

Een diagnostisch algoritme voor Lyme neuroborreliose

Tamara van Gorkom, Dieneke Hoeve-Bakker

Samenvatting

De diagnostiek van Lyme neuroborreliose (LNB) is complex. Veelal wordt de diagnose gesteld op basis van klinische symptomen, ondersteund door laboratoriumdiagnostiek. Diagnostiek richt zich vooral op detectie van intrathecale *Borrelia*-specifieke antistofsynthese, eventueel aangevuld met andere routinematige en specifieke liquor- en serumparameters. Geen van de beschikbare parameters kan op zichzelf een actieve infectie aantonen en vooralsnog ontbreekt een gevalideerd diagnostisch algoritme voor LNB-diagnostiek.

In een retrospectieve cross-sectionele studie zijn zeven commerciële antistof testen geëvalueerd, gevolgd door een multiparameteranalyse om de toegevoegde waarde van andere liquor- en serumparameters voor LNB-diagnostiek te onderzoeken.

In totaal zijn 156 patiënten geïnccludeerd, van wie 10 geclassificeerd zijn als 'zekere', 7 als 'mogelijke', en 139 als 'niet-LNB'-patiënt, gebruikmakend van Europese neurologierichtlijnen. De sensitiviteit en specificiteit van de antistof testen varieerden respectievelijk tussen 47,1 en 100 procent en tussen 95,7 en 100 procent. Het combineren van meer parameters verhoogde de sensitiviteit (bereik: 94,1 tot 100 procent), met een geringe daling in specificiteit (bereik: 92,8 tot 96,4 procent). De belangrijkste parameter is de detectie van intrathecally geproduceerde *Borrelia*-specifieke antistoffen, gevolgd door tweestaps-serologie op serum, CXCL