

LITERATUUR

1. Steere AC. Lyme disease. *N Engl J Med* 1989; 321: 586-96.
2. Barbour AG. Laboratory aspects of Lyme borreliosis. *Clinical Microbiology Reviews* 1988; 1: 399-414.
3. Wokke JHJ, Vanneste JAL, Vermeulen M, et al. Lymfocyttaire meningoradiculitis na insektebeet (syndroom van Bannwarth). *Ned Tijdschr Geneesk* 1984; 128: 1796-9.
4. Kuiper H, Jongh BM de, Senden PJ. Pacemaker-implantatie wegens totaal atrioventriculair block bij Lyme-borreliose. *Ned Tijdschr Geneesk* 1988; 132: 2109-11.
5. Blaauw AA, Linden SJ van der, Kuiper H. Lyme carditis in the Netherlands. *Ann Intern Med* 1989; 111: 261-2.
6. Bouma PAD, Carpay HA, Rijpkema S, Overbeek BP. Twee patiënten met het syndroom van Guillain-Barré veroorzaakt door infectie met *Borrelia burgdorferi*. *Ned Tijdschr Geneesk* 1989; 133: 2262.
7. Visser G, Bogaard AEJM van den Jr. Lyme borreliose. *Infectieziekten-bulletin* 1989; 3: 2-3.
8. Jongejan F, Rijpkema S. *Borrelia burgdorferi* uit *Ixodes ricinus*-teken van Ameland (brief aan de redactie). *Tijdschr Diergeneesk* 1989; 114: 1195-7.
9. Nohlmans MKE, Boer R de, Bogaard AEJM van den, Blaauw AAM, Boven CPA van. Voorkomen van *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* in Nederland. *Ned Tijdschr Geneesk* 1990; 134: 1300-3.
10. Aeschlimann A, Gern L, Zhioua E, et al. Observations of two high-risk populations from the swiss plateau, a region heavily infested with *Ixodes ricinus*/*Borrelia burgdorferi* complex. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 539: 440-3.
11. Bouter LM, Dongen MCJM van. Epidemiologisch onderzoek, opzet en interpretatie. Utrecht/Antwerpen: Bohn, Scheltema & Holkema, 1988.
12. Armitage P, Berry G. Statistical methods in medical research. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1987.
13. Lastavica CC, Wilson ML, Berardi VP, Spielman A, Deblinger RD. Rapid emergence of a focal epidemic of Lyme disease in coastal Massachusetts. *N Engl J Med* 1989; 320: 133-7.

14. Craft JE, Fischer DK, Shimamoto GT, Steere AC. Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease. Appearance of a new immunoglobulin M response and expansion of the immunoglobulin G response late in the illness. *J Clin Invest* 1986; 78: 934-9.
15. Steere AC, Taylor E, Wilson ML, Levine JF, Spielman A. Longitudinal assessment of the clinical and epidemiological features of Lyme disease in a defined population. *J Infect Dis* 1986; 154: 295-300.
16. Nadal D, Wunderli W, Briner H, Hansen K. Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in forestry workers and blood donors from the same region in Switzerland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989; 8: 992-5.
17. Doby JM, Couatarmanac'h A, Fages J, Chevrier S. Les spirochètoses à tiques chez les professionnels de la forêt. Enquête sérologique chez 653 sujets de 10 départements de l'ouest de la France. *Arch Mal Prof* 1989; 50: 751-7.
18. Rothman KJ. Modern epidemiology. Boston/Toronto: Little, Brown and Company, 1986.
19. Steere AC. Lyme disease (correspondentie). *N Engl J Med* 1990; 322: 475.
20. Sigal LH. Lyme disease, 1988: immunologic manifestations and possible immunopathogenetic mechanisms. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 1989; 18 (feb): 151-67.
21. Healy MJR, Goldstein H. Regression to the mean. *Ann Hum Biol* 1978; 5: 277-80.
22. Vandenbroucke JP, Hofman A. Grondslagen der epidemiologie. Utrecht: Wetenschappelijke Uitgeverij Bunge, 1988.
23. MacMahon S, Peto R, Cutler J, et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet* 1990; 335: 765-74.
24. Neubert U, Münchhoff P, Völker B, Reimers CD, Pflüger KH. *Borrelia burgdorferi* infections in bavarian forest workers. A follow-up study. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 539: 476-9.
25. Meer JWM van der. Lyme-borreliose, de 'Hocus Pas' onder de infectieziekten. *Ned Tijdschr Geneeskd* 1989; 133: 2214-6.

26. Schutzer SE, Coyle PK, Belman AL, Golightly MG, Drulle J. Sequestration of antibody to *Borrelia burgdorferi* in immune complexes in seronegative Lyme disease. *Lancet* 1990; 335: 312-15.
27. Magnarelli LA. Quality of Lyme disease tests (redactioneel). *JAMA* 1989; 262: 3464-5.
28. Hansen K, Hindersson P, Strandberg Pedersen N. Measurement of antibodies to the *Borrelia burgdorferi* flagellum improves serodiagnosis in Lyme disease. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 338-46.
29. Tweel JG van den, et al. Immunologie. Het menselijk afweersysteem. Maastricht/Brussel: Natuur en Techniek, 1988.
30. Cutler SJ, Wright DJM. Comparison of immunofluorescence and enzyme linked immunosorbent assays for diagnosing Lyme disease. *J Clin Pathol* 1989; 42: 869-71.
31. Luger SW, Krauss E. Serologic tests for Lyme disease. Interlaboratory variability. *Arch Intern Med* 1990; 150: 761-3.
32. Raoult D, Hechemy KE, Baranton G. Cross-reaction with *Borrelia burgdorferi* antigen of sera from patients with Human Immunodeficiency Virus infection, syphilis, and leptospirosis. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2152-5.
33. Russell H, Sampson JS, Schmid GP, Wilkinson HW, Plikaytis B. Enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay for Lyme disease. *J Infect Dis* 1984; 149: 465-70.
34. Sorvillo FJ, Nahlen B. Lyme disease (correspondentie). *N Engl J Med* 1990; 322: 475.
35. Hedberg CW, Osterholm MT. Serologic tests for antibody to *Borrelia burgdorferi*. Another Pandora's box for medicine? (redactioneel). *Arch Intern Med* 1990; 150: 732.
36. Schwartz BS, Goldstein MD, Ribeiro JMC, Schulze TL, Shahied SI. Antibody testing in Lyme disease. A comparison of results in four laboratories. *JAMA* 1989; 262: 3431-4.
37. Piesman J, Mather TN, Sinsky RJ, Spielman A. Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 557-8.
38. Boer R de, Nohlmans MKE, Bogaard AEJM van den. Nederlandse teken als overbrengers van infectieziekten. *Ned Tijdschr Geneesk* 1990; 134: 1295-9.

39. Schwartz BS, Goldstein MD. Lyme disease in outdoor workers: risk factors, preventive measures, and tick removal methods. *Am J Epidemiol* 1990; 131: 877-85.
40. Schwartz BS, Goldstein MD. Lyme disease: a review for the occupational physician. *Journal of Occupational Medicine* 1989; 31: 735-42.