

## BORRELIOSE : MYTHE OU REALITE ?

AMORY Hélène<sup>1</sup>, HOUBEN Rosa<sup>1</sup>, PITEL Pierre Hugues<sup>2</sup>, MEERSCHAERT Carole<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pôle Equin, Secteur Médecine interne équine, Département des Sciences Cliniques, Université de Liège, Bât. B 41 Sart Tilman, B 4000 Liège, Belgique

<sup>2</sup>LABÉO Frank Duncombe, 14053 Caen cedex 4, France

<sup>3</sup>Laboratoire Collard, Synlab Belgique, Bvd de Froidmont, 14, 4020 LIEGE

### **1. REVUE DE LITTERATURE**

#### ***Etiologie et épidémiologie***

La borréliose (synonyme : maladie de Lyme) est la maladie transmise par les tiques la plus commune dans les régions tempérées de l'hémisphère nord (Rizzoli et al. 2011). Il s'agit d'une maladie multisystémique due à un spirochète appelé *Borrelia burgdorferi*, qui compte 18 espèces différentes qui peuvent co-exister sur un même vecteur (Rizzoli et al. 2011). Parmi ces espèces, certaines, dont principalement *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, sont pathogènes non seulement pour l'homme, mais aussi pour de nombreux autres vertébrés dont par exemple le chien, le bovin, le chat et le cheval (Reed et Toribio 2004, Rizzoli et al. 2011). Les principaux vecteurs sont les tiques du genre *Ixodes ricinus* en Europe (Butler et al. 2005, Rizzoli et al. 2011), qui peuvent être infectés à n'importe quel moment de leur cycle de vie, le plus souvent lors d'un repas sanguin sur un hôte appartenant à une espèce réservoir compétente (c'est-à-dire des espèces qui peuvent être infectées par *Borrelia* et la transmettre à des tiques non infectés). En Europe, les espèces hôtes identifiées incluent les petits rongeurs (souris, musaraignes, lapins), les passereaux, et certains reptiles et insectivores (Rizzoli et al. 2011). De plus en plus d'études tendent à démontrer que la population d'*Ixodes ricinus* s'étend en Europe, avec pour corollaire l'émergence non seulement de la borréliose, mais aussi d'autres maladies transmises par ce vecteur, comme par exemple l'anaplasmose dont il sera question ci-dessous. Parmi les causes potentielles de ce phénomène, les modifications du milieu et le réchauffement climatique ont été le plus souvent incriminés (Rizzoli et al. 2011). La biodiversité des espèces de *Borrelia burgdorferi* est variable en fonction de la localisation géographique et a été démontrée maximale dans des longitudes situées entre 4°Ouest et 20°Est et dans des latitudes situées entre 35 et 60°Nord, où la prévalence de l'infection des tiques par *Borrelia burgdorferi* est aussi la plus élevée (Rizzoli et al. 2011). Cette répartition est cependant très hétérogène en fonction des conditions locales d'habitat des tiques. Ainsi par exemple, les cas de borréliose sont nettement moins nombreux au-dessus de 1300 m d'altitude [Rizzoli et al. 2011]. Au moins 26 pays européens ont été identifiés comme affectés par la borréliose, dont principalement ceux situés au Nord et du centre de l'Europe (Rizzoli et al. 2011). En France et en Belgique, la prévalence moyenne d'infection des tiques par la borréliose a été rapportée comme s'élevant respectivement à 7 % [Blanc 2009] et à 12 % (Kesterman et al. 2010), avec cependant la mise en évidence de grandes variabilités locales en fonction des biotopes. Ainsi par exemple, pour la

France de plus hauts risques ont été identifiés dans le Limousin, l'Auvergne, la Lorraine et l'Alsace (Blanc 2009), alors que pour l'étude réalisée en Belgique, le portage variait entre 2.8 to 21.6 % selon les régions de collecte des tiques (Kesterman et al. 2010). Des portages s'élevant autour de 40 % ont été rapportés dans certains pays d'Europe de l'Est comme par exemple la Bulgarie et la Slovaquie (Butler et al. 2005).

La séroprévalence rapportée chez des équidés sains vivant en Europe est montrée au tableau 1. Ce tableau confirme la plus haute prévalence dans les pays du centre et du Nord de l'Europe.

### ***Signes cliniques***

La borréliose montre une tendance saisonnière, avec une plus haute incidence au printemps, en été et en automne, et un pic d'incidence en juin et juillet (Reed et Toribio 2004, Rizzoli et al. 2011). Les signes cliniques sont cependant rares et souvent légers chez les chevaux infectés par *Borrelia burgdorferi*, les signes les plus fréquemment rapportés étant une boiterie sporadique pouvant être tournante sur les différents membres et de l'hyperesthésie cutanée (Butler et al. 2005, Divers et al. 2012). Une grande variété d'autres signes cliniques ont été rapportés chez des chevaux supposés infectés par *Borrelia burgdorferi* et incluent de la fièvre modérée, de la léthargie, de l'anorexie, de la raideur, de la myosite, des arthrites avec distensions articulaires, une fourbure, une uvéite antérieure, de l'amaigrissement chronique, une hépatite ou de l'avortement (Butler et al. 2005, Fritz et Kjemtrup 2003, Jonhson et al. 2008, Reed et Toribio 2004). Des cas de neuroborréliose ou de pseudolymphome cutané ont rarement été rapportés (Divers et al. 2012). Une arthrite chronique peut se développer, que certains auteurs ont attribués à un mécanisme auto-immun (Reed et Toribio 2004).

Il est essentiel de souligner que le nombre de cas équins décrits dans la littérature est limité, et parmi ces cas, très peu apportent des preuves indiscutables d'un diagnostic de maladie de Lyme. La crédibilité de ces cas a même été mise en doute par certains auteurs (Butler et al. 2005). De plus, dans une étude réalisée en 2000, 7 poneys sains prétraités pendant 5 jours à la dexaméthasone ont été soumis à une infection expérimentale par la borréliose (Chang et al. 2000). Chez tous ces poneys (mais pas chez les poneys contrôles), une séroconversion a eu lieu et les biopsies cutanées réalisées tous les mois pendant 9 mois ainsi que les prélèvements de différents tissus réalisés *post mortem* ont mis en évidence (par culture et par PCR) une infection par *Borrelia burgdorferi*. Cependant, aucun signe clinique ni aucune lésion histopathologique n'ont été mis en évidence dans ce modèle expérimental. De la même façon, dans un autre protocole expérimental réalisé par la même équipe, aucun des 16 poneys soumis à une infection expérimentale par *Borrelia burgdorferi* n'a présenté de signe clinique au cours des 9 mois de durée de l'étude, qu'ils soient traités par de la tétracycline, de la doxycycline, ou du ceftiofur (n = 12) ou non traités 3 mois après l'infection expérimentale (n = 4) (Chang et al. 2005).

La grande variabilité des signes cliniques rapportés sur les cas suspects de borréliose pourrait selon certains auteurs être liée à une co-infection par un autre agent pathogène transmis par les tiques,

comme par exemple *Anaplasma phagocytophilum*, ou par la variabilité des espèces de *Borrelia burgdorferi* auxquelles les cas ont été exposés (Butler et al. 2005,21).

### ***Examens complémentaires***

Le diagnostic de borréliose chez le cheval est difficile et doit inclure plusieurs tests. Il peut être suspecté si le cheval présente des signes suggestifs, surtout si celui-ci a été exposé à des tiques dans une région à risque, et si les autres hypothèses diagnostiques ont été écartées (Divers et al. 2012, Reed et Toribio 2004). Une réponse favorable à l'administration d'antibiotiques efficaces peut également constituer une piste de diagnostic (Divers et al. 2012, Reed et Toribio 2004). D'autres tests de diagnostic doivent cependant être mis en place pour confirmer toute suspicion clinique.

### *Sérologie*

La complexité de la composition antigénique de *Borrelia burgdorferi* et la cinétique variable des anticorps produits en réponse à une infection implique que le développement de tests sérologiques sensibles et spécifiques constitue un véritable challenge (Rizzoli et al. 2011). Par exemple, il a été démontré que les protéines de surface de *Borrelia burgdorferi* sont nombreuses et que la régulation de leur expression varie au cours du stade de l'infection. Par contre, le corolaire à ce constat est que le développement de tests sérologiques dirigés contre des protéines spécifiques pourrait permettre d'envisager de mieux évaluer la durée de l'infestation (Butler et al. 2005, Wagner et al. 2011). De nombreux tests (qui peuvent être réalisés sur sérum, liquide céphalo-rachidien ou synovie) sont disponibles sur le marché mais leur sensibilité et spécificité respective est fortement discutée, et ce d'autant plus qu'il n'existe pas de « gold standard » universellement reconnu pour les valider. Ce sont principalement des tests d'immunofluorescence indirecte et des tests ELISA qui sont proposés en routine chez le cheval (Butler et al. 2005, Wagner et al. 2011). Il est cependant important de souligner qu'il faut avoir recours à des tests utilisant comme antigènes-cibles des protéines spécifiques de *Borrelia burgdorferi* car il existe des réactions croisées, notamment avec la leptospirose [Butler et al. 2005]. De même, il sera important de savoir si les antigènes détectés sont spécifiques de *Borrelia burgdorferi* sensu stricto ou sensu lato.

Idéalement, pour pouvoir tirer des conclusions fiables, la sérologie devrait être couplée. En effet, étant donné le très grand nombre de chevaux sains séropositifs, un haut titre d'anticorps lors d'une prise de sang ponctuelle n'est pas suffisant pour poser un diagnostic de borréliose (Butler et al. 2005). Sur base des études expérimentales réalisées (Chang et al. 2000), on peut considérer qu'il faut 4 à 6 semaines pour obtenir un début de séroconversion et que cette séroconversion est maximale (et donc significative sur un cas clinique) après seulement 3 mois.

### *Immunofluorescence*

Cette technique est largement proposée par les laboratoires et a été utilisée dans de nombreuses études de séroprévalence de borréliose (Tableau 1). Selon certains auteurs, cette méthode manquerait de

spécificité comparativement à l'ELISA (Dzierzecka et Kita 2002), alors que pour d'autres auteurs elle manquerait plutôt de sensibilité par rapport à l'ELISA (Butler et al. 2005). Il existe cependant très peu d'études comparatives sur la valeur diagnostique respective de ces tests, et de plus les études de validation de ces deux méthodes ont de plus souvent été réalisées dans le cadre de la leur commercialisation. Quoiqu'il en soit, l'intérêt principal de l'immunofluorescence réside dans le fait qu'il s'agit d'une technique quantitative (le résultat est en effet donné avec un titre ou une dilution de positivité).

