

## Laboratoriumdiagnostiek van Lyme-borreliose

J.A.A. HOOGKAMP-KORSTANJE

Bij Lyme-borreliose kennen wij diverse klinische stadia.<sup>1</sup> In de acute fase, ongeveer 1 tot 2 weken na de tekenbeet, zien wij voornamelijk dermatologische afwijkingen in de vorm van erythema chronicum migrans en lymphadenosis cutis benigna. In die periode zijn ook systemische verschijnselen waar te nemen. Patiënten klagen vaak over hoofdpijn, algemeen onwelbevinden, rugpijn en spierpijn, kortom, zij voelen zich 'griepig'. In de tweede, intermediaire fase, 4 tot 9 weken na de infectie, staan neurologische en cardiovasculaire klachten,<sup>2</sup> en myositis op de voorgrond. Zoals bekend, ontstaat bij lang niet alle patiënten na de acute fase een intermediaire fase, maar het exacte percentage kennen wij niet. Het is wel duidelijk dat neurologische aandoeningen vaker in Europa voorkomen dan in Amerika. Na de intermediaire fase kan na maanden tot jaren een chronische fase ontstaan. Hierbij staan op de voorgrond artritisklachten, lage rugpijn, dermatologische aandoeningen, waaronder acrodermatitis chronica atrophicans,<sup>3</sup> en chronische neurologische klachten, vooral van centrale aard.

### DIAGNOSTIEK: 2-TESTPROTOCOL

Voor de diagnostiek van Lyme-borreliose zijn onlangs door de Centres for Disease Control (CDC) richtlijnen uitgevaardigd die een zogenaamd 2-testprotocol voorstaan.<sup>4</sup> Overal ter wereld tobt men met de problematiek van de inadequate serologische uitslagen, die enerzijds geen uitsluitel geven over de klinische beelden die wij mogelijk in verband moeten brengen met Lyme-borreliose en die anderzijds *Borrelia* ten onrechte aan klinische beelden koppelen die niets met een infectie door de Lyme-spirocheet te maken hebben. Wanneer men de literatuur daarop doorleest, zijn er wel 40 neurologische beelden die ooit in verband zijn gebracht met Lyme-borreliose.

Bij het 2-testprotocol moet men gebruikmaken van 2 verschillende methoden voor diagnostiek, waarbij de tests complementair aan elkaar zijn. Bij een positieve uitslag van beide tests mag men dan de diagnose 'Lyme-borreliose' stellen, ook al voldoet de kliniek niet aan de eerder door de CDC gestelde criteria.

### KWEEK

Bij de diagnostiek van Lyme-borreliose kunnen wij diverse methoden gebruiken. De eerste en beste methode

### SAMENVATTING

- Bij Lyme-borreliose worden onderscheiden: een acute fase (met dermatologische en systemische verschijnselen), een intermediaire fase (met neurologische en cardiovasculaire klachten en myositis) en een chronische fase (met artritis, lage rugpijn, dermatologische en neurologische klachten).
- Als er geen acute fase met erythema chronicum migrans is waargenomen, moet vooral de laboratoriumdiagnostiek de doorslag geven. Het zogenaamde 2-testprotocol houdt in dat tenminste twee verschillende laboratoriumtests positief moeten zijn om de diagnose met zekerheid te stellen.
- Omdat kweek moeilijk is, wordt meestal een serologische bepaling aangevraagd (voor het aantonen van specifieke IgM- en IgG-antistoffen tegen diverse antigenen van de spirocheet).
- Kruisreacties, antigenic variaties en verschillen in antigeenexpressie bij Amerikaanse en Europese *Borrelia*-stammen kunnen leiden tot fout-negatieve en fout-positieve testuitslagen bij de huidige tests. Bovendien interfereert antibioticumgebruik met de productie van specifieke antistoffen en correleert het effect van therapie niet met de hoogte en het verloop van titers.
- Aanvullende diagnostiek met immunoblottechnieken, waarbij specifieke antistofpatronen worden aangetoond, kan van voordeel zijn.
- Een alternatief is de detectie van specifieke antigenen in weefsels, een methode die nog onderontwikkeld is.

is het aantonen van de bacterie met een kweek. Het is mogelijk om in alle stadia van de ziekte uit getroffen weefsel de Lyme-spirocheet te kweken. Dit is echter moeilijk en tijdrovend en het wordt slechts op enkele plaatsen in Nederland routinematig uitgevoerd. Om die reden neemt men vaak zijn toevlucht tot serologische bepalingen.

