

Screening op *Borrelia*-specifieke serumantistoffen

Alternatieven voor de C6 Lyme ELISA

Dieneke Hoeve-Bakker, Tamara van Gorkom

Samenvatting

De detectie van *Borrelia*-specifieke antistoffen speelt een belangrijke rol in de diagnostiek van Lyme borreliose (LB). Door de nieuwe Europese richtlijn voor in vitro diagnostiek (EU) 2017/746 zijn twee van de in Nederland meest gebruikte antistoffen (de C6 Lyme ELISA en de Enzygnost ELISA) van de markt verdwenen. Veel laboratoria waren daarom genoodzaakt hun testrepertoire aan te passen. Dit artikel beschrijft de validatie van negen antistoffen voor de diagnostiek van LB, die onder andere zijn gekozen op basis van de verwachte beschikbaarheid met CE-markering.

De sensitiviteit van de geëvalueerde antistoffen (IgG- en IgM-resultaten gecombineerd) onder 74 LB-patiënten varieerde afhankelijk van de Lyme-manifestatie en was lager onder patiënten met vroege LB ($n = 11$; 54,5-90,9 procent) dan onder patiënten met gedissemineerde LB ($n = 63$; 97,1-100 procent). De specificiteit onder 74 gezonde, leeftijd- en geslacht-gematchte individuen varieerde van 70,3 tot 91,9 procent, en van 34,5 tot 77,1 procent onder 48 patiënten met mogelijk kruisreactieve aandoeningen. De IgM-resultaten waren heterogener dan de IgG-resultaten en droegen niet bij aan de algehele (IgM+IgG) sensitiviteit. Het percentage positieve IgM resultaten in de controlegroepen was echter substantieel.

Concluderend presteerden de antistoffen voor de diagnostiek van LB vergelijkbaar, met name onder patiënten met gedissemineerde LB. Het testen van IgM droeg in deze studie niet bij aan de diagnostiek van LB.

Abstract

The detection of *Borrelia*-specific antibodies plays an important role in the diagnosis of Lyme borreliosis (LB). Due to the new European directive for in vitro diagnostics (EU) 2017/746, the production of two of the

most commonly used antibody assays in the Netherlands (the C6 Lyme ELISA and the Enzygnost ELISA) has been discontinued. Consequently, laboratories using these assays were forced to implement a new assay. This article describes the validation of nine antibody assays for LB diagnosis, selected based on expected continued availability with CE marking.

The sensitivity of the evaluated assays (IgG and IgM results combined) among 74 LB patients varied depending on the Lyme manifestation and was lower among patients with early LB ($n = 11$; 54.5-90.9 percent) than among patients with disseminated LB ($n = 63$; 97.1-100 percent). The specificity among 74 healthy, age- and sex-matched individuals ranged from 70.3 to 91.9 percent, and from 34.5 to 77.1 percent among 48 patients with potentially cross-reactive conditions. The IgM results were more heterogeneous than those of IgG and did not contribute to the overall (IgM+IgG) sensitivity; however, among controls the IgM-positivity rate was substantial.

Overall, the antibody assays for LB diagnostics performed comparably, especially among patients with disseminated LB. IgM testing had no added value for the diagnosis of LB.

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Centrum voor Infectieziektebestrijding, Bilthoven en Diaconessenhuis, Utrecht, afdeling Medische Microbiologie en Immunologie; drs. B.J.A. Hoeve-Bakker, PhD-student, dr. T. van Gorkom, postdoctoraal onderzoeker. Correspondentieadres: drs. B.J.A. Hoeve-Bakker, e-mail Dieneke.Hoeve@rivm.nl.

Dit artikel is een bewerking van Hoeve-Bakker BJA, Jonker M, Brandenburg AH et al. The Performance of Nine Commercial Serological Screening Assays for the Diagnosis of Lyme Borreliosis: a Multicenter Modified Two-Gate Design Study. Microbiol Spectr. 2022;10, e0051022.

Inleiding

Lyme borreliose (LB) wordt veroorzaakt door spirocheten behorend tot het *Borrelia burgdorferi* sensu lato-complex, die worden overgedragen door geïnfecteerde *Ixodes*-teken. In Nederland worden jaarlijks 1,5 miljoen tekenbeten gerapporteerd, wat resulteert in ongeveer 27.000 LB-gevallen [1] en substantiële ziektelast [2].

De diagnose LB is gebaseerd op klinische symptomen ondersteund met laboratoriumdiagnostiek. Uitzondering hierop is erythema migrans (EM), waarvoor diagnose op basis van uitsluitend klinische symptomen volstaat. De sensitiviteit van directe detectiemethoden (kweek en PCR) varieert aanzienlijk van minder dan 10 procent tot 83 procent [3]. De meest gebruikte laboratoriumtesten voor de diagnostiek van LB, zogeheten enzym-immunoassays (EIA's), zijn gebaseerd op indirecte detectiemethoden die *Borrelia*-specifieke antistoffen aantonen. De sensitiviteit van deze EIA's neemt toe met de ziekteduur en varieert van 50 procent voor EM tot bijna 100 procent voor laat gedissemineerde LB [4]. De specificiteit van EIA's ligt rond 95 procent. Om de specificiteit te verhogen, beveelt de Nederlandse Richtlijn Lymeziekte een tweestapsprotocol aan, gebaseerd op een hoogsensitieve EIA als eerste screening en waarbij reactieve sera geconfirmeerd worden met een immunoblot [5].

In de loop der jaren zijn veel onderzoeken gedaan waarbij verschillende serologische *Borrelia*-testen zijn vergeleken in diverse studiegroepen [6-11]. In sommige van deze onderzoeken ontbrak een duidelijke casusdefinitie. Veel van de geëvalueerde testen zijn niet meer beschikbaar, waaronder de volgende twee veelgebruikte enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA's) voor de detectie van *Borrelia*-specifieke antistoffen: de C6 Lyme ELISA en de Enzygnost Lyme Link VlsE ELISA, waarvan de productie in 2020 is gestopt. Dit had tot gevolg dat 22 van de 52 laboratoria in Nederland die in 2019 deelnamen aan de rondzending Lues/Lymeserologie, georganiseerd door de Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratoriumdiagnostiek (persoonlijke communicatie A.H. Brandenburg), genoodzaakt waren een andere serologische screeningstest te implementeren voor hun LB-diagnostiek.