### *ELISA*

Comme pour l'immunofluorescence, le diagnostic par ELISA est largement proposé par les laboratoires et a été utilisé dans plusieurs études de séroprévalence de borreliose (Tableau 1). Plusieurs tests ELISA ont été utilisés pour le diagnostic de borreliose chez le cheval. Les antigènes utilisés pour détecter la présence de ces anticorps peuvent par exemple s'obtenir à partir de lysats de *Borrelia burgdorferi* entières, par une région antigénique de la flagelline (41-G), par un mélange des antigènes de surface p100, OspC, VlsE et p18, ou encore par l'antigène C6, un peptide synthétique reproduisant la séquence d'une région très conservée de la lipoprotéine de surface Vls-E (Jonhson et al. 2008, Wagner et al. 2013).

Des sensibilités et spécificités variables ont été publiées pour chacun de ces tests, si bien qu'il est difficile de conclure en la supériorité de l'un ou l'autre d'entre eux en l'absence de gold standard. Le test basé sur l'antigène C6 (développé par les laboratoires IDEXX) (SNAP® 4Dx®), qui a été développé chez le chien et offre l'avantage d'être réalisable sur le terrain et d'offrir une réponse immédiate, semblerait offrir chez le cheval une haute spécificité mais une sensibilité plus limitée. Il a aussi été suggéré qu'il pourrait servir à objectiver une réponse favorable à une antibiothérapie dans cette espèce, mais ces résultats devraient être validés sur plus de cas cliniques (Jonhson et al. 2008, Wagner et al. 2013).

Quoiqu'il en soit, dans la plupart des cas, une réponse positive en sérologie persiste de longs mois et ne peut être utilisée comme un moyen de suivi de l'efficacité thérapeutique.

### *Western blot*

Attendu la spécificité discutable des tests d'immunofluorescence ou ELISA, il est conseillé de procéder en 2 étapes : il est conseillé d'utiliser d'abord une de ces 2 méthodes, qui offrent l'avantage d'assurer une haute sensibilité, et en cas de résultat positif par l'une de ces méthodes, d'appliquer un test Western blot (aussi connu sous le nom d'immunoblot) pour confirmer le diagnostic (Butler et al. 2005, Chang et al. 2005, Wagner et al. 2013). Idéalement, ce dernier test doit cependant avoir été développé localement car il existe de grandes variabilités du profil plasmidique et protéique entre les souches isolées dans différents pays européens (Butler et al. 2005). Ces tests western blot restent cependant lourds et coûteux à mettre en œuvre en routine.

### *Test Multiplex*

Un test multiplex ("Lyme Multiplex Assay") utilisant les protéines de surface Osp A, C et F a été mis au point chez l'homme et chez le chien et a été démontré utile pour dater l'infection et suivre une réponse favorable à une antibiothérapie. Bien que présentant de nombreux avantages et ayant été validé chez le cheval (Wagner et al. 2011 et 2013), ce test n'est pas encore utilisé en clinique car il demande des antigènes et des recombinants d'antigènes purifiés de très bonne qualité, qu'il est relativement difficile de se procurer.

### *PCR*

Des tests PCR ont été développés par certains laboratoires. Ils constituent des tests plus sensibles et plus spécifiques que les autres pour le diagnostic de borréliose et permettent de différencier une infection active d'une ancienne infection. Ils peuvent être réalisés sur sang entier, liquide céphalo-rachidien, ou liquide synovial (Butler et al. 2005, Chang et al. 2000, Chang et al. 2005). A titre indicatif, sur plus de 500 échantillons sanguins sur tube EDTA reçus à LABÉO Frank Duncombe dans le cadre de l'exploration d'un syndrome "piro-like", aucun n'a présenté de signal positif. Ceci pourrait être dû au problème inhérent aux tests PCR qui sont des outils très utiles mais qui ne permettent de mettre l'ADN de l'agent pathogène en évidence qu'à l'endroit où il se trouve (sang, liquide articulaire, LCR) et au moment où il s'y trouve.

### *Histopathologie et culture*

Une mise en évidence des spirochètes à l'histopathologie d'une biopsie cutanée proche du site d'attachement de la tique, ou une culture à partir de sang au moment du pic d'hyperthermie, de liquide céphalo-rachidien ou de peau, ont également été rapportés comme moyen de diagnostic, à tout le moins dans des études expérimentales (Chang et al. 2000, Chang et al. 2005). Cependant, ces tests sont très difficiles à réaliser et non disponibles en pratique. De plus, le développement récent des techniques de la technique de PCR remplace de plus en plus la culture.

### *Traitement*

Certains auteurs préconisent une approche préventive de la borréliose sous la forme d'utilisation d'acaricides ou de répulsifs en topique, un contrôle des conditions environnementales, une limitation des mouvements des animaux, une surveillance étroite quotidienne des infestations par les tiques, et un retrait rapide des tiques en cas d'infestation (Butler et al. 2005, Fritz et Kjemtrup 2003). Ces conseils sont bien surs aussi applicables aux autres maladies transmises par les tiques (piroplasmose et anaplasmose). Cependant, aucun acaricide n'a été enregistré et démontré efficace chez le cheval. Tout au moins les insecticides en spray enregistrés chez le chien, principalement la perméthrine, semblent bien tolérés chez le cheval (Butler et al. 2005).

Sur les cas présentant des signes cliniques et des examens complémentaires suggestifs de borréliose, le traitement devrait idéalement être commencé le plus tôt possible. L'administration d'oxytétracycline 6.6 mg/kg IV 2 X/jour constitue le traitement qui semble le plus efficace dans l'espèce équine (Chang et al. 2005). De la doxycycline 10 mg/kg PO 2 X/jour ou du ceftiofur 2.2 mg/kg IM 2 X/jour constituent des solutions alternatives mais moins efficaces (Chang et al. 2005, Reed et Toribio 2004). La faible biodisponibilité de la doxycycline pourrait en partie expliquer sa faible efficacité en administration orale (Chang et al. 2005). Son administration par voie parentérale présente par contre des risques de cardiotoxicité.

Quelle que soit l'option thérapeutique utilisée, si le traitement est efficace, une réponse clinique devrait être obtenue endéans les 2 à 4 premiers jours de mise en place du traitement. Chez certains chevaux, une aggravation des signes en début de traitement semble parfois se manifester, peut-être suite la libération massive de toxines (Reed et Toribio 2004). La durée de traitement est inconnue, mais elle doit toujours être de longue durée (Reed et Toribio 2004). Certains auteurs préconisent 3 à 4 semaines de traitement (Chang et al. 2005), mais chez des chevaux qui ne sont pas traités dès le début de la maladie, la durée de traitement nécessaire pourrait être beaucoup plus longue. D'après l'expérience vécue sur le terrain en France, il semblerait qu'une durée de traitement trop courte, à savoir de 5 à 10 jours, pourrait être associée à une récurrence environ 3 semaines après l'arrêt du traitement.

Une étude menée aux USA sur 251 chevaux avec des titres élevés d'anticorps contre la borréliose (mesurés par ELISA), il a été montré que le traitement aussi bien à la tétracycline 6.6 mg/kg IV SID pendant au moins 5 jours que la doxycycline 10 mg/kg PO BID pendant 10 à 30 jours réduisait légèrement mais significativement leur taux d'anticorps en comparaison aux chevaux non traités. Cette réduction était cependant faible et les titres restaient dans la majorité des cas élevés après traitement, si bien que les auteurs de cet article ne préconisent pas de baser la durée du traitement sur base d'une normalisation de la sérologie mesurée par ELISA, comme cela a été mentionné ci-dessus (Divers et al. 2012).

Un vaccin a été développé aux USA, mais son efficacité est sujette à controverse, surtout pour les cas européens pour lesquels les borrélias impliquées présentent une plus grande diversité génétique qu'aux états unis (Butler et al. 2005, Fritz et Kjemtrup 2003). De plus, le faible nombre de cas démontrés en Europe rend le développement d'un vaccin commercialement peu attractif.

## **2. ÉTUDE DE LA SEROPREVALENCE DE LA BORRELIOSE EQUINE EN BELGIQUE: RESULTATS PRELIMINAIRES**

De nombreux vétérinaires belges ont régulièrement une suspicion de borréliose chez les chevaux qu'ils suivent, et dès lors ils utilisent régulièrement les tests de diagnostic mis à leur disposition en routine par les laboratoires. Dans la plupart des cas, seule une sérologie est réalisée (ELISA ou

immunofluorescence selon les laboratoires) et en cas de séropositivité, il est souvent décidé de mettre en place une antibiothérapie de longue durée, et ce alors que le cheval ne présente pas toujours des signes cliniques spécifiques et que souvent ni une sérologie couplée ni d'autres examens de confirmation (western blot ou PCR) n'ont été mis en place.

A la lumière de la revue de littérature qui a été faite ci-dessus, il est légitime de se poser la question de la pertinence d'une telle approche pour plusieurs raisons (spécificité du diagnostic questionable, utilisation non raisonnée d'antibiotiques et risques liés à leur usage, coût du traitement, etc.).

La présente étude, dont seuls les résultats préliminaires disponibles seront donnés à la journée d'étude de la BEPS, a dès lors pour but (1) de comparer les résultats de sérologie obtenus en utilisant différents tests de diagnostic disponibles en routine en Belgique et (2) d'évaluer la séropositivité chez des chevaux sains vivant en Belgique ou au Grand-Duché du Luxembourg afin d'améliorer l'interprétation des valeurs obtenues chez des chevaux sur lesquels une borreliose est suspectée.

### **Partie 1 : Validation des tests proposés en routine (résultats préliminaires)**

Pour la première partie de l'étude, 63 équidés de plus d'un an présentés à la faculté de médecine vétérinaire pour des problèmes divers et 6 chevaux avec suspicion de borreliose (sur base de signes cliniques présentés, de la réponse clinique à une antibiothérapie appropriée et avec de séroconversions démontrées dans les mois précédents) ont été utilisés. Sur le total des 69 équidés étudiés, 61 étaient des chevaux de race variable, 1 était un âne et 7 étaient des poneys, ils étaient âgés entre 1 et 28 ans et 43 étaient des juments, 23 des hongres et 3 des étalons.