### ANTISTOFFEN

Bij infectie met de Lyme-spirocheet zien wij in een vroeg stadium een T-celrespons en in een wat later stadium een specifieke antistofrespons. Als eerste verschijnt specifiek IgM in de circulatie, maar niet eerder dan ongeveer 6 weken na de infectie; vervolgens is er specifiek IgG, dat men niet mag verwachten vóór de 6e tot 8e week. Dat betekent dat een patiënt een betekenisvolle titer pas ongeveer 2 maanden na de infectie opbouwt. De antistoftiter kan met een ELISA of een immunofluorescentietest worden bepaald.

De Lyme-spirocheet is een bijzonder ingewikkeld gebouwd micro-organisme. De specifieke antistofrespons is de resultante van diverse antistoffen tegen diverse bacteriële antigenen en een complicerende factor daarbij is dat niet tegen alle antigenen in dezelfde fase van de ziekte antistoffen worden gemaakt. Wij kennen vroege

Academisch Ziekenhuis St.-Radboud, afd. Medische Microbiologie, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.  
Mw.prof.dr.J.A.A.Hoogkamp-Korstanje, medisch microbioloog.

en late antistoffen. Een voorbeeld van een vroege antistof is die tegen het proteïne met een molecuulmassa van 41 kD, dat is het flagellaire antigeen. Bij de serologische tests brengt men serum van patiënten in contact met antigeencomplexen van de spirocheet, waarna men kijkt of er antistoffen aan die complexen zijn blijven kleven, een teken van een specifieke antigeen-antilichaamreactie. Tot op de dag van vandaag maakt men daarbij vaak gebruik van antigeencomplexen, uitgaande van een antigeenmengsel bereid uit hele spirochetes. Enkele commerciële testkits maken echter gebruik van monospecifieke antigenen, in casu het 41-kD-flagelline. De stam die voor bereiding van de antigene suspensies wordt gebruikt, is in het algemeen de Amerikaanse referentiestam, de stam die ooit door Willy Burgdorfer zelf is beschreven. In theorie is deze stam voor serologische bepalingen in Europa minder geschikt nu bekend is dat binnen de species *Borrelia burgdorferi* een aantal subspecies te herkennen is, die qua structuur verschillen (*B. burgdorferi* 'sensu stricto', *B. garinii* en *B. afzelii*). In Europa komen *B. afzelii* en *B. garinii* veel vaker voor dan *B. burgdorferi* 'sensu stricto', de stam die het meeste lijkt op de originele Amerikaanse *B. burgdorferi*-'sensu lato'-stam. Het verschil in epidemiologie en het verschil in klinische presentatie van verschillende patiënten met Lyme-borreliose is mogelijk terug te voeren op verschil in vóórkomen van deze subspecies in Amerika en Europa. *B. garinii* wordt vooral in verband gebracht met neurologische afwijkingen, *B. afzelii* juist met huidafwijkingen, zoals erythema chronicum migrans en acrodermatitis chronica atrophicans.<sup>5</sup> Men kan zich voorstellen dat vanwege het verschil in antigene samenstelling van Europese stammen ook de serologische reactie van patiënten niet optimaal is als de Amerikaanse stam bij de test wordt gebruikt.

Naast het flagellaire antigeen zijn er ook diverse antigenen buitenmembraaneiwwitten die immunodominant zijn (daartegen maken de meeste patiënten antistoffen). De bekendste daarvan zijn Osp A, Osp B en Osp C. Ze komen in wisselende mate voor bij de diverse *Borrelia*-stammen. Van Osp A kennen wij nog diverse serotypen. Osp C is een antigeen dat veel voorkomt binnen het genus *Borrelia*, maar niet karakteristiek is voor *B. burgdorferi*. Antistoffen tegen Osp C zijn eveneens 'vroege antistoffen'. De antistoffen tegen Osp A en Osp B zijn bactericide (in vitro) en bij diermodellen is het mogelijk immuniteit op te wekken door te immuniseren met deze buitenmembraaneiwwitten. Bij de mens is dit effect echter veel minder duidelijk.