Implementatie van nieuwe laboratoriumtesten vereist inzicht in de prestaties en beschikbaarheid van deze testen en een grondige validatie conform ISO 15189. Om dit proces te ondersteunen, zijn in deze studie de prestaties van de stopgezette C6 Lyme ELISA en acht commercieel beschikbare CE-gecertificeerde screeningstesten met elkaar vergeleken, daarbij gebruikmakend van een goed gedefinieerde studiegroep van LB-patiënten en controles.

Methoden

Studieontwerp

Een studiepanel van 196 sera werd samengesteld op basis van een aangepast 'two-gate' studieontwerp [12], waarbij LB-patiënten en controles uit verschillende populaties werden geselecteerd. De LB-patiënten en de controlegroep bestaande uit patiënten met mogelijk kruisreactieve antistoffen werden geselecteerd uit een patiëntenpopulatie; gezonde controles werden geselecteerd uit de algemene Nederlandse populatie. De screeningstesten voor de detectie van *Borrelia*-specifieke antistoffen werden geselecteerd op basis van bewezen prestaties in eerder gepubliceerde studies en de antigeendiversiteit in de verschillende testen. Alleen die testen werden geïncludeerd waarvan de fabrikant de beschikbaarheid van de test met CE-markering onder de nieuwe Europese richtlijn (EU 2017/746) voor in-vitrodiagnostiek (CE-IVDR) toezegde [13]. Acht screeningstesten voldeden aan voornoemde criteria en de resultaten van deze testen werden vergeleken met die van de stopgezette C6 Lyme ELISA.

Studiegroep

In totaal werden 74 patiënten met verschillende lymemanifestaties geïncludeerd, representatief voor de meest voorkomende lymemanifestaties in Nederland [14]. Hierbij is de nadruk gelegd op gedissemineerde LB, waarbij serologische laboratoriumdiagnostiek een rol speelt bij het stellen van de diagnose. De LB-patiënten werden onderverdeeld in patiënten met EM (n = 11), Lyme neuroborreliose (LNB; n = 35), Lyme artritis (LA; n = 20), en Acrodermatitis Chronica Atrofica (ACA; n = 8) (zie tabel 1).

Tabel 1. Beschrijving van de studiepopulatie bij inclusie, demografische kenmerken en gerapporteerde serologische en PCR-resultaten.

	Alle LB- patiënten n = 74	EM n = 11	LNB definitief ¹ n = 27	LNB mogelijk ¹ n = 8	LA n = 20	ACA n = 8	Gezonde controles n = 74	Kruis- reactiviteit controles n = 48
Leeftijd (mediaan; range)	52,5 (5-81)	58,0 (18-77)	41,0 (6-80)	50,0 (11-75)	52,5 (5-81)	65,5 (53-77)	52,5 (5-81)	44,5 (13-83)
Geslacht (aantal mannen; %)	50 (63,3)	6 (54,5)	18 (66,7)	4 (50,0)	19 (95,0)	3 (37,5)	50 (63,3)	24 (50,0)
Bloedafname voor antibioticabehandeling (n; %)	62 (83,8)	11 (100)	21 (77,8)	6 (75,0)	16 (80,0)	8 (100)	nb	nb
Positieve <i>Borrelia</i>-serologie (n; %)	32 (82,1)	4 (36,4)	nb	nb	20 (100)	8 (100)	nb	nb
<i>Borrelia</i>-specifieke intrathecale antistofproductie (n; %)	nb	nb	26 (96,3)	4 (50,0)	nb	nb	nb	nb
<i>Borrelia</i> spp. PCR (aantal positieven/aantal getest; %)	32/45 (71,1)	6/7 (85,7)	4/13 (30,8)	0/3 (0)	15/15 (100)	7/7 (100)	nb	nb

LB = Lyme borreliose, EM = erythema migrans, LNB = Lyme-neuroborreliose, LA = Lyme-artritis, ACA = acrodermatitis chronica atroficans, nb = niet bepaald.

¹ Bepaald volgens de richtlijnen van de European Federation of Neurological Societies [15].

Alle LB-patiënten zijn gediagnosticeerd volgens de Nederlandse Richtlijn Lymeziekte, opgesteld door het Kwaliteitsinstituut voor de Gezondheidszorg (CBO) [5]. De LNB-patiënten werden verder geclassificeerd als definitieve of mogelijke LNB-patiënt conform de richtlijnen van de European Federation of Neurological Societies [15].

De sera waren afkomstig uit vijf Nederlandse laboratoria en werden geïncubeerd wanneer minimaal 500 µl serum beschikbaar was.

Gezonde controles (n = 74) werden geselecteerd uit de derde nationale cross-sectionele sero-prevalentiestudie (PIENTER-3), die in 2016 in Nederland werd

uitgevoerd [16]. Deze controles werden gematched met de LB-patiënten op basis van leeftijd en geslacht. De geïncubeerde patiënten met mogelijk kruisreactieve aandoeningen (hierna: kruisreactiviteitscontroles (n = 48)) waren patiënten met antistoffen tegen een van de volgende micro-organismen: epstein-barrvirus (n = 10), cytomegalovirus (n = 9), leptospirose (n = 8), syfilis (n = 7), hepatitis C-virus (acuut n = 2, chronisch n = 2) en *Helicobacter pylori* (n = 3), of patiënten met een auto-immuunziekte die positief testten op antinucleaire antistoffen (n = 4) of reumafactoren (n = 3). In beide controlegroepen werd geen historie van LB gerapporteerd.

Tabel 2. Overzicht van de geëvalueerde *Borrelia*-screeningstesten, de gebruikte antigenen en methode.