Tous les animaux ont été prélevés après accord du propriétaire à qui il a en outre été demandé de répondre à un questionnaire incluant l'accès ou non à un pâturage, avec le cas échéant la localisation de cette dernière, ainsi que la présentation ou non de signes cliniques évocateurs de borreliose (fièvre, abattement, amaigrissement, boiterie ou fourbure inexplicé, problème ophtalmique ou avortement) ou le portage de tiques dans les 12 derniers mois.

Sur chacun de ces chevaux, un tube sec a été prélevé, et après formation du caillot le sérum a été séparé par centrifugation, réparti dans 3 cryotubes et congelé à -80°C jusqu'à analyse.

Pour chaque prélèvement, 2 tests sérologiques borreliose ont été réalisés: une immunofluorescence (Fluo *Borrelia burgdorferi* Horse, Biopronix) et un ELISA (Testkit *Borrelia burgdorferi* Veterinär ELISA, Fa. Genzyme Virotech). Sur 42 des sérums pour lesquels un seuil de > 1/64 avait été obtenu en immunofluorescence, un western blot (*Borrelia veterinär* plus OspA LINE, IgG Line Immunoblot, Sekisui Virotech GmbH) a de plus été réalisé.

La correspondance entre les résultats obtenus par immunofluorescence et par ELISA est montrée dans le tableau 2 et la figure 1.

Ce tableau et cette figure montrent une relativement bonne correspondance entre les tests, et que seuls 6 des sérums testés étaient négatifs en ELISA alors qu'ils étaient positifs (titres  $\geq 1/512$ ) en

immunofluorescence. Aucun d'entre eux n'était par contre positif en ELISA avec un titre  $\leq 1/64$  en immunofluorescence.

Les tableaux 3 et 4 montrent la correspondance entre les résultats obtenus d'une part par Western Blot, et d'autre part par immunofluorescence et ELISA, respectivement. Si on considère le Western Blot comme le Gold Standard et que l'on considère négatifs en immunofluorescence tous les prélèvements avec un titre  $< 1/512$  et positifs tous ceux avec un titre  $\geq 1/512$ , l'immunofluorescence présenterait une sensibilité située autour de 100 % et une spécificité située autour de 58 %, et l'ELISA une sensibilité et spécificité situées aux alentours de 75 %.

Ces résultats doivent néanmoins être pris avec énormément de prudence car ils ne se basent que sur des résultats partiels et n'incluent dès lors qu'un nombre limité de cas, et ce surtout en ce qui concerne les cas positifs en Western Blot. De plus, l'utilisation du Western Blot comme Gold Standard est fortement discutable, certains auteurs considérant qu'il n'existe pas de Gold standard pour confirmer les cas de borreliose par sérologie. Enfin, le nombre de sérums testés par immunofluorescence et par ELISA n'est pas le même, et pour la validation de l'immunofluorescence, les sérums avec un titre  $\leq 1/64$  ont tous été considérés comme négatifs sans vérification par Western Blot, ce qui est une source d'erreur potentielle.

Néanmoins, il est intéressant de remarquer que sur base des résultats partiels de cette étude, l'immunofluorescence est une technique qui, si le seuil de positivité utilisé est placé haut, semble offrir une sensibilité et une spécificité intéressantes en comparaison avec l'ELISA utilisé dans cette étude. Ces résultats partiels devront néanmoins être validés sur un plus grand nombre d'échantillons. La validation interne de l'ELISA par le producteur du kit utilisé dans notre étude annonce par exemple en effet, sur base de 351 échantillons de chevaux issus de la région d'Hannovre (Allemagne), des valeurs de sensibilité et de spécificité plus élevées (100 et 96 % respectivement) que celles obtenues dans notre étude. Quoiqu'il en soit, l'immunofluorescence étant quantitative, elle permet de réaliser plus facilement que l'ELISA une sérologie couplée.

### **Partie 2 : Séoprévalence de la borreliose sur des chevaux sans signes de borreliose et vivant en Belgique ou au Grand-duché du Luxembourg (résultats préliminaires)**

Pour cette deuxième partie de l'étude, 69 équidés de plus d'un an n'ayant pas quitté le territoire belge ou luxembourgeois dans les 12 derniers mois et soit présentés à la faculté de médecine vétérinaire pour des problèmes n'ayant aucune relation possible avec la borreliose (plaies, coliques, suivi de reproduction, etc.), soit n'ayant aucun symptôme et prélevés sur le terrain, ont été à ce jour inclus (l'étude est toujours en cours). Parmi eux, 43 étaient des juments, 18 des hongres et 8 des étalons. Ils incluaient 59 chevaux de race variable, 2 ânes et 8 poneys, et ils étaient âgés entre 1 et 28 ans. 58 venaient de Wallonie, 5 de Flandres et 6 du Grand-Duché du Luxembourg.



Sur chacun de ces chevaux, un tube sec a été prélevé en utilisant la même méthodologie que pour la première partie de l'étude, et le même questionnaire a été complété par le propriétaire de chaque cheval.

Pour chaque animal prélevé, la sérologie borréliose a été mesurée par utilisation du même test d'immunofluorescence que dans la première partie de l'étude (Fluo *Borrelia burgdorferi* Horse, Biopronix). Sur base des résultats obtenus dans cette dernière, les sérums des chevaux ayant un seuil de 1/512 ou plus ont été soumis au Western Blot utilisé pour la première étude (*Borrelia veterinär plus* OspA LINE, IgG Line Immunoblot, Sekisui Virotech GmbH). D'autre part, sur 53 des 69 animaux étudiés, la sérologie a aussi été testée par utilisation du même test ELISA que celui utilisé dans la première étude (Testkit *Borrelia burgdorferi Veterinär ELISA*, Fa. Genzyme Virotech).

En prenant le seuil de signification de l'immunofluorescence à 1/512, comme suggéré dans la première partie de cette étude, 15 (22 %) des animaux testés étaient positifs. La localisation géographique des animaux testés avec leur résultat en immunofluorescence est montrée à la figure 2a. Parmi les chevaux testés positifs en immunofluorescence, seulement 3 (soit 4 % de la population globale étudiée) étaient positifs et 1 était douteux au Western Blot (figure 2c).

En se basant sur le test ELISA, 11 (soit 21 %) des 53 animaux testés étaient positifs, et 7 (13 %) étaient douteux. La localisation géographique des animaux testés avec leur résultat en ELISA est montrée à la figure 2b.

De nouveau, comme pour la première partie de cette étude, ces résultats doivent être pris avec précaution car ils ne se basent que sur des résultats partiels, et le faible nombre d'échantillons testés limite les conclusions qui pourraient être tirées.

Néanmoins, ils donnent déjà une première idée de la séroprévalence de la borréliose (autour de 20 % en immunofluorescence aussi bien qu'en ELISA) chez des chevaux sains habitant en Belgique ou au Grand-Duché du Luxembourg. Ce chiffre se rapproche des résultats obtenus dans plusieurs autres pays du Nord de l'Europe mais un est peu plus faible que celui de 36 % rapporté par Moyart et collaborateurs en 2006 chez des chevaux sains vivant en Flandres. Cette différence pourrait être liée au test ELISA utilisé qui était en effet différent que celui de la présente étude.

Le nombre important de chevaux présentant une sérologie positive en l'absence de signes cliniques et la variabilité des résultats obtenus en fonction des tests sérologiques utilisés pour le diagnostic borréliose incitent à la plus grande prudence dans l'interprétation des résultats. Sur un cheval présentant des signes cliniques suggestifs de borréliose avec une sérologie douteuse ou positive, que ce soit en immunofluorescence ou en ELISA, il est capital de confirmer le résultat par une autre technique plus spécifique, à savoir une sérologie couplée, un Western Blot, ou un PCR.

### **3. CONCLUSIONS**

En conclusion, un diagnostic de borréliose ne peut être posé que si 4 conditions sont remplies :

1. Le cheval vit dans une région à risques et est exposé à l'hôte intermédiaire (tiques du genre Ixodus)
2. Il présente des signes cliniques suggestifs de la maladie de Lyme
3. Il présente une sérologie douteuse ou positive
4. La sérologie douteuse ou positive a été confirmée par un ou plusieurs autres tests (sérologie couplée et/ou Western Blot ou PCR)

Sur les cas où un diagnostic a été posé, et uniquement sur ces cas, il est utile de mettre rapidement en place une antibiothérapie adaptée.

#### **4. BIBLIOGRAPHIE**

**Blanc F.** Epidemiology of Lyme borreliosis and neuroborreliosis in France. Rev Neurol (Paris) 2009 ;165:694-701

**Butler CM, Houwers DJ, Jongejan F, van der Kolk JH.** *Borrelia burgdorferi* infections with special reference to horses. A review. Vet. Q. 2005;27:146-56

**Chang YF, Novosol V, McDonough SP, Chang CF, Jacobson RH, Divers TJ, Quimby FW, Shin S, Lein DH.** Experimental Infection of Ponies with *Borrelia burgdorferi* by Exposure to Ixodid Ticks. Vet. Pathol. 2000;37:68-76.

**Chang YF, Ku YW, Chang CF, Chang CD, McDonough SP, Divers TJ, Pough M, Torres A.** Antibiotic treatment of experimentally *Borrelia burgdorferi*-infected ponies. Vet. Microbiol. 2005;107:285-294

**Divers TJ, Grice AL, Mohammed HO, Glaser AL, Wagner B.** Changes in *Borrelia burgdorferi* ELISA antibody over time in both antibiotic treated and untreated horses. Acta Vet. Hungarica 2012;60:421-9.

**Dzierzecka M, Kita J.** The use of chosen serological diagnostic methods in Lyme disease in horses. Part II. Western blot. Polish J. Vet. Sc. 2002, 5, 79-89.

**Fritz CL, Kjemtrup AM.** Lyme borreliosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2003;223:1261-70.

**Johnson AL, Divers TJ, Chang YF.** Validation of an in-clinic enzyme-linked Immunosorbent Assay kit for diagnosis of *Borrelia burgdorferi* Infection in Horses. J. Vet. Diagnostic Investigation 2008;20:321-324.