Diverse andere membraaneiwwitten kunnen aangewezen worden als immunogenen waartegen specifieke antistoffen bij sommige patiënten kunnen worden gevonden. Bij de late Lyme-borreliose ziet men vaak antistoffen tegen eiwwitten met een molecuulmassa van 85 tot 97 kD circuleren. Mogelijk zijn deze antigenen fragmenten van het P100, een membraangebonden eiwit. Meer dan 10 hittelabiele eiwwitten ('heat shock proteins') zijn aangetoond bij *Borrelia*. Ook tegen deze antigenen kunnen antistoffen worden aangetroffen, vooral bij patiënten met Lyme-artritis.

*Antigene variatie.* Problematisch is dat vele van de antigenen kruisreageren met antigenen van andere min of meer verwante bacteriën. Daarnaast blijkt de expressie van diverse eiwwitten te variëren. Deze antigene variatie is er de oorzaak van dat men variabele antistoftiters kan vinden bij diverse soorten patiënten en vaak incomplete antistofpatronen aantreft. Deze antigene variatie (ook wel 'antigeenswitch' genoemd) is bekend voor *Borrelia*-soorten.

Ook in het laboratorium kan men na passage in proefdieren expressie van andere antigenen waarnemen. Hierdoor maakt *Borrelia* zich immunologisch onherkenbaar in zijn gastheer.<sup>6</sup> Antistoffen gevormd tegen antigenen die eerst tot expressie kwamen in vivo, herkennen veranderde, later door de spirocheet tot expressie gebrachte antigenen niet. Dit kan leiden tot persistentie van het micro-organisme. Eerstgevormde nog circulerende antistoffen zijn dan ineffectief en niet beschermend meer. Ondanks de aanwezigheid van hoge titers circulerende antistoffen wordt *B. burgdorferi* bij de patiënt dan niet gedood.

Een complicatie daarbij is nog de meestal intracellulaire lokalisatie van *B. burgdorferi*, die maakt dat de bacteriën ook vrijwel ontoegankelijk zijn voor circulerende antistoffen. Het is zelfs zo dat patiënten met circulerende antistoffen een tweede infectie met *B. burgdorferi* kunnen oplopen.

De antistofproductie wordt ernstig belemmerd wanneer een acute infectie met antibiotica wordt behandeld gedurende de periode dat de antistofproductie nog nauwelijks op gang is, dus vóór de 4e week. De spirochetes zijn dan verdwenen voordat het immuunsysteem goed heeft kunnen reageren. Wanneer erythema chronicum migrans met antibiotica wordt behandeld, blijven de antistoffen vaak achterwege of wordt de titer niet hoger dan de 'achtergrondruis' die wij in de bevolking aantreffen.<sup>7</sup> In de vroege tweede fase ziet men vooral antistoffen tegen het 41-kD-eiwit verschijnen. In het algemeen kan men gedurende de intermediaire en de chronische fase antistoffen van alle subklassen aantonen. Het is niet zo dat antistoffen van de IgM-klasse verdwijnen wanneer specifieke IgG-antistoffen gaan circuleren. Het aantonen van beide soorten antistoffen zegt in het algemeen niets over het stadium waarin de ziekte zich bevindt.

De gefaseerde aanmaak van antistoffen en de complexiteit van de diverse antistoffen geven veel problemen bij de interpretatie van de uitslagen van serologische tests. Een daling van antistoffen tegen het ene antigeen kan gepaard gaan met een stijging van antistoffen tegen het andere, resulterend in een moeilijk interpreteerbare titer met een mengsel van antistoffen. In het kort geven circulerende antistoffen nauwelijks informatie over het stadium van de ziekte en zijn ze niet maatgevend voor het effect van therapie.

Diverse serologische technieken zijn in gebruik bij de bepaling van antistoffen tegen *Borrelia*, maar de gebruikte antigenen bepalen in grote mate de sensitiviteit en de specificiteit van de tests. Wanneer men als antigeen het 41-kD-eiwit flagelline gebruikt, zal de test in

het algemeen zeer gevoelig zijn in de vroege stadia en minder gevoelig in de latere stadia van borreliose. De specificiteit van de test is niet erg hoog, omdat diverse kruisreagerende antistoffen tegen verwante flagellinen, afkomstig van onze commensale flora, interfereren in de test. Deze test zal dus zeker met de nodige reserves moeten worden gebruikt.