Afkorting	Assay (fabrikant)	Antigenen ¹	Methode
DRG IgM	Borrelia 14kDa + OspC IgM (DRG Diagnostics GmbH, Marburg, Germany)	natief OspC (Ba), 14 kDa flagelline fragment (Bsl)	ELISA
Euroimmun IgM	Anti-Borrelia ELISA (IgM) (Euroimmun AG, Lübeck, Germany)	SDS extract (Bss, Bg, Ba); verbeterde OspC expressie	ELISA
Liaison IgM	Liaison® Borrelia IgM Quant (DiaSorin S.p.A, Saluggia, Italy)	OspC (Ba), VlsE (Bg)	CLIA
NovaLisa IgM	NovaLisa® Borrelia burgdorferi IgM (NovaTec Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach, Germany)	OspC (Ba, Bg), p41i (Bg)	ELISA
Serion IgM	Serion ELISA classic Borrelia burgdorferi IgM (Institute Virion\Serion GmbH, Würzburg, Germany)	Bacterielysaten (Ba, Bg)	ELISA
VirClia IgM	Borrelia VirClia® IgM Monotest (Vircell S.L., Granada, Spain)	OspC (Ba, Bg, Bss, Bsp), VlsE (Bg), p41i (Bsl), p39 (Bsl), p17 (Bsl), OspE (Bsl)	CLIA
DRG IgG	Borrelia IgG + VlsE (DRG Diagnostics GmbH, Marburg, Germany)	crude lysate (Bss, Ba, Bg), VlsE (Bss, Ba, Bg)	ELISA
Euroimmun IgG	Anti-Borrelia plus VlsE ELISA (IgG) (Euroimmun AG, Lübeck, Germany)	SDS extract (Bss, Bg, Ba), VlsE (Bss)	ELISA
Liaison IgG	Liaison® Borrelia IgG (DiaSorin S.p.A, Saluggia, Italy)	VlsE (Bg)	CLIA
NovaLisa IgG	NovaLisa® Borrelia burgdorferi IgG (NovaTec Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach, Germany)	OspC (Bss, Bg), p100 (Ba), p18 (Ba), p41i (Bg)	ELISA
Serion IgG	Serion ELISA classic Borrelia burgdorferi IgG (Institute Virion\Serion GmbH, Würzburg, Germany)	Bacterielysaten (Ba, Bg), VlsE (Bg)	ELISA
VirClia IgG	Borrelia VirClia® IgG Monotest (Vircell S.L., Granada, Spain)	VlsE (Bsl), p41i (Bsl), p17 (Bsl)	CLIA
C6 IgM/IgG	C6 Lyme ELISA™ (Immunetics, Boston, USA)	Synthetisch C6 peptide (afkomstig van VlsE)	ELISA
Euroimmun IgM/IgG	Lyme ELISA (IgG/IgM) (Euroimmun AG, Lübeck, Germany)	VlsE (Bss), OspC (Bss)	ELISA
Zeus IgM/IgG	Borrelia VlsE1/pepC10 IgG/IgM Test System (Zeus Scientific Inc., Brachburg, USA)	VlsE1, pepC10 (10-meer peptide aan de C-terminus van OspC)	ELISA

Ig = immuoglobuline, Ba = *B. afzelii*, Bg = *B. garinii*, Bsl = *B. burgdorferi* sensu lato, Bsp = *B. spielmanii*, Bss = *B. burgdorferi* sensu stricto, ELISA : = enzyme-linked immunosorbent assay, CLIA =: chemiluminescent immunoassay.

¹ Antigenen zijn recombinant tenzij anders aangegeven.

Borrelia-screeningstesten

Tabel 2 geeft een overzicht van de geëvalueerde screeningstesten. De C6 IgM/IgG-, de Zeus IgM/IgG- en de Euroimmun IgM/IgG-test meten gelijktijdig immunoglobuline (Ig)G en IgM (hierna: IgT). In de

Euroimmun, Liaison, NovaLisa, Serion, DRG en VirClia testen werden IgM en IgG afzonderlijk gemeten. De screeningstesten werden uitgevoerd volgens de instructies van de fabrikant en uitslagen werden gerapporteerd als negatief, grenswaarde of positief.

Data-analyse

Sensitiviteit en specificiteit

De sensitiviteit van iedere test werd gedefinieerd als het percentage LB-patiënten met een positief testresultaat en werd zowel voor het hele panel LB-patiënten als voor iedere individuele LB-manifestatie bepaald. De specificiteit van iedere test werd gedefinieerd als het percentage controles met een negatief testresultaat. Voor het berekenen van de sensitiviteit en de specificiteit werden grenswaarde-testresultaten als positief geïnterpreteerd.

Afzonderlijke IgM- en IgG-testresultaten werden zowel apart als gecombineerd geanalyseerd. Voor deze gecombineerde Ig-uitslagen was het eindresultaat negatief wanneer zowel IgM als IgG negatief was en positief wanneer IgM en/of IgG positief was.

Analyse van de receiver operating characteristic (ROC)-curve

De sensitiviteit en specificiteit van de screeningstesten werden geanalyseerd met behulp van ROC-curves en vergeleken aan de hand van de oppervlakte onder de ROC-curve (area under the curve, AUC)-waarden met bijbehorend 95 procent-betrouwbaarheidsinterval (BI). Hiervoor werd R-versie 4.0.2 gebruikt met het pROC-pakket [17, 18]. De ROC-curves van de gecombineerde Ig-resultaten werden bepaald met behulp van regressiemodellering. Voor testen met afzonderlijke IgM- en IgG-bepaling werden vijf modellen gemaakt: i) een verzadigd model met numerieke testresultaten; ii) een onafhankelijk model met numerieke testresultaten; iii) model 1 en 2 gecombineerd; iv) model 3, zonder IgM als onafhankelijke variabele; v) model 3, zonder IgG als onafhankelijke variabele.

Het beste model (met het kleinste Akaike Information Criterion [AIC]) werd geselecteerd voor de analyse van de ROC-curves.

Interassay-overeenkomst

De paarsgewijze overeenkomst tussen twee screeningstesten werd uitgedrukt in Cohen's kappawaarde met 95 procent BI en berekend met behulp van het Visualizing Categorical Data-pakket [19]. Voor testen met afzonderlijke IgM- en IgG-bepaling werden de kappawaarden zowel voor de IgG-resultaten afzonderlijk als voor de gecombineerde Ig-resultaten berekend. De uitkomsten werden gekwalificeerd als uitstekend (κ hoger dan 0,75),

redelijk tot goed (κ van 0,40 tot 0,75) of slecht (κ lager dan 0,40) [20].