- Kesteman T, Rossi C, Bastien P, Brouillard J, Avesani V, Olive N, Martin P, Delmée M.** Prevalence and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Ixodes ticks in Belgium. Acta Clin Belg. 2010 ;65:319-22.
- Leblond A, Pradier S, Pitel PH, Fortier G, Boireau P, Chadoeuf J, Sabatier P.** An epidemiological survey of equine anaplasmosis (*Anaplasma phagocytophilum*) in southern France. Rev Sci Tech. 2005;24:899-908.
- Reed SM, Toribio R.** Lyme disease in horses. . In: *Equine Internal Medicine* (second edition), Reed, S.M., Bayly, W.M., Sellon D.C. (Eds), W.B. Saunders Cie, Philadelphia, 2004:656-657.
- Rizzoli A, Hauffe H, Carpi G, Vourc H G, Neteler M, Rosa R.** Lyme borreliosis in Europe. Euro Surveill. 2011;16:19906.
- Wagner B, Freer H, Rollins A, Erb H.N., Lu Z., Grohn Y.** Development of a multiplex assay for the detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in horses and its validation using Bayesian and conventional statistical methods. Vet. Immunol. Immunopathol. 2011;144:374-81.
- Wagner B, Goodman LB, Rollins A, Freer HS.** Antibodies to OspC, OspF and C6 antigens as indicators for infection with *Borrelia burgdorferi* in horses. Equine Vet J. 2013 ;45:533-7

**Tableau 1:** Séroprévalence équine contre *Borrelia burgdorferi* en Europe rapportée dans la littérature

Pays	Région	Références	Nombre d'équidés	Test utilisé	Séroprévalence
Allemagne	Berlin	Käsbohrer et Schönberg Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 1990;103:374-8	224	IFAT ELISA	0 % 16.1 %
Royaume Uni	Diverses régions	Carter et al. Equine Vet J. 1994;26:187-90	Non spécifié	ELISA WB	Basse (3 à 35 % selon les régions)
Suède	Diverses régions	Egenvall et al. Preventive Vet. Med. 2001;49:191-208	2.018 dont 400 sains	IFAT	Sains : 16.5 % Total : 16.8 %
Autriche	Diverses régions	Muller et al. Int J Med Microbiol. 2002;291(Suppl 33):80-7	309	WB	52 à 93 % selon espèces
Belgique	Flandres	Moyaert et al. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift 2006;75:436-8	100	ELISA	36 %
France	Centre-ouest Nord Sud	Maurizi et al. Vector Borne Zoonotic Dis. 2010;10:535-7	144 159 105	ELISA (SNAP 4DX)	31 % 48 % 12 %
Pologne	Diverses régions	Stefanciková et al. Ann Agric Environ Med. 2008;15:37-43	395 25	ELISA WB	25.6 % 60.0 %
Danemark	Diverses régions	Hansen et al. Acta Vet Scand. 2010 ;52:3	390	ELISA (SNAP 4DX)	29.0 %
Roumanie	Diverses régions	Kiss et al. Vector Borne Zoonotic Dis. 2011;11:1259-62	260	IFAT	11.9 %
Italie	Centre	Ebani et al. Ann Agric Environ Med. 2012;19:237-40	386	IFAT	24.3% *1
	Centre	Laus et al. J Vet Med Sci. 2013;75:715-20	300	IFAT	7.0 %

**Tableau 2.** Comparaison des résultats sérologiques de borreliose obtenus par immunofluorescence et par ELISA chez 69 chevaux avec des problèmes divers.

		ELISA			
		Négatifs	Douteux	Positifs	TOTAL
IF	1/64	20	1	0	<b>21</b>
	1/128	6	1	1	<b>8</b>
	1/256	14	3	2	<b>19</b>
	1/512	6	3	9	<b>18</b>
	1/1024 ou +	0	1	2	<b>3</b>
	<b>TOTAL</b>	<b>46</b>	<b>9</b>	<b>14</b>	<b>69</b>

IF = Immunofluorescence

**Tableau 3.** Comparaison des résultats sérologiques de borreliose obtenus par immunofluorescence et par Western Blot chez 66 chevaux avec des problèmes divers.

		WB			
		Négatifs	Douteux	Positifs	TOTAL
IF	≤ 1/64	21*	-	-	<b>21</b>
	1/128	8	0	0	<b>8</b>
	1/256	13	3	0	<b>16</b>
	1/512	13	3	2	<b>18</b>
	1/1024 ou +	1	0	2	<b>3</b>
	<b>TOTAL</b>	<b>56</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>66</b>

IF = Immunofluorescence ; WB = Western Blot ; NM = non testés

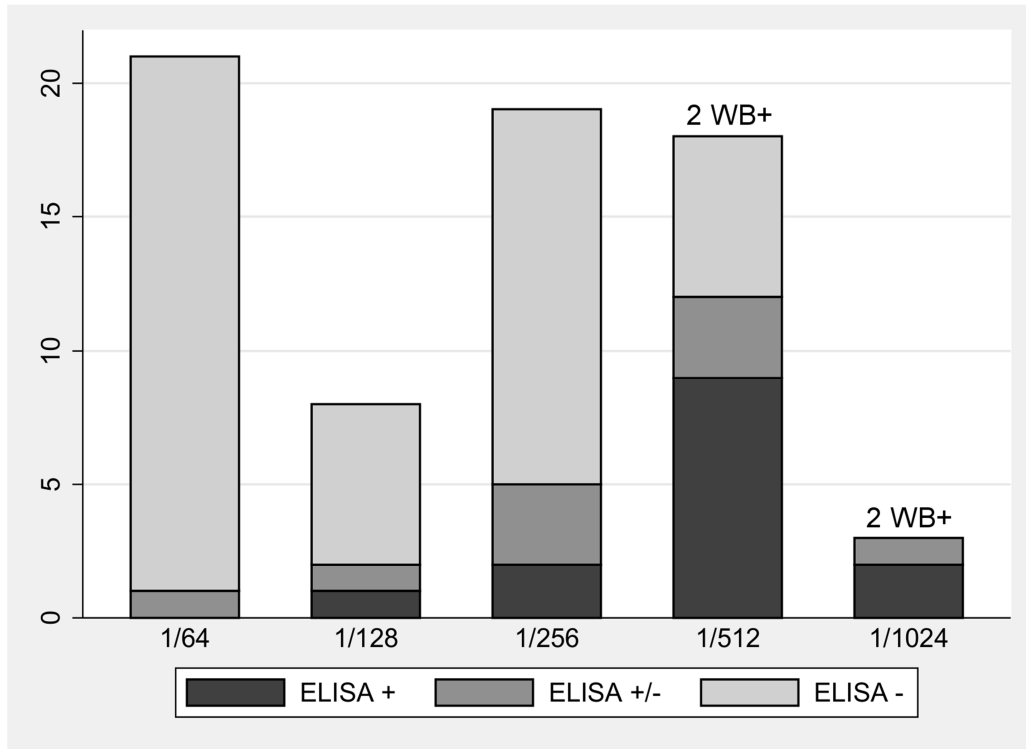
\* Les 21 sérums avec titre ≤ 1/64 n'ont pas été testés en WB en raison du faible titre et ont été considérés comme négatifs.

**Tableau 4.** Comparaison des résultats sérologiques de borreliose obtenus par ELISA et par Western Blot chez 45 chevaux avec des problèmes divers.

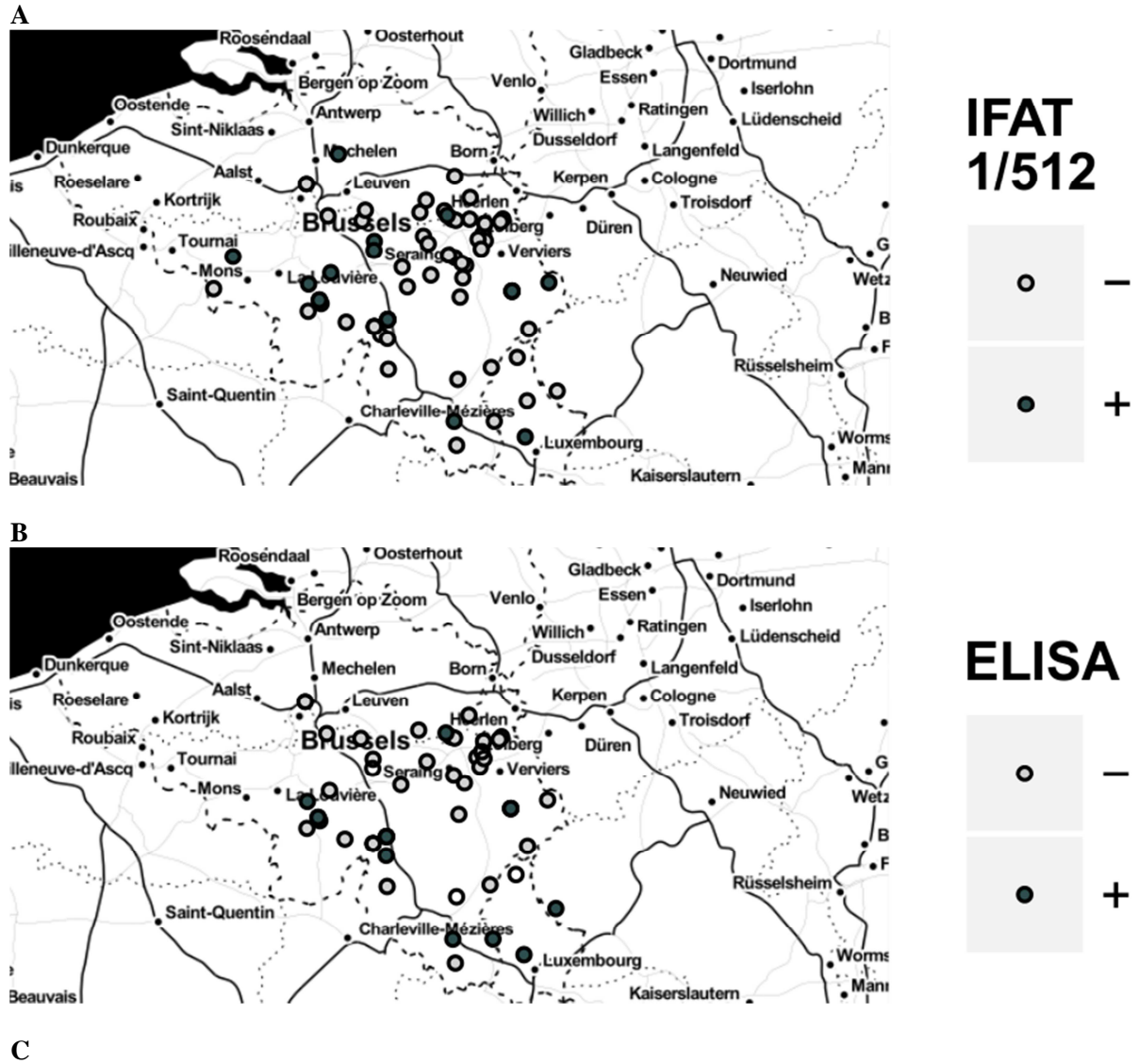
		WB			
		Négatifs	Douteux	Positifs	TOTAL
ELISA	Négatifs	21	1	1	<b>23</b>
	Douteux	7	1	0	<b>8</b>
	Positifs	7	4	3	<b>14</b>
	<b>TOTAL</b>	<b>35</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>45</b>

WB = Western Blot

**Figure 1.** Parmi 69 sérums obtenus chez des chevaux présentés à la clinique équine de l'ULg avec des problèmes divers, nombre des sérums présentant un titre borréliose de 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 et 1/1024 en immunofluorescence et, pour chacun des titres obtenus en immunofluorescence, nombre des sérums présentant un test ELISA négatif, douteux ou positif. Le nombre de sérums présentant un test Western Blot positif sont en outre montrés pour chaque seuil.