Wanneer men gebruikmaakt van een mengsel van antigenen, zal de sensitiviteit in het algemeen hoger zijn dan bij gebruik van een monospecifiek antigeen, maar de specificiteit zal navenant lager zijn, omdat kruisreacties en 'achtergrondruis' meespelen. Er zijn *Borrelia*-tests in gebruik die 25% fout-positief en fout-negatief aangeven.

Daarbij is ook het gebruik van de Amerikaanse stam een punt van discussie. Diverse onderzoekers zijn van mening dat men in Europa eigenlijk de Europese stammen zou moeten gebruiken, omdat de expressie van antigenen bij de Europese stammen verschilt van die bij Amerikaanse stammen en dus ook de productie van specifieke antistoffen anders zal zijn. Daarom zijn immunoblottechnieken ontwikkeld waarbij men complete antistofpatronen tegen diverse antigenen meet.<sup>8</sup> Deze technieken zijn evenwel tijdrovend en te ingewikkeld als routinebepaling. ELISA-technieken met gezuiverde antigenen van Europese stammen zouden daarvoor een oplossing zijn.

Bij de interpretatie van uitslagen moet men weten welke tests dan wel antigenen zijn gebruikt om een juiste conclusie te kunnen trekken. Het is belangrijk te weten dat ongeveer 5% van de gezonde donorpopulatie in Nederland serologisch positief is in de routineserologie ('achtergrondruis'). Een positieve test moet derhalve wel passen bij een klinisch beeld wil men tot de conclusie komen dat de klachten verband houden met Lyme-ziekte.

#### ANTIGEENDETECTIE

Histologische kleuring van patiëntenmateriaal is een alternatief om de *Borrelia*-spirocheet zichtbaar te maken.<sup>9</sup> De beperking van deze methode is, dat ze niet specifiek is, omdat men wel kan vermoeden te maken te hebben met *Borrelia*, maar het definitieve bewijs daarvan met een kleuring niet kan leveren. Dit kan men wel met een immunologische antigeendetectiereactie op klinisch materiaal.

Te weinig wordt gebruikgemaakt van deze techniek bij de diagnostiek van *B. burgdorferi*. Wanneer het mogelijk is om uit elk klinisch materiaal, mits goed afgenomen, *Borrelia* te kweken, is het ook mogelijk om in hetzelfde materiaal antigenen met specifieke antistoffen immunologisch aan te tonen.<sup>10</sup> Deze techniek is onderontwikkeld, maar biedt een perspectief dat diagnostisch beter is dan de serologie op dit moment. Het is een alternatief voor de polymerasekettingreactie die in sommige laboratoria toegepast wordt. Die is arbeidsintensief, contaminatiegevoelig en duur; de immunologische antigeendetectie is zeker zo gevoelig en ook specifiek, mits goed uitgevoerd; bovendien is ze eenvoudig toepasbaar in het routineonderzoek.

#### CONCLUSIE

De laboratoriumdiagnostiek van Lyme-borreliose blijft lastig. Slechts zelden zal men een positief isolaat van de spirocheet kunnen verkrijgen, meestal is men aangewezen op serologische bepalingen. Het huidige routineonderzoek moet echter met de nodige reserve worden beoordeeld: een positieve test hoeft niet op Lyme-ziekte te duiden, een negatieve test sluit deze niet uit. Er zijn, ook in Nederland, laboratoria die specifiekere serologische bepalingen verrichten, waaronder immunoblottests. De antigeendetectietest is ondergewaardeerd en kan een waardevolle aanvulling op de klinische diagnostiek betekenen.

---

#### ABSTRACT

##### *Laboratory methods for diagnosis of Lyme borreliosis*

- Three stages can be observed in Lyme borreliosis: the acute stage (with dermal and systemic disease), an intermediate stage (with neurological and cardiovascular complaints and myositis), and a chronic stage (with arthritis, low back pain, dermatological and neurological complaints).
- If no acute stage with erythema chronicum migrans is seen, laboratory tests must provide the diagnosis. In the so-called two-test protocol at least two different tests must be positive for a definite diagnosis.
- Because culture is difficult, serology (demonstration of specific IgM and IgG antibodies against spirochaetal antigens) is the preferred technique.
- Cross reactions, antigenic variations and differences in antigenic expression in American and European strains may cause false-negative and false-positive results with the current tests. Moreover, previous use of antibiotics can interfere with the production of specific antibodies, and the effect of therapy is not correlated with height and behaviour of antibody titres.
- Additional investigation with immunoblot techniques, demonstrating specific antibody patterns may be valuable.
- An interesting alternative, not yet fully developed, is detection of specific antigens in tissues.