Resultaten

Beschrijving van de studiepopulatie

Tabel 1 toont de demografische kenmerken van de studiepopulatie alsmede de bij inclusie verkregen laboratoriumresultaten van de LB-patiënten. Vier (36,4 procent) van de 11 EM-patiënten waren seropositief. Een *Borrelia* spp.-PCR uitgevoerd op huidbiopt van zeven EM-patiënten (onder wie drie seronegatieve), was bij zes (85,7 procent) patiënten positief. Van de 35 LNB-patiënten werden er 27 (77,1 procent) geclassificeerd als definitieve LNB (dLNB)-patiënt en 8 (22,9 procent) als mogelijke LNB (pLNB)-patiënt. Bij 26 (96,3 procent) van de 27 dLNB-patiënten werden intratheaal geproduceerde *Borrelia*-specifieke antistoffen aangetoond. Voor 4 (30,8 procent) van de 13 dLNB-patiënten bij wie een *Borrelia* spp.-PCR op liquor werd uitgevoerd, was het resultaat positief, inclusief de liquor waarin geen intrathecally *Borrelia*-specifieke antistofsynthese kon worden aangetoond. Vier (50,0 procent) van de acht pLNB-patiënten hadden pleiocytose; de overige vier (50,0 procent) hadden intrathecally *Borrelia*-specifieke antistofsynthese (zie tabel 1). Een *Borrelia* spp.-PCR uitgevoerd op de liquor van drie pLNB-patiënten was in alle gevallen negatief. De 20 LA-patiënten hadden allemaal *Borrelia*-specifieke serumantistoffen. Een *Borrelia* spp.-PCR uitgevoerd op synoviaal vocht van 15 LA-patiënten was in alle gevallen positief. De acht ACA-patiënten hadden typische huidlaesies en positieve *Borrelia*-serologie. Bij zeven (87,5 procent) van de acht ACA-patiënten werd een *Borrelia* spp.-PCR op huidbiopt uitgevoerd en deze waren alle positief.

Sensitiviteit en specificiteit

De sensitiviteit van de testen varieerde per Ig-klasse en lymemanifestatie (zie tabel 3). Voor testen met afzonderlijke IgM- en IgG-bepalingen varieerde de sensitiviteit onder alle LB-patiënten van 45,9 tot 77,0 procent (IgM) en van 86,5 tot 95,9 procent (IgG). De gecombineerde Ig/IgT-sensitiviteit van de testen onder alle LB-patiënten varieerde van 91,9 tot 98,6 procent. Onder EM-patiënten varieerde de sensitiviteit van de IgM-testen van 18,2 tot 54,5 procent; de sensitiviteit van de IgG-testen varieerde van 54,5 tot 81,8 procent; de gecombineerde Ig/IgT-sensitiviteit varieerde van

Tabel 3. De sensitiviteit en specificiteit van de *Borrelia*-screeningstesten voor alle LB-patiënten, de afzonderlijke LB-manifestaties en de twee controlegroepen.

	Sensitiviteit (%) ¹					Specificiteit (%) ¹	
	Alle LB-patiënten	EM	LNB	LA	ACA	Gezonde controles	Kruis-reactiviteit controles
	n=74	n=11	n=35	n=20	n=8	n=74	n=48
IgM-testen							
DRG IgM	45,9	36,4	68,6	25,0	12,5	89,2	64,6
Euroimmun IgM	55,4	18,2	68,6	55,0	50,0	93,2	62,5
Liaison IgM	51,4	36,4	68,6	35,0	37,5	91,9	66,7
NovaLisa IgM	55,4	45,5	77,1	30,0	37,5	77,0	58,3
Serion IgM	77,0	54,5	91,4	65,0	75,0	78,4	39,6
VirClia IgM	45,9	18,2	71,4	30,0	12,5	91,9	70,8
IgG-testen							
DRG IgG	91,9	54,5	97,1	100	100	90,5	85,4
Euroimmun IgG	95,9	72,7	100	100	100	86,5	77,1
Liaison IgG	93,2	54,5	100	100	100	95,9	85,4
NovaLisa IgG	95,9	81,8	97,1	100	100	89,2	77,1
Serion IgG	86,5	63,6	82,9	100	100	91,9	83,3
VirClia IgG	95,9	72,7	100	100	100	86,5	85,4
Gecombineerde Ig-resultaten (percentage solitaire IgM-resultaten)							
DRG ²	91,9 (0,0)	54,5 (0,0)	97,1 (0,0)	100 (0,0)	100 (0,0)	79,7 (10,8)	50,0 (35,4)
Euroimmun ²	95,9 (0,0)	72,7 (0,0)	100 (0,0)	100 (0,0)	100 (0,0)	81,1 (5,4)	50,0 (27,1)
Liaison ²	95,9 (2,7)	72,7 (18,2)	100 (0,0)	100 (0,0)	100 (0,0)	87,8 (8,1)	56,2 (29,2)
NovaLisa ²	97,3 (1,4)	90,9 (9,1)	97,1 (0,0)	100 (0,0)	100 (0,0)	70,3 (18,9)	41,7 (35,4)
Serion ²	95,9 (9,5)	72,7 (9,1)	100 (17,1)	100 (0,0)	100 (0,0)	73,0 (18,9)	35,4 (47,9)
VirClia ²	95,9 (0,0)	72,7 (0,0)	100 (0,0)	100 (0,0)	100 (0,0)	78,4 (8,1)	60,4 (25,0)
C6 IgT (IgM+IgG) ³	98,6	90,9	100	100	100	89,2	75,0
Euroimmun IgT (IgM+IgG) ³	97,3	81,8	100	100	100	91,9	77,1
Zeus IgT (IgM+IgG) ³	94,6	63,6	100	100	100	90,5	70,8

ACA = acrodermatitis chronica atrophicans, EM = erythema migrans, LA = Lyme arthritis, LB = Lyme borreliose, LNB = Lyme neuroborreliose.