**Figure 2.** Répartition géographique des équidés utilisés dans l'étude de séroprévalence de la borreliose chez des animaux sains vivant en Belgique ou au Grand-Duché du Luxembourg par utilisation d'un test d'immunofluorescence (IFAT) au seuil de 1/512 (A), ELISA (B), et Western Blot (C).







## **BORRELIOSE : MYTHE OF REALITEIT ?**

AMORY Hélène<sup>1</sup>, HOUBEN Rosa<sup>1</sup>, PITEL Pierre Hugues<sup>2</sup>, MEERSCHAERT Carole<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pôle Equin, Secteur Médecine interne équine, Département des Sciences Cliniques, Université de Liège, Bât. B 41 Sart Tilman, B 4000 Liège, Belgique

<sup>2</sup>LABÉO Frank Duncombe, 14053 Caen cedex 4, France

<sup>3</sup>Laboratoire Collard, Synlab Belgique, Bvd de Froidmont, 14, 4020 LIEGE

### 1. LITERATUURREVIEW

#### ***Etiologie en epidemiologie***

Borreliose (synoniem : ziekte van Lyme) is de meest voorkomende door teken overgebrachte ziekten in gematigde klimaatzones van het noordelijk halfrond (Rizzoli et al., 2011). Het betreft een multisystemische aandoening ten gevolge van de spirocheet *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl), waarvan 18 verschillende subspecies bestaan, waarbij co-infectie van meerde soorten in dezelfde vector kan bestaan (Rizzoli et al., 2011). Onder deze soorten bevinden zich meerdere, inclusief met name *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (ss), welke niet uitsluitend pathogeen zijn voor mensen, maar ook voor andere vertebrate zoals bijvoorbeeld honden, runderen, katten en paarden (Reed and Andrews, 2004; Rizzoli et al., 2011). De voornaamste vectors in Europa zijn teken van het genus *Ixodes ricinus* (Butler et al., 2005; Rizzoli et al., 2011), welke op elk moment van hun levenscyclus geïnfecteerd kunnen raken; meestal door een bloedmaal bij een gastheer van een diersoort behorend tot een competent reservoir. Een competente reservoir-gastheer is een diersoort welke door teken met *Borrelia* geïnfecteerd kan worden en in staat is deze infectie vervolgens over te dragen aan niet-geïnfecteerde teken. Competente gastheersoorten in Europa zijn onder andere kleine knaagdieren (muis, konijn), musachtige vogelsoorten, reptielen en insectivoren (Rizzoli et al., 2011). Steeds meer onderzoeken wijzen uit dat de Europese *Ixodes ricinus*-populatie zich uitbreidt, met als gevolg de opkomst van niet alleen borreliose, maar ook andere door dezelfde vector overgebrachte ziekten zoals anaplasmosse (zie tevens verderop in deze tekst). Genoemde mogelijke oorzaken voor dit fenomeen zijn veranderingen van de leefomgeving, klimaatverandering (Rizzoli et al., 2011). De biodiversiteit van *Borrelia* species varieert afhankelijk van geografische locatie en is maximaal tussen 4 en 20 lengtegraad en 35 tot 60 breedtegraad, alwaar van de prevalentie van *Borrelia burgdorferi*-

infectie in teken tevens het hoogst is (Rizzoli et al., 2011). Locale omstandigheden hebben echter een groot effect op deze globale verdeling; boven 1300m hoogte bijvoorbeeld zijn Borreliosegevallen veel minder frequent (Rizzoli et al., 2011).

Van tenminste 26 Europese landen is bekend dat borreliose er voorkomt; dit betreft voornamelijk de Noord- en Centraaleuropese landen (Rizzoli et al., 2011). In Frankrijk en België is de gemiddelde prevalentie van borreliose-infectie onder teken respectievelijk 7% (Blanc, 2009) en 12% (Kesteman et al., 2010), met grote lokale variatie afhankelijk van de plaatselijke biotoop. In Frankrijk zijn de hoog-risico regio's Limousin, Auvergne, Lorraine en Alsace (Blanc, 2009); in de in België uitgevoerde studie varieerde de lokale prevalentie tussen 2.8 tot 21.6% afhankelijk van de regio waar de teken gemonsterd werden (Kesteman et al., 2010). Percentages tot ongeveer 40% zijn gerapporteerd op sommige Oosteuropese landen zoals Bulgarije en Slowakije (Butler et al., 2005).

Gepubliceerde seroprevalenties onder gezonde, levende paarden en paardachtigen in Europa zijn samengevat in Tabel 1; deze tabel bevestigt tevens de eerder genoemde hoge prevalentie in Centraal- en Noord-Europa.

### ***Klinische verschijnselen***

Borreliose-infectie vertoont een seizoenspatroon met de hoogste incidentie in lente, zomer en herfst met een piek in juni-juli (Reed and Andrews, 2004; Rizzoli et al., 2011). Klinische verschijnselen bij met *Borrelia burgdorferi* geïnfecteerde paarden zijn echter zeldzaam en veelal mild; de meest voorkomende verschijnselen zijn sporadische, van ledemaat wisselende kreupelheid en cutane hypersensitiviteit (Butler et al., 2005; Divers et al., 2012). Een groot aantal andere verschijnselen zijn beschreven bij paarden verdacht van infectie met *Borrelia burgdorferi*, waaronder milde koorts, lethargie/sloomheid, anorexie, stijfheid, myopathie, artritis met gewrichtsovervulling, hoefbevangenheid, uveitis, chronisch gewichtsverlies, hepatitis en abortus (Butler et al., 2005; Fritz and Kjemtrup, 2003; Johnson et al., 2008; Reed and Andrews, 2004). Zeer zelden is neuroborreliose of cutaan pseudolymfoom gerapporteerd (Divers et al., 2012). Chronische artritis kan optreden, door sommige auteurs toegeschreven aan een auto-immuun reactie; dit is echter niet bewezen (Reed and Andrews, 2004).

Het moet absoluut benadrukt worden dat het aantal cases van borreliose bij paarden dat beschreven is in de literatuur zeer beperkt is, en dat bovendien weinig daarvan onweerlegbaar

bewijs geven voor de diagnose “ziekte van Lyme”, daarbij deze cases later door andere auteurs in twijfel getrokken (Butler et al., 2005). Bovendien is er een in 2000 uitgevoerde studie, waar 5 pony's na voorbehandeling van 5 dagen dexamethason experimenteel geïnfecteerd werden met borreliose (Chang et al., 2000). Alle ponies (in tegenstelling tot de controle-ponies) toonden een seroconversie; daarnaast werd infectie met *Borrelia burgdorferi* middels PCR aangetoond in maandelijks huidbiopsien genomen gedurende 9 maanden alsmede bij post-mortem weefselmonster. Er was echter geen sprake van noch klinische verschijnselen bij de ponies noch histopathologische lesies in dit experimentale model. Een ander studieprotocol door dezelfde onderzoeksgroep met experimentele infectie met *Borrelia burgdorferi* van 16 ponies, behandeld met tetracycline, doxycycline of ceftiofur 3 maanden na infectie of zonder behandeling, werd gedurende de 9 maanden durende studie geen enkel klinisch verschijnsel waargenomen (Chang et al., 2005).

De grote variatie aan klinische verschijnselen die is beschreven bij van borreliose verdachte cases is volgens sommige auteurs toe te schrijven aan co-infectie met andere pathogenen, of aan de variatie in *Borrelia*-species waaraan dieren werden blootgesteld (Butler et al., 2005).

### ***Aanvullende onderzoeken***

De diagnose borreliose bij het paard is lastig te stellen en omvat noodzakelijkerwijs meerdere testen. Een verdenking kan bestaan indien het paard suggestieve verschijnselen vertoont, zeker als het dier tevens aan tekenen blootgesteld is geweest in een hoog-risico regio *en* overige mogelijke diagnoses zijn uitgesloten (Divers et al., 2012; Reed and Andrews, 2004). Een gunstige respons op diagnostische therapie met antibiotica is een andere mogelijkheid (Divers et al., 2012; Reed and Andrews, 2004); andere aanvullende onderzoeken dienen echter ook ondernomen te worden om een klinische verdenking te bevestigen.

### ***Serologie***

De complexe genetische compositie van *Borrelia burgdorferi* en de variabele kinetiek van de verschillende in respons op infectie geproduceerde antistoffen maken de ontwikkeling van serologische testen die sensitief *en* specifiek zijn een moeilijke opgave (Rizzoli et al., 2011). Zo is bijvoorbeeld aangetoond dat *Borrelia burgdorferi* vele zogenaamde “outer surface proteins” (Osp's) heeft en dat de regulatie van expressie van deze Osp's varieert afhankelijk van het

stadium van infectie. Dit gegeven leidt er toe dat serologische testes ontwikkeld kunnen worden gericht op specifieke eiwitten, hetgeen een indicatie van de duur van infectie kan geven (Butler et al., 2005; Wagner et al., 2011). Verscheidene tests (uitvoerbaar op serum, CSF of synovia) zijn momenteel commercieel beschikbaar; hun sensitiviteit en specificiteit worden echter sterk in twijfel getrokken, ook gezien de afwezigheid van een werkelijke gouden standaard voor testvalidatie.

De voornaamste testen in gebruik bij het paard zijn directe immunofluorescentie en ELISA (Butler et al., 2005; Wagner et al., 2011). Het moet echter benadrukt worden dat het noodzakelijk is kritisch te zijn aangaande testen gericht tegen *Borrelia burgdorferi*-specifieke antigenen aangezien kruisreacties bestaan met andere pathogenen, met name Leptosirose (Butler et al., 2005). Daarnaast is het noodzakelijk te weten of de test antigenen detecteert die specifiek zijn voor *Borrelia burgdorferi* sensu stricto of sensu lato.