---

#### LITERATUUR

- <sup>1</sup> Stanek G, O'Connell S, Cimmino M, Aberer E, Kristoferitsch W, Granstrom M, et al. European Union concerted action on risk assessment in Lyme borreliosis: clinical case definitions for Lyme borreliosis. *Wien Klin Wochenschr* 1996;108:741-7.
- <sup>2</sup> Koning J de, Hoogkamp-Korstanje JAA, Koster HG, Elema JD. Fatal infection with *Borrelia burgdorferi* by involvement of the cardiac conducting system. *Int J Angiol* 1994;3:203-6.
- <sup>3</sup> Tazelaar DJ, Velders AJ, Koning J de, Hoogkamp-Korstanje JAA. Acrodermatitis chronica atrophicans; een bedrieglijke vorm van Lyme-borreliosis. *Ned Tijdschr Geneesk* 1991;135:1358-63.
- <sup>4</sup> Johnson BJB, Robbins KE, Bailey RE, Cao BL, Sviat SL, Craven RB, et al. Serodiagnosis of Lyme disease: accuracy of a two-step approach using a flagella-based ELISA and immunoblotting. *J Infect Dis* 1996;174:346-53.
- <sup>5</sup> Dam AP van, Kuiper H, Vos K, Widjojokusumo A, Jongh BM de, Spanjaard L, et al. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis* 1993;17:708-17.
- <sup>6</sup> Coleman JL, Rogers RC, Rosa PA, Benach JL. Variations in the ospB gene of *Borrelia burgdorferi* result in differences in monoclonal antibody reactivity and in production of escape variants. *Infect Immun* 1994;62:303-7.
- <sup>7</sup> Hammers-Berggren S, Lebech AM, Karlsson M, Svenungsson B, Hansen K, Stiernstedt G. Serological follow-up after treatment of patients with erythema migrans and neuroborreliosis. *J Clin Microbiol* 1994;32:1519-25.

- <sup>8</sup> Hauser U, Lehnert G, Lobentanzer R, Wilske B. Interpretation criteria for standardized Western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *J Clin Microbiol* 1997;35:1433-44.
- <sup>9</sup> Koning J de, Hoogkamp-Korstanje JAA, Linde MR van der, Crijns HJGM. Demonstration of spirochetes in cardiac biopsies of patients with Lyme disease. *J Infect Dis* 1989;160:150-3.

- <sup>10</sup> Bruyn GAW, Koning J de, Reijsoo FJ, Houtman PM, Hoogkamp-Korstanje JAA. Lyme pericarditis leading to tamponade. *Br J Rheumatol* 1994;33:862-6.

Aanvaard op 26 september 1997

## Oorspronkelijke stukken

# Verwijzing van patiënten met een polyneuropathie door de huisarts: geen invloed van de leeftijd, maar wel van de aard van de klachten

G.W.VAN DIJK, N.C.NOTERMANS, Y.VAN DER GRAAF, R.C.J.M.DONDERS, M.HOL EN J.H.J.WOKKE

Polyneuropathie is een veel voorkomende aandoening in de dagelijkse neurologische praktijk.<sup>1</sup> Gegevens over de prevalentie van polyneuropathie zijn schaars.<sup>2</sup> Er is slechts weinig onderzoek gedaan in ongeselecteerde populaties buiten het ziekenhuis. Uit Italiaans onderzoek onder ruim 4000 patiënten van 55 jaar en ouder die de huisarts om verschillende redenen bezochten, bleek de prevalentie van polyneuropathie 3,5% te zijn;<sup>3</sup> de prevalentie nam toe met de leeftijd en diabetes mellitus was bij 44% van de patiënten de oorzaak.