¹ Voor het berekenen van de sensitiviteit en specificiteit zijn grenswaarderesultaten als positief geïnterpreteerd.

² Voor testen met afzonderlijke IgM- en IgG-bepaling is het gecombineerde Ig-resultaat gebaseerd op een combinatie van het IgM- en IgG-resultaat: negatief wanneer zowel IgM als IgG negatief was en positief wanneer ten minste een van beide positief was.

³ Voor testen die IgM en IgG gelijktijdig meten (IgT), ontbreekt een solitair IgM-resultaat.

54,5 tot 90,9 procent. Een solitaire IgM-reactiviteit onder EM-patiënten werd gerapporteerd voor de NovaLisa- en Serion-testen (beide 9,1 procent) en voor de Liaison-test (18,2 procent).

Gedissemineerde lymemanifestaties werden door alle testen uitstekend gedetecteerd, met name door de hoge sensitiviteit van de IgG-testen (zie *tabel 3*). De meeste testen hadden een sensitiviteit van 100 procent onder patiënten met LNB, LA en ACA, met uitzondering van de NovaLisa- en DRG-testen, die dezelfde LNB-patiënt misten (97,1 procent sensitiviteit). De sensitiviteit van de IgM-testen was afhankelijk van de lymemanifestatie en varieerde van 68,6 tot 91,4 procent voor LNB, van 25,0 tot 65,0 procent voor LA en van 12,5 tot 75,0 procent voor ACA. Voor de meeste testen werd geen solitaire IgM-reactiviteit gevonden bij patiënten met gedissemineerde LB, en was de gecombineerde Ig-sensitiviteit identiek aan die van de corresponderende IgG-test, behalve voor de Serion-ELISA, waarvoor een solitaire IgM-reactiviteit van 17,1 procent werd gevonden bij LNB-patiënten.

De specificiteit van de testen verschilde per Ig-klasse en controlegroep (zie *tabel 3*). Bij de gezonde controles varieerde de specificiteit van de testen van 77,0 tot 93,2 procent (IgM) en van 86,5 tot 95,9 procent (IgG). De gecombineerde Ig/IgT-specificiteit lag tussen 70,3 en 91,9 procent. Alle IgM-testen hadden solitaire IgM-resultaten en de bijdrage ervan aan de gecombineerde Ig-specificiteit varieerde van 5,4 tot 18,9 procent.

De specificiteit van de testen varieerde het meest bij de kruisreactiviteitscontroles: 39,6 tot 70,8 procent (IgM) en 77,1 tot 85,4 procent (IgG) (zie *tabel 3*). De gecombineerde Ig/IgT-specificiteit varieerde tussen 35,4 en 77,1 procent, waarbij de bijdrage van een solitaire IgM-respons varieerde van 25,0 tot 47,9 procent.

Analyse van de ROC-curve

Voor alle testen werd een ROC-curve-analyse uitgevoerd (zie *figuur 1*, pagina 12). Voor de IgM-testen varieerden de AUC's van 0,680 tot 0,753 (zie *figuur 1B*), waarbij de overlappende 95 procent-BI's lieten zien dat er geen significante verschillen waren. De ROC-curven van de IgG-testen en IgT-testen waren vergelijkbaar (zie *figuur 1C*). De AUC's varieerden van 0,965 tot 0,977 (IgT) en van 0,937 tot 0,970 (IgG) en waren niet significant verschillend (zie *figuur 1D*).

De ROC-curven van de gecombineerde Ig-resultaten

werden bepaald met behulp van logistische regressiemodellering. Voor de meeste testen presteerde model 2 (het onafhankelijke model) het best, behalve voor de DRG- en VirClia-testen, waarvoor model 3 het best presteerde (gegevens niet getoond). Voor alle testen was de AUC op basis van het gecombineerde Ig-resultaat lager dan die voor IgG, hoewel niet significant.

Interassay-overeenkomst

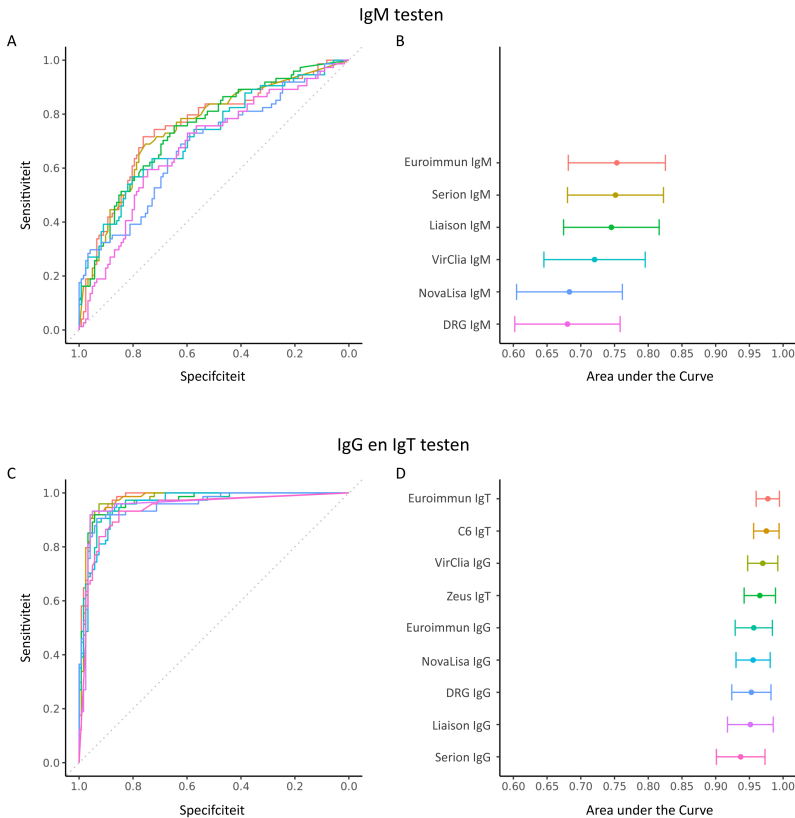
De paarsgewijze overeenkomst tussen twee testen op basis van de gecombineerde Ig/IgT-resultaten was redelijk tot uitstekend, met κ -waarden variërend van 0,53 tot 0,78. Voor de meeste testen nam de mate van overeenstemming aanzienlijk toe wanneer IgM-resultaten buiten beschouwing werden gelaten (κ tussen 0,59 en 0,91) (zie *figuur 2*, pagina 13). Tussen de meeste IgG- en IgT-testen werd een uitstekende overeenkomst (κ hoger dan 0,75) waargenomen. De Zeus IgT-ELISA en de Serion IgG-ELISA kwamen het minst overeen (κ 0,59; 95 procent-BI 0,48-0,70).