Voor meer betrouwbare conclusies zijn idealiter gepaarde sera nodig. Gezien het grote aantal gezonde, seropositieve paarden is het vinden van een hoge titer bij een losstaand bloedmonster onvoldoende voor het stellen van de diagnose van borreliose (Butler et al., 2005). Op basis van studies van experimentele infectie (Chang et al., 2000), kan gesteld worden dat 4-6 weken nodig zijn voor seroconversie en dat maximale conversie (significant in geval van een klinische casus) pas op 3 maanden na infectie optreedt.

### *Immunofluorescentie*

Deze onderzoekstechniek wordt door vele laboratoria aangeboden en is gebruikt in een groot aantal studies naar de seroprevalentie van borreliose (Tabel 1). Volgens sommige onderzoekers is deze methode minder specifiek dan de ELISA (Dzierzecka and Kita, 2002) terwijl volgens andere onderzoekers deze techniek juist een mindere sensitiviteit heeft dan ELISA (Butler et al., 2005). Studies waarbij de diagnostische waarde van beide tests vergeleken wordt zijn echter zeer schaars en worden bovendien meestal uitgevoerd ter validatie van een nieuw op de markt te brengen commerciële test. Hoe dan ook, het voornaamste gegeven is dat er sprake is van een kwantitatieve test (het resultaat wordt weergegeven middels een positieve titer of verdunning).

### *ELISA*

Net als immunofluorescentie is ook ELISA beschikbaar bij vele laboratoria en is gebruikt in meerdere seroprevalentie-studies (Tabel 1). Verschillende ELISA tests zijn gebruikt voor het diagnosticeren van borreliose bij het paard. De voor de test gebruikte antigenen -die dienen ter detectie van antistoffen- kan zijn een lysaat van *Borrelia burgdorferi* in zijn geheel, een antigene region van flagelline (41-G), een mix van de Osp's p100, OspC, VlsE en p18 of het antigeen C6, een synthetisch eiwit met een kopie van een sterk geconserveerde regio van het oppervlakte-lipoproteïne VlsE (Johnson et al., 2008; Wagner et al., 2013).

De sensitiviteit en specificiteit van ieder van deze testen zijn geplubliceerd, desondanks is het lastig te beoordelen welke van deze testen onderling beter presteert dan de anderen, mede door het feit dat een ware gouden standaard niet voorhanden is. Een door IDEXX voor honden ontworpen ELISA SNAP ®- test gebaseerd op het antigeen C6, die als voordeel heeft dat een resultaat direct beschikbaar is, lijkt bij gebruik bij het paard een goede specificiteit maar matige sensitiviteit te hebben. Er is tevens gesuggereerd dat met deze test op een objectieve manier de respons op behandeling met antibiotica beoordeeld kan worden ; dit moet echter eerst nog worden gevalideerd in een voldoende aantal klinische cases (Johnson et al., 2008; Wagner et al., 2013). Hoe dan ook, in de meeste gevallen blijft serologie vele maanden positief en kan niet worden gebruikt als follow-up wat betreft de effectiviteit van een ingestelde therapie.

#### *Western Blot*

Gezien de zeer twijfelachtige specificiteit van immunofluorescentie of ELISA is het aan te raden om in 2 stappen te werken: eerst gebruikt men een van bovengenoemde, zeer gevoelige testmethodes; in geval van een positief resultaat, wordt een immunoblot (om precies te zijn een Western Blot) uitgevoerd om de diagnose te bevestigen (Butler et al., 2005; Chang et al., 2005; Wagner et al., 2013). Deze Western Blot is idealiter een lokaal ontwikkelde test aangezien er sterke variatie bestaat in plasmide- en eiwitprofiel in de geïsoleerde stammen in verschillende Europese landen (Butler et al., 2005). Nadeel van de Western Blot is dat de implementatie ervan bewerkelijke en derhalve duur is voor het laboratorium.

#### *Multiplex Test*

Een multiplex test genaamd "Lyme Multiplex Assay" welke gebruik maakt van de Osp's A, C en F is in de humane geneeskunde in gebruik genomen ; in honden is aangetoond dat deze test

gebruikt kan worden voor het antedateren van infectie en voor het evalueren van gunstige respons op therapie met antibiotica. Hoewel dit vele voordelen oplevert en hoewel deze test inmiddels bij het paard gevalideerd is (Wagner et al., 2013, 2011), is deze test op dit moment in de klinische praktijk niet bruikbaar vanwege de noodzaak tot beschikking over gepurifieerde antigenen/recombinante antigenen van zeer hoge kwaliteit, hetgeen lastig te verkrijgen is.

### *PCR*

Enkele laboratoria hebben een PCR test ontwikkeld. Dit zijn de meest gevoelige en de meest specifieke testen voor het stellen van de diagnose borreliose en zijn een middel om te bepalen of er sprake is van een actieve of een vroegere infectie. PCR kan uitgevoerd worden op bloed, CSF of synoviaalvloeistof (Butler et al., 2005; Chang et al., 2005, 2000). Ter informatie; van meer dan 500 bloedmonsters ingestuurd naar het laboratorium Frank Duncombe in Caen in het kader van onderzoek naar “piro-like” verschijnselen, is geen enkel staal positief bevonden. Een mogelijke oorzaak hiervan is een probleem inherent aan PCR-techniek ; hoewel een uiterst nuttige diagnostische methode, kan pathogeen DNA uitsluitend worden aangetoond daar waar het zich bevindt (bloed, synovia, CSF) en op het moment dat het zich daar bevindt.

### *Histopathologie en Kweek*

Het aantonen van spirocheten bij histopathologie van een huidmonster in de nabijheid van de teekbeet, een bloedkweek genomen tijdens een koortspiek of een kweek van CSF- of huidmonster zijn andere beschreven diagnostische methodes (Chang et al., 2005, 2000). Deze technieken zijn echter lastig uit te voeren en in de praktijk niet beschikbaar. Bovendien heeft de ontwikkeling van PCR deze methodes grotendeels vervangen.

### ***Behandeling***

Sommige onderzoekers pleiten vooral voor een preventieve benadering tegen borreliose door middel van het toepassen van acariciden en topische insectenwerende middelen, verbetering van omgevingscondities, het verminderen van verplaatsing van dieren en dagelijks zorgvuldige controle van teekinfestatie met snelle verwijdering van aanwezige teken (Butler et al., 2005; Fritz and Kjemtrup, 2003). Deze aanbevelingen gelden evenzeer voor andere door teken

overgebrachte ziekten (piroplasmose, anaplasrose). Er bestaat echter heden geen enkel acaricide dat geregistreerd is en een bewezen werkzaamheid heeft bij het paard (Butler et al., 2005). Wanneer bij een paard het klinisch beeld en aanvullend onderzoek zeer suggestief zijn voor borreliose, wordt behandeling het beste zo snel mogelijk begonnen. De meest effectieve behandeling bij het paard lijkt oxytetracycline (IV, 6.6 mg/kg BID)(Chang et al., 2005). Doxycycline (PO 10 mg/kg BID) of ceftiofur (IM 2.2mg/kg BID) zijn andere, maar minder effectieve behandelopties (Chang et al., 2005; Reed and Andrews, 2004). Doxycycline is mogelijk maar matig werkzaam vanwege zijn slechte orale biodisponibiliteit (Chang et al., 2005); parenterale administratie is echter niet mogelijk vanwege het risico van cardiotoxiciteit. Welke behandeling er ook gekozen wordt, wanneer deze effectief is wordt een klinische respons normaliter gezien binnen 2-4 dagen na aanvang van de behandeling. Bij sommige paarden wordt aanvankelijk een verergering van klinische verschijnselen gezien, mogelijk ten gevolge van massaal vrijkomen van toxines (Reed and Andrews, 2004). De exacte noodzakelijke behandelingsduur is niet bekend maar langdurige therapie is in alle gevallen nodig (Reed and Andrews, 2004). Sommige onderzoekers raden een periode van 3 tot 4 weken aan (Chang et al., 2005); echter bij paarden waarbij behandeling niet is begonnen bij aanvang van de ziekte, is de benodigde behandelingsduur wellicht langer. Volgens berichten van praktici in Frankrijk, lijkt het erop dat een te korte therapieduur (te weten 5 tot 10 dagen) soms geassocieerd is met een recidive van klinische verschijnselen op ongeveer 3 weken na het stoppen van de behandeling. Een in de Verenigde Staten uitgevoerde studie bij 251 paarden met een positieve borreliose-titer (obv. ELISA) toonde aan dat een behandeling met tenmiste 5 dagen oxytetracycline (6.6 mg/kg IV BID) gevolgd door 13 tot 30 dagen doxycycline (10 mg/kg PO BID) leidde tot een kleine maar statistisch significante vermindering van antilichaamtiteren vergeleken met niet-behandelde paarden. Deze vermindering was echter maar weinig en bovendien bleven de meerderheid van de titers verhoogd ook na behandeling ; de onderzoekers wijzen er echter ook op dat, zoals hierboven al eerder vermeld, het bepalen van de duur van behandeling niet gebaseerd dient te worden op een normalisatie van ELISA-titers (Divers et al., 2012). Een vaccin tegen borreliose is ontwikkeld in de VS, maar zijn werkzaamheid wordt in twijfel getrokken, des te meer in Europa aangezien de *Borrelia* spp's die hier gevonden worden een grotere genetische diversiteit vertonen dan in de VS (Butler et al., 2005; Fritz and Kjemtrup,

2003). Bovendien is, gezien het zeer kleine aantal gevallen van bewezen borreliose in Europa, de ontwikkeling van een vaccin commercieel onaantrekkelijk.

## **2. ONDERZOEK NAAR DE SEROPREVALENTIE VAN EQUINE BORRELIOSIS IN BELGIE EN LUXEMBURG: PRELIMINAIRE RESULTATEN**

Vele belgische dierenartsen hebben regelmatig een klinische verdenking van borreliose bij hun patienten, dientengevolge gebruiken zij regelmatig de door laboratoria routinematig aangeboden diagnostische testen. In de meeste gevallen wordt een serologie uitgevoerd (ELISA of immunofluorescentie, per laboratorium verschillend) en in geval van een positieve titer wordt overgegaan tot langdurige antibiotica-therapie, ook al toont het paard geen specifieke klinische verschijnselen; vaak wordt geen verder geen gepaarde serumtiter bepaald of andere aanvullende onderzoeken (Western Blot, PCR, etc.) uitgevoerd.