Onderzoek naar de oorzaken van polyneuropathie vindt voornamelijk plaats in het ziekenhuis. Om de verkregen onderzoeksgegevens te kunnen extrapoleren naar de gehele bevolking is het van belang om te weten of in de neurologische praktijk de onderzochte populatie van patiënten met polyneuropathie een getrouwe afspiegeling vormt van de populatie polyneuropathiepatiënten in de algehele bevolking of dat er sprake is van selectie. Hierbij moet opgemerkt worden dat de meeste patiënten met een diabetische polyneuropathie niet in de neurologische praktijk worden gezien, maar door de huisarts worden behandeld of door de internist.<sup>4</sup> Verder worden in het ziekenhuis veel polyneuropathiepatiënten gezien in het kader van een intercollegiaal consult. Dit zijn dan vaak patiënten met een polyneuropathie als gevolg van een medische behandeling (bijvoorbeeld chemotherapie) of als gevolg van een reeds langer bestaande ziekte (bijvoorbeeld een bindweefselziekte of een maligniteit).<sup>5</sup> Een belangrijk aantal patiënten met een polyneuropathie wordt echter verwezen door de huisarts, zodat al in de eerste lijn een selectie van patiënten kan optreden.

Wij onderzochten of verwijzing door de eerste lijn van patiënten met polyneuropathie selectief plaatsvindt. Voor het inzicht in de samenstelling van de populatie polyneuropathiepatiënten in de neurologische praktijk

Zie ook de artikelen op bl. 2321 en 2327.

## SAMENVATTING

*Doel.* Onderzoeken of huisartsen patiënten met een polyneuropathie selectief verwijzen op grond van de leeftijd of de aard van de klachten.

*Opzet.* Schriftelijke vragen aan huisartsen bij een papieren polyneuropathiecasus.

*Plaats.* Academisch Ziekenhuis Utrecht.

*Methode.* Aan 1590 huisartsen werd gevraagd naar de differentiële diagnose en het beleid bij een papieren ziektegeschiedenis van een patiënt met een polyneuropathie. Er waren 6 ziektegeschiedenissen die van elkaar verschilden door de leeftijd van de patiënt (53, 64 en 73 jaar) en de aard van de klachten (alleen gevoelsstoornissen of gevoelsstoornissen en spierzwakte). De huisartsen werden verdeeld in 6 groepen met gelijke demografische kenmerken en aard van de praktijkvoering. Om de aandacht van de polyneuropathiecasus af te leiden, kreeg iedere huisarts bovendien 3 andere ziektegeschiedenissen onder ogen (amaurosis fugax, radiculair syndroom en een vasovagale collaps).

*Resultaten.* De gemiddelde respons van de 6 onderzoeksgroepen was 54% (n = 844). De diagnose 'polyneuropathie' werd voor alle 6 ziektegeschiedenissen het waarschijnlijkst geacht (variantieanalyse; p < 0,0001). De leeftijd van de patiënt was niet van invloed op de diagnose en ook niet op de beslissing al dan niet te verwijzen. Tenminste 73% van de onderzochte huisartsen verwees patiënten met een sensorische polyneuropathie naar een neuroloog voor nader onderzoek, tenminste 81% die met een sensorimotorische polyneuropathie ( $\chi^2$ -toets; p < 0,05).

*Conclusie.* Tenminste 73% van de onderzochte huisartsen verwees patiënten met een polyneuropathie naar een neuroloog; patiënten met spierzwakte werden vaker verwezen dan patiënten met alleen gevoelsstoornissen. Bij het verwijzen werd niet geselecteerd op leeftijd.

is het van belang om te weten of oudere patiënten even vaak worden verwezen als jongere en of patiënten met een milde polyneuropathie een even grote kans hebben om verwezen te worden als patiënten met een ernstiger ziekte. De hypothesen van dit onderzoek luiden: (a) jonge patiënten hebben een grotere kans om verwezen te worden dan oudere, en (b) patiënten met een milde

Academisch Ziekenhuis, Postbus 85.500, 3508 GA Utrecht.  
Afd. Neurologie: G.W.van Dijk en R.C.J.M.Donders, assistent-geneeskundigen; mw.dr.N.C.Notermans en prof.dr.J.H.J.Wokke, neurologen; M.Hol, co-assistent.  
Julius Centrum voor Patiënt Gebonden Onderzoek, afd. Epidemiologie: mw.dr.Y.van der Graaf, arts-epidemioloog.  
Correspondentieadres: G.W.van Dijk.