Discussie

In deze studie werden de prestaties van de stopgezette C6 Lyme ELISA-testen vergeleken met die van acht CE-gecertificeerde *Borrelia*-screeningstesten, die naar verwachting leverbaar blijven onder de nieuwe CE-IVDR [13]. Om tegemoet te komen aan de uiteenlopende behoeften van diagnostische laboratoria werden testen gekozen met verschillende antigeencoating. De onderzochte testen kunnen handmatig en/of op geautomatiseerde systemen worden uitgevoerd en zijn geschikt voor uiteenlopende monsteraantallen.

De algehele sensitiviteit van de testen voor klinisch gediagnosticeerde LB-patiënten was uitstekend. De sensitiviteit bij patiënten met een gedissemineerde lymemanifestatie (dat wil zeggen LNB, LA en ACA) was hoger dan bij EM-patiënten en was vergelijkbaar met eerdere studies [4,7,21]. Negatieve testresultaten bij EM-patiënten kunnen worden verklaard door een onjuiste diagnose van (onduidelijke) huidmanifestaties, niet-detecteerbare antistofspiegels in de opbouwende fase of een afgebroken antistofrespons als gevolg van tijdige antibioticumbehandeling [3]. De waargenomen sensitiviteit onder EM-patiënten in deze studie ondersteunt de landelijke CBO-richtlijn Lymeziekte, die serologisch onderzoek bij EM-patiënten ontmoedigt, en diagnose en behandeling van

Figuur 1. Receiver operating characteristic (ROC) curven voor de IgM-testen (paneel A) en de IgG- en IgT-testen (paneel C) en de bijbehorende areas under the curve (AUC's) met 95 procent-betrouwbaarheidsintervallen (BI's) (respectievelijk paneel B en D), gebruikmakend van alle LB-patiënten, gezonde controles en kruisreactiviteitscontroles. Stippen en foutbalken in paneel B en D geven respectievelijk de AUC en 95 procent-BI weer.



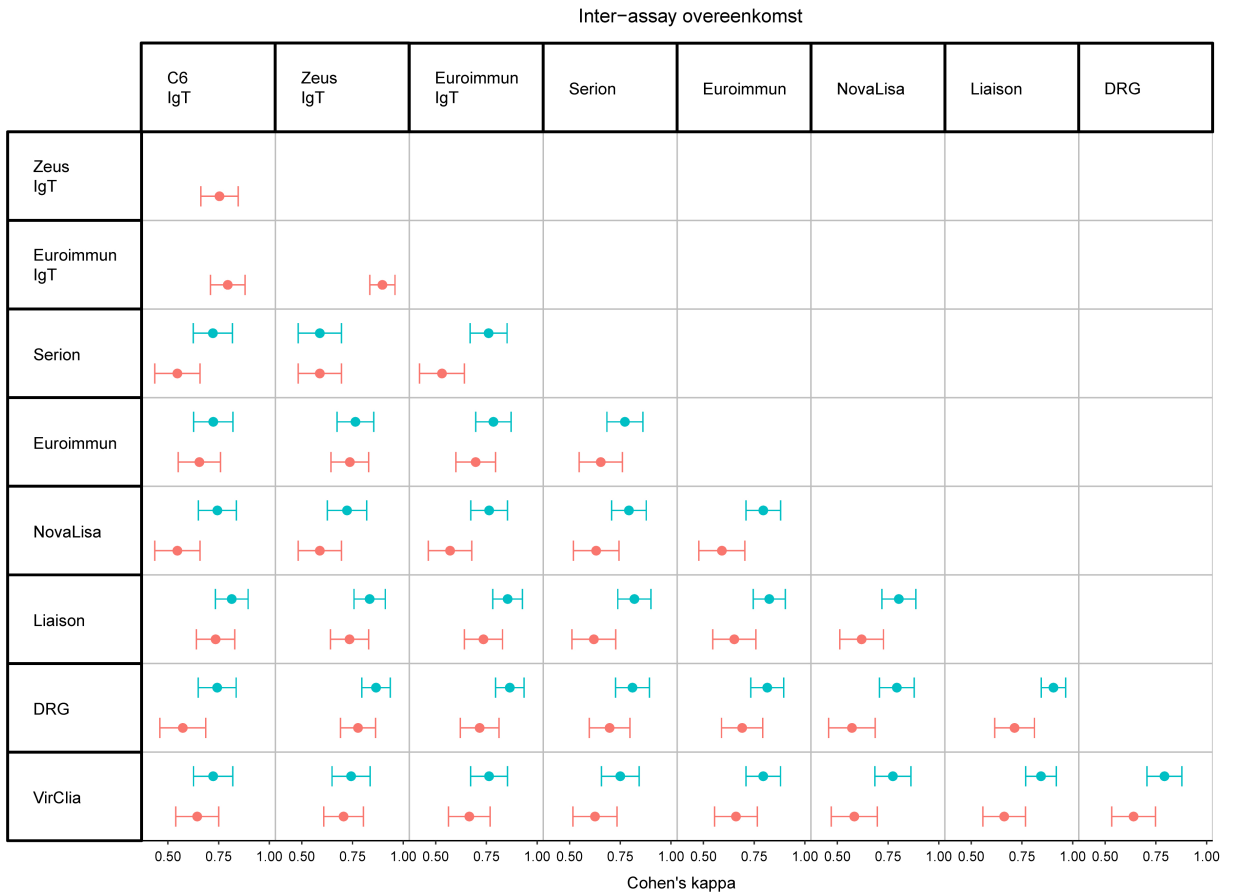
EM op basis van uitsluitend klinische symptomen aanbeveelt [5].