In het licht van de in de hierboven samengevatte literatuurstudie kan deze aanpak met legitieme redenen in twijfel worden getrokken, en dit om meerdere redenen (specificiteit van positieve diagnose is twijfelachtig, kosten en risico's verbonden aan onnodig gebruik van antibiotica, etc.). Dit onderzoek (waarvan heden ten tijde van de BEPS wetenschappelijke bijeenkomst uitsluitend preliminaire resultaten beschikbaar zijn) heeft derhalve als doel om (1) de resultaten van verschillende in België routinematig gebruikte testmethoden te vergelijken, en (2) het bepalen van de seroprevalentie bij gezonde paarden in België en Luxemburg ter verbetering van de interpretatie van testresultaten bij paarden die verdacht zijn van borreliose.

### ***Deel 1: Validatie van routinematig aangeboden testen (preliminaire resultaten):***

Voor dit eerste deel van de studie werden serummonsters gebruikt van 63 paardachtigen ouder dan 1 jaar, aangeboden op de universiteitskliniek met uiteenlopende klachten én van 6 paarden verdacht van borreliose (op basis van klinische presentatie, verbetering met antibiotica-therapie, en met aangetoonde seroconversie in de voorgaande maanden). Onder deze 69 dieren bevonden zich 61 paarden van verscheidene rassen, 7 pony's en 1 ezel; de leeftijd varieerde van 1 tot 28 jaar oud; er waren 43 merries, 23 ruïnen en 6 hengsten.

Alle betrokken eigenaren stemden in met participatie in de studie en beantwoordden een korte vragenlijst met betrekking tot weidegang (ja of nee, en zo ja de locatie van de weide), en de



aanwezigheid van symptomen eventueel geassocieerd met borreliose (koorts, depressie, vermageren, onverklaarde kreupelheid of hoefbevangenheid, opthalmologische klachten of abortus), en of teken werden aangetroffen op het paard, dit alles over de voorgaande 12 maanden.

Van elk van de deelnemende dieren werden serumtubes afgenomen en na stolselvorming werd het serum gescheiden door middel van centrifugatie, gepartitioneerd over 3 cryotubes en bewaard bij  $-80^{\circ}\text{C}$  tot het moment van analyse.

Van elk monster werden 2 serologische tests uitgevoerd: immunofluorescentie (Fluo *Borrelia burgdorferi* Horse, Biopronix) en ELISA (Testkit *Borrelia burgdorferi* Veterinär ELISA, Fa. Genzyme Virotech). Van 42 monsters waarvan de IFAT titer de drempelwaarde van  $> 1/64$  overschrijdde werd tevens een Western Blot uitgevoerd (*Borrelia* veterinär plus OspA LINE, IgG Line Immunoblot, Sekisui Virotech GmbH).

De overeenstemming tussen de resultaten verkregen met immunofluorescentie dan wel ELISA wordt weergegeven in Tabel 2 en Figuur 1.

Deze tabel en figuur tonen aan dat er een redelijk goede overeenkomst bestaat tussen beide tests, en dat er slechts 6 monsters zijn die negatief waren bij ELISA ondanks een positief resultaat (titer  $\geq 1/512$ ) bij immunofluorescentie, er is echter geen enkel monster positief bij ELISA met een immunofluorescentie- titer van  $\leq 1/64$ .

De tabellen 3 en 4 tonen de overeenstemming tussen Western Blot enerzijds en respectievelijk immunofluorescentie en ELISA. Als de Western Blot wordt aangenomen als gouden standaard, en uitgaand van een drempelwaarde van een titer van  $\geq 1/512$ , heeft de immunofluorescentie een sensitiviteit van  $\pm 100\%$  en een specificiteit van  $\pm 58\%$ , en de ELISA heeft een sensitiviteit én specificiteit van  $\pm 75\%$ .

Deze resultaten moeten echter zeer voorzichtig geïnterpreteerd worden aangezien ze gebaseerd zijn op deelresultaten van de huidige studie en het aantal observaties klein is, zeker voor wat betreft de monsters die positief zijn bij Western Blot. Daarnaast is het gebruik van de Western Blot als gouden standaard sterk discutabel, sterker nog sommige wetenschappers menen dat er geen gouden standaard bestaat voor het aantonen van borreliose door middel van serologie. Al laatste moet bemerkt worden dat het aantal monsters dat middels ELISA ofwel immunofluorescentie monsters niet gelijk is, en dat voor de validatie van de

immunofluorescentie de sera met een titer van  $\leq 1/64$  werden beschouwd als negatief zonder verdere verificatie, hetgeen mogelijk foutieve resultaten op kan leveren.

Desalniettemin is het interessant op te merken dat op basis van de deelresultaten van de huidige studie, immunofluorescentie (mits de drempelwaarde hoog gesteld wordt) het voordeel van een betere sensitiviteit, ten koste van een mindere specificiteit, lijkt te hebben in vergelijking met de gebruikte ELISA. Volgens de interne validatie door de producent van de ELISA-kit, uitgevoerd bij serummonsters van 351 paarden uit de omgeving van Hannover (Duitsland), zijn sensitiviteit en specificiteit hoger (respectievelijk 100 en 96%) . Hoed dan ook, aangezien de immunofluorescentie een kwalitatieve test is, leent deze zich meer dan ELISA voor het uitvoeren van gepaarde sera.

### **Deel 2 : Seroprevalentie van borreliose bij gezonde dieren zonder symptomen van borreliose, verblijvend in België of Luxemburg (preliminaire resultaten)**

Voor het tweede deel van deze studie werden serummonsters gebruikt van tot op heden (de studie is nog altijd in gang) 69 paardachtigen ouder dan 1 jaar, welke in de voorafgaande 12 maanden niet buiten België of Luxemburg geweest waren, aangeboden op de universiteitskliniek voor problemen die op geen enkele manier in verband gebracht konden worden met borreliose (wonden, koliek, gebruik in reproductie, etc.) ofwel symptoomloze dieren gemonsterd in de ambulatoire praktijk. Onder de gemonsterde dieren bevonden zich 43 merries, 18 ruinen en 8 hengsten; 58 paarden van verscheidene rassen, 8 pony's en 2 ezels, tussen 1 en 28 jaar oud. De meerderheid (58) waren afkomstig uit Wallonie, 6 uit Luxemburg en 5 uit Vlaanderen. Voor elk van deze dieren wordt op eenzelfde wijze als beschreven in voor Deel 1 bloed afgenomen en verwerkt, instemming van de betreffende eigenaren en antwoord op dezelfde vragenlijst verkregen.

Voor elk participierend dier werd een serologische titer voor borreliose bepaald middels dezelfde methode als in Deel 1 (Fluo Borrelia burgdorferi Horse, Biopronix). Op basis van het hierbij verkregen resultaat werden de bij sera van paarden met een titer van  $1/512$  of meer ook een Western Blot uitgevoerd - dezelfde test als in Deel 1 ((Borreliose veterinair plus OspA LINE, IgG Line Immunoblot, Sekisui Virotech GmbH). Tevens werden bij 53 van de 69 dieren in de studie

ook serologisch onderzoek middels een ELISA uitgevoerd ; opnieuw dezelfde testkit als in Deel 1 van de studie (Testkit *Borrelia burgdorferi* Veterinär ELISA, Fa. Genzyme Virotech).

Wanneer wordt uitgegaan van de in Deel 1 gesuggereerde als drempelwaarde een titer van 1/512 bij immunofluorescentie, waren 15 paarden (22 %) seropositief. De lokalisatie van de geteste dieren en het resultaat bij immunofluorescentie is weergegeven in Figuur 2a.

Wat betreft de Western Blot, slechts 3 (4% van het totale aantal gemonsterde dieren) van de geteste monsters waren positief (en 1 intermediair). De lokalisatie van de geteste dieren en het resultaat bij immunofluorescentie is weergegeven in Figuur 2c.

Uitgaande van de ELISA waren 11 (21 %) van de dieren seropositief, en 7 (13 %) hadden een intermediair resultaat. De lokalisatie van de geteste dieren en het resultaat bij ELISA is weergegeven in Figuur 2b.

Nogmaals, zoals gold bij het eerste deel van de studie, moet bij interpretatie van de resultaten rekening gehouden worden met het gegeven dat de studie nog niet afgerond is en het deelresultaten betreft, uitgaande van een beperkt aantal monsters belemmert het trekken van conclusies.

Daarentegen geven de huidige resultaten reeds een indicatie van de seroprevalentie van borreliose (rond de 20% bij immunofluorescentie én ELISA) bij gezonde paarden verblijvend in België of Luxemburg. Dit is bij benadering in overeenstemming met resultaten van studies in andere landen in Noord-Europa maar lager dan de 36 % aangetoond door Moyeart et al in 2006 in gezonde paarden Vlaanderen. Dit is mogelijk een consequentie van het gebruik van een andere ELISA-kit dan in de huidige studie.

Gezien het grote aantal paarden met een positieve serologie in afwezigheid van klinische symptomen alsmede de grote variatie in verkregen resultaten met de serologische testen in gebruik voor de het diagnosticeren van borreliose, is voorzichtigheid geboden bij de interpretatie van testuitslagen. Bij een paard met suggestieve symptomen passend bij borreliose met een intermediaire of positieve serologie (immunofluorescentie of ELISA), is het van instrumentaal belang om de diagnose te bevestigen met een meer specifieke testmethode, dat wil zeggen gepaarde sera, Western Blot of PCR.

### **3. CONCLUSIES**

Concluderend kan gesteld worden dat de diagnose borreliose uitsluitend gesteld kan worden indien aan de volgende 4 voorwaarden wordt voldaan:

1. Het paard verblijft in een risico-regio en is blootgesteld aan de tussengastheer (teek van het type Ixodus)
2. Het paard vertoont klinische symptomen suggestief voor de ziekte van Lyme
3. Serologie is positief of intermediair
4. De positieve of intermediaire serologie is bevestigd door een of meerdere aanvullende testes (gepaarde sera en/of Western Blot en/of PCR)

Indien, en uitsluitend indien, de diagnose is gesteld, is het raadzaam spoedig een specifieke antibiotica-therapie aan te vangen.

#### **4. BIBLIOGRAPHIE**

**Blanc F.** Epidemiology of Lyme borreliosis and neuroborreliosis in France. Rev Neurol (Paris) 2009 ;165:694-701

**Butler CM, Houwers DJ, Jongejan F, van der Kolk JH.** *Borrelia burgdorferi* infections with special reference to horses. A review. [Vet. Q.](#) 2005;27:146-56

**Chang YF, Novosol V, McDonough SP, Chang CF, Jacobson RH, Divers TJ, Quimby FW, Shin S, Lein DH.** Experimental Infection of Ponies with *Borrelia burgdorferi* by Exposure to Ixodid Ticks. Vet. Pathol. 2000;37:68-76.

**Chang YF, Ku YW, Chang CF, Chang CD, McDonough SP, Divers TJ, Pough M, Torres A.** Antibiotic treatment of experimentally *Borrelia burgdorferi*-infected ponies. Vet. Microbiol. 2005;107:285–294

**Divers TJ, Grice AL, Mohammed HO, Glaser AL, Wagner B.** Changes in *Borrelia burgdorferi* ELISA antibody over time in both antibiotic treated and untreated horses. Acta Vet. Hungarica 2012;60:421–9.

**Dzierzecka M, Kita J.** The use of chosen serological diagnostic methods in Lyme disease in horses. Part II. Western blot. Polish J. Vet. Sc. 2002, 5, 79-89.

**Fritz CL, Kjemtrup AM.** Lyme borreliosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2003;223:1261-70.

**Johnson AL, Divers TJ, Chang YF.** Validation of an in-clinic enzyme-linked Immunosorbent Assay kit for diagnosis of *Borrelia burgdorferi* Infection in Horses. *J. Vet. Diagnostic Investigation* 2008;20:321-324.

**Kesteman T, Rossi C, Bastien P, Brouillard J, Avesani V, Olive N, Martin P, Delmée M.** Prevalence and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Ixodes ticks in Belgium. *Acta Clin Belg.* 2010 ;65:319-22.

**Leblond A, Pradier S, Pitel PH, Fortier G, Boireau P, Chadoeuf J, Sabatier P.** An epidemiological survey of equine anaplasmosis (*Anaplasma phagocytophilum*) in southern France. *Rev Sci Tech.* 2005;24:899-908.

**Reed SM, Toribio R.** Lyme disease in horses. . In: *Equine Internal Medicine* (second edition), Reed, S.M., Bayly, W.M., Sellon D.C. (Eds), W.B. Saunders Cie, Philadelphia, 2004:656-657.

**Rizzoli A, Hauffe H, Carpi G, Vourc H G, Neteler M, Rosa R.** Lyme borreliosis in Europe. *Euro Surveill.* 2011;16:19906.

**Wagner B, Freer H, Rollins A, Erb H.N., Lu Z, Grohn Y.** Development of a multiplex assay for the detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in horses and its validation using Bayesian and conventional statistical methods. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2011;144**:374-81.

**Wagner B, Goodman LB, Rollins A, Freer HS.** Antibodies to OspC, OspF and C6 antigens as indicators for infection with *Borrelia burgdorferi* in horses. *Equine Vet J.* 2013 ;45:533-7

**Tabel 1** Seroprevalentie tegen *Borrelia burgdorferi* bij het paard in Europa voor zover beschreven in de literatuur

Land	Regio	Referentie	Aantal paarden	Gebruikte test	Seroprevalentie
Duitsland	Berlin	Käsbohrer et Schönberg <a href="#">Berl Munch Tierarztl Wochenschr.</a> 1990;103:374-8	224	IFAT ELISA	0 % 16.1 %
UK	Meerdere regio's	Carter et al. <i>Equine Vet J.</i> 1994;26:187-90	Niet beschikbaar	ELISA WB	Laag (3 à 35 % afhankelijk van regio)
Zweden	Meerdere regio's	Egenvall et al. <i>Preventive Vet. Med.</i> 2001;49:191-208	2.018 waarvan 400 klinisch gezond	IFAT	Gezond: 16.5 % Totaal : 16.8 %
Oostenrijk	Meerdere regio's	Muller et al. <a href="#">Int J Med Microbiol.</a> 2002;291(Suppl 33):80-7	309	WB	52 à 93 % (afhankelijk van diersoort)
Belgie	Vlaanderen	Moyaert et al. <i>Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift</i> 2006;75:436-8	100	ELISA	36 %
Frankrijk	Centrum-west Noord Zuid	Maurizi et al. <a href="#">Vector Borne Zoonotic Dis.</a> 2010;10:535-7	144 159 105	ELISA (SNAP 4DX)	31 % 48 % 12 %
Polen	Meerdere regio's	Stefanciková et al. <a href="#">Ann Agric Environ Med.</a> 2008;15:37-43	395 25	ELISA WB	25.6 % 60.0 %
Denemarken	Meerdere regio's	Hansen et al. <i>Acta Vet Scand.</i> 2010 ;52:3	390	ELISA (SNAP 4DX)	29.0 %
Roemenie	Meerdere regio's	Kiss et al. <a href="#">Vector Borne Zoonotic Dis.</a> 2011;11:1259-62	260	IFAT	11.9 %
Italie	Centraal	Ebani et al. <a href="#">Ann Agric Environ Med.</a> 2012;19:237-40	386	IFAT	24.3%*1
	Centraal	Laus et al. <i>J Vet Med Sci.</i> 2013;75:715-20	300	IFAT	7.0 %

**Tabel 2.** Vergelijking van serologische resultaten voor borreliose verkregen met immunofluorescentie en met ELISA bij 69 dieren met gevarieerde symptomatologie.

		ELISA			
		Negatief	Intermediair	Positief	TOTAAL
IF	1/64	20	1	0	<b>21</b>
	1/128	6	1	1	<b>8</b>
	1/256	14	3	2	<b>19</b>
	1/512	6	3	9	<b>18</b>
	1/1024	0	1	2	<b>3</b>
	<b>TOTAAL</b>	<b>46</b>	<b>9</b>	<b>14</b>	<b>69</b>

IF = Immunofluorescence

**Tabel 3.** Vergelijking van serologische resultaten voor borreliose verkregen met immunofluorescentie en Western Blot bij 66 dieren met gevarieerde symptomatologie.

		WB			
		Negatief	Intermediair	Positief	TOTAAL
IF	≤ 1/64	21*	-	-	<b>21</b>
	1/128	8	0	0	<b>8</b>
	1/256	13	3	0	<b>16</b>
	1/512	13	3	2	<b>18</b>
	1/1024 ou +	1	0	2	<b>3</b>
	<b>TOTAAL</b>	<b>56</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>66</b>

IF = Immunofluorescentie ; WB = Western Blot ; - = niet getest

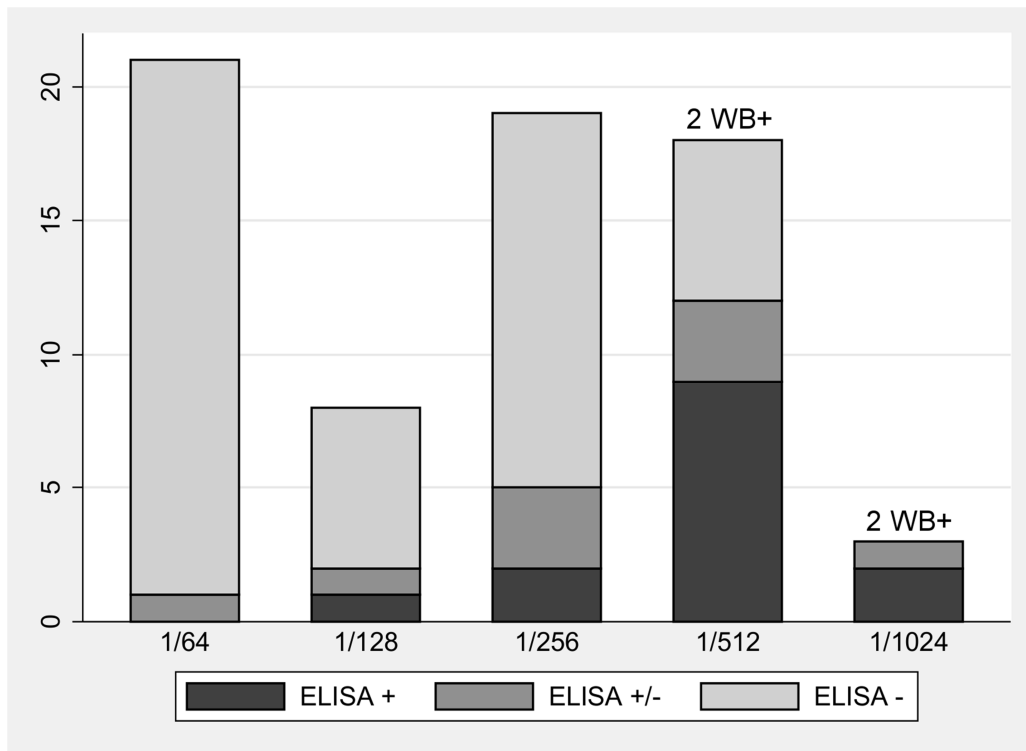
\* De 21 sera met titer ≤ 1/64 werden niet getest middels WB; gezien de zeer lage titer werden deze als negatief beschouwd

**Tabel 4.** Vergelijking van serologische resultaten voor borreliose verkregen met ELISA en met Western Blot bij 45 dieren met gevarieerde symptomatologie.

		WB			
		Negatief	Intermediair	Positief	TOTAAL
ELISA	Negatief	21	1	1	<b>23</b>
	Intermediair	7	1	0	<b>8</b>
	Positief	7	4	3	<b>14</b>
	<b>TOTAAL</b>	<b>35</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>45</b>

WB = Western Blot

**Figuur 1.** Van de 69 sera genomen bij paarden aangeboden op de universiteitskliniek met gevarieerde symptomatologie, aantal monsters met een borreliose tite bij immunofluorescentie van respectievelijk 1/64, 1/128, 1/512 en 1/1024 en tevens, voor ieder van die categorieën, het aantal sera met een positief, intermediair respectievelijk negatief resultaat bij ELISA. Bovendien is waar van toepassing het aantal monsters positief bij Western Blot aangegeven.





**Figuur 2.** Geographische verdeling van de herkomst van de paardachtigen die gebruikt zijn in de studie naar de seroprevalentie van borreliose bij gezonde dieren in België en Luxemburg door middel van immunofluorescentie (IFAT) met een drempelwaarde van 1/512 (A), ELISA (B), en Western Blot (C) .