De specificiteit reflecteert zowel kruisreactiviteit alsook in het verleden doorgemaakte infectie. Het percentage (fout-)positieve IgG-resultaten onder gezonde controles duidt hoofdzakelijk op een in het verleden doorgemaakte LB, aangezien deze vergelijkbaar was met de seroprevalentie in Nederland [22] en die in andere West-Europese landen [23,24]. Het percentage foutpositieve IgM- en IgG-resultaten onder kruisreactiviteitscontroles is hoger dan die bij de gezonde controles en duidt op de aanwezigheid van (kruisreactieve) antistoffen opgewekt tegen bijvoorbeeld heterologe bacteriën of auto-immuunziekten, of door polyklonale B-celactivatie [25]. De lage speci-

fiteit van de IgM-testen bevestigt eerder gepubliceerde resultaten [6,7] en benadrukt dat positieve IgM-resultaten met zorg moeten worden geïnterpreteerd, vooral wanneer de klinische symptomen onduidelijk zijn.

Kortom, de positieve testresultaten in de controlegroepen benadrukken de noodzaak van het inschatten van de voorafkans op LB alsook de toepassing van het tweestapsprotocol voor de klinische diagnose van LB. Inschatting van de voorafkans op basis van mogelijke blootstelling, achtergrondprevalentie en klinische symptomen van de individuele patiënt leidt tot een grotere positief voorspellende waarde van de test [5,21]. Bovendien zal het bevestigen van positieve screeningsresultaten

Figuur 2. Een forest plot van de paarsgewijze interassay-overeenkomst tussen IgG-testen (blauw) en gecombineerde Ig/IgT-resultaten (rood) met Cohen's κ -waarden (stippen) en 95 procent-betrouwbaarheidsintervallen (foutbalken).



met een immunoblot de specificiteit verhogen [5,21]. De in deze studie geëvalueerde testen die IgG of IgT meten, presteerden vergelijkbaar. De hoge AUC-waarden weerspiegelen de hoge sensitiviteit, zeker voor patiënten met een gedissemineerde lymemanifestatie. De hoge mate van homogeniteit in testprestaties werd ook weerspiegeld door de smalle 95 procent-BI's van de AUC's en de hoge interassay-overeenkomst. Deze resultaten komen overeen met een eerdere studie [6] en suggereren dat de onderzochte IgG- en IgT-testen beide geschikt zijn voor gebruik in de klinische praktijk. In tegenstelling tot de IgG- en IgT-testen liepen de prestaties van de IgM-testen meer uiteen, getuige de significant lagere AUC's en (bijbehorende) bredere 95 procent-BI's.

In de klinische praktijk bestaat de serologie voor LB-diagnostiek uit zowel het aantonen van *Borrelia*-specifieke IgM- als IgG-antistoffen. Deze studie toonde aan dat het aandeel van solitaire IgM-responsen hoger was bij beide controlegroepen dan bij LB-patiënten. Bovendien werd de interassay-overeenkomst voor de meeste testen aanzienlijk lager door het combineren van de IgM- en IgG-resultaten. Deze resultaten suggereren dat het gebruik van IgM-testen voor screening op *Borrelia*-specifieke antistoffen kan leiden tot overdiagnose en -behandeling. Dit fenomeen werd eerder uitvoerig besproken [21] en geëvalueerd in de klinische praktijk [26]. Daarom lijkt het doelmatiger om de IgM-respons alleen te testen wanneer klinische symptomen wijzen op vroege infectie. Zelfs dan moet

een solitaire IgM-reactiviteit zorgvuldig worden geïnterpreteerd, aangezien fout-positiviteit als gevolg van kruisreactiviteit of eerder doorgemaakte infectie niet mag worden uitgesloten [27].

Met de aanscherping van Europese regelgeving voor de CE-markering van IVD's is de productie van sommige diagnostische tests voor fabrikanten mogelijk niet meer haalbaar en/of economisch aantrekkelijk gebleken [28]. De kracht van deze studie is dat er acht testen zijn vergeleken die momenteel beschikbaar zijn voor de detectie van *Borrelia*-specifieke antistoffen in diagnostische laboratoria en die naar verwachting onder de nieuwe CE-IVDR beschikbaar blijven.

Voor de meeste lymemanifestaties is de detectie van *Borrelia*-specifieke antistoffen een belangrijk onderdeel van de diagnostiek. Hoewel klinisch goed gedefinieerd, werden de in deze studie opgenomen LB-patiënten deels geselecteerd op basis van positieve serologie in de deelnemende laboratoria, wat geleid zou kunnen hebben tot een overschatting van de sensitiviteit van de onderzochte testen. Om deze selectiebias te verminderen, werden de monsters geselecteerd uit laboratoria die verschillende screeningstesten gebruikten. Bovendien werden de monsters geanalyseerd met alle testen, waardoor de overeenkomst tussen de testen kon worden beoordeeld en patiënten konden worden geïdentificeerd die door een of meerdere testen werden gemist.

Studies met een two-gateontwerp, waarbij patiënten en controles uit verschillende populaties worden geïncubeerd, kunnen last hebben van spectrumeffecten (dat wil zeggen variërende testprestaties in verschillende onderzoekspopulaties) en limited-challenge bias (dat wil zeggen alleen de ziekste patiënten includeren), wat leidt tot overschatting van de testprestaties [4,12]. In deze studie werden spectrumeffecten tot een minimum beperkt door gebruik te maken van een aangepast two-gate-studieontwerp dat zowel gezonde als kruisreactiviteitscontroles omvatte: een combinatie van beide door Rutjes et al. beschreven two-gate-ontwerpen [12]. Hoewel deze studie zich voornamelijk richtte op gedissemineerde lymemanifestaties, werd de limited-challenge bias verminderd door tevens EM-patiënten te includeren. De onderzoeksopzet had verder verbeterd kunnen worden met een prospectief one-gateontwerp, waarbij patiënten verdacht voor LB

worden geïncubeerd [12]. Het includeren van voldoende aantallen per lymemanifestatie zou echter aanzienlijk meer tijd hebben gekost.

Ten slotte

Samenvattend toonden alle onderzochte screeningstesten een uitstekende sensitiviteit, waarbij het testen volgens het tweestapsprotocol de specificiteit verder kan verhogen. Voor de diagnose van LB kan het best gebruik worden gemaakt van een IgG- of IgT-test. Aangezien de IgM-resultaten de gecombineerde Ig-specificiteit verlaagden en de solitaire aanwezigheid van IgM-antistoffen onvoldoende bewijs is voor actieve LB, lijkt de toevoeging van een IgM-test aan de *Borrelia*-screening op IgG-antistoffen overbodig.

Referenties

1. Tekenradar. [Internet]. [12-06-2021]. Available from: <https://www.tekenradar.nl/nieuws/actueel-op-tekenradar-nl/in-10-jaar-stijgt-aantal-tekenbeten-naar-1-5-miljoen-per-jaar?state=online>.
2. van den Wijngaard CC, Hofhuis A, Harms MG, et al. The burden of Lyme borreliosis expressed in disability-adjusted life years. *Eur J Public Health*. 2015;25:1071-8.
3. Branda JA, Steere AC. Laboratory Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clin Microbiol Rev*. 2021;34(2).
4. Leeflang MM, Ang CW, Berkhout J, et al. The diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis in Europe: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2016;16:140.
5. CBO. [Dutch Guideline Lyme Disease] [Internet]. 2013 [Available from: <https://www.rivm.nl/nieuws/cbo-richtlijn-lymeziekte-definitief>].
6. Lager M, Dessau RB, Wilhelmsson P, Nyman D, Jensen GF, Matussek A, et al. Serological diagnostics of Lyme borreliosis: comparison of assays in twelve clinical laboratories in Northern Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38:1933-45.
7. Ang CW, Brandenburg AH, van Burgel ND, et al. A Dutch nationwide evaluation of serological assays for detection of *Borrelia* antibodies in clinically well-defined patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;83:222-8.
8. Dessau RB. Diagnostic accuracy and comparison of two assays for *Borrelia*-specific IgG and IgM antibodies: proposals for statistical evaluation methods, cut-off values and standardization. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 12):1835-44.
9. van Gorkom T, Kremer K, Voet W, et al. Disagreement between the results from three commercial tests for the detection of *Borrelia*-specific serum antibodies in the Netherlands associated with antibiotic treatment for Lyme borreliosis: a retrospective study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36:2137-46.
10. Rouhiainen M, Pietikäinen A, Kortela E, Kanerva MJ, Oksi J, Hytönen J. C6 peptide enzyme immunoassay in Lyme borreliosis serology. *J Microbiol Methods*. 2021;180:106122.
11. Baarsma ME, Schellekens JFP, Meijer BC, et al. Diagnostic parameters

- of modified two-tier testing in European patients with early Lyme disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020;39:2143-52.
12. Rutjes AW, Reitsma JB, Vandenbroucke JP, Glas AS, Bossuyt PM. Case-control and two-gate designs in diagnostic accuracy studies. *Clin Chem.* 2005;51:1335-41.
13. European Parliament CotEU. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU. *OJ.* 2017;L 117:176-332.
14. Hofhuis A, Harms M, Bennema S, van den Wijngaard CC, van Pelt W. Physician reported incidence of early and late Lyme borreliosis. *Parasit Vectors.* 2015;8:161.
15. Mygland A, Ljostad U, Fingerle V, et al. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *Eur J Neurol.* 2010;17:8-16, e1-4.
16. Verberk JDM, Vos RA, Mollema L, et al. Third national biobank for population-based seroprevalence studies in the Netherlands, including the Caribbean Netherlands. *BMC Infect Dis.* 2019;19.
17. Team RC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2020.
18. Robin X, Turck N, Hainard A, et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics.* 2011;12:77.
19. Meyer D, Zeileis A, Hornik K. vcd: Visualizing Categorical Data. R package version 2020:1.4-8.
20. Fleiss JL, Levin B, Paik MC. The Measurement of Interrater Agreement. In: Shewart WA, Wilks SS, Fleiss JL, Levin B, Paik MC, editors. *Statistical Methods for Rates and Proportions.* Wiley Series in Probability and Statistics: John Wiley & Sons, Inc.; 2003. p. 598-626.
21. Dessau RB, van Dam AP, Fingerle V, et al. To test or not to test? Laboratory support for the diagnosis of Lyme borreliosis: a position paper of ESGBOR, the ESCMID study group for Lyme borreliosis. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24:118-24.
22. Hoeve-Bakker BJA, Jonker M, Brandenburg AH, et al. The Performance of Nine Commercial Serological Screening Assays for the Diagnosis of Lyme Borreliosis: a Multicenter Modified Two-Gate Design Study. *Microbiol Spectr.* 2022;10:e0051022.
23. Wilking H, Fingerle V, Klier C, Thamm M, Stark K. Antibodies against *Borrelia burgdorferi sensu lato* among Adults, Germany, 2008-2011. *Emerg Infect Dis.* 2015;21:107.
24. Johansson M, Manfredsson L, Wistedt A, Serrander L, Tjernberg I. Significant variations in the seroprevalence of C6 ELISA antibodies in a highly endemic area for Lyme borreliosis: evaluation of age, sex and seasonal differences. *APMIS.* 2017;125(5):476-81.
25. Strizova Z, Smrz D, Bartunkova J. Seroprevalence of *Borrelia* IgM and IgG Antibodies in Healthy Individuals: A Caution Against Serology Misinterpretations and Unnecessary Antibiotic Treatments. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2020;20:800-2.
26. Hillerdal H, Henningson AJ. Serodiagnosis of Lyme borreliosis-is IgM in serum more harmful than helpful? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021;40:1161-8.
27. Kalish RA, McHugh G, Granquist J, Shea B, Ruthazer R, Steere AC. Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to *Borrelia burgdorferi* 10-20 years after active Lyme disease. *Clin Infect Dis.* 2001;33:780-5.
28. Lubbers BR, Schilhabel A, Cobbaert CM, et al. The New EU Regulation on In Vitro Diagnostic Medical Devices: Implications and Preparatory Actions for Diagnostic Laboratories. *Hemasphere.* 2021;5:e568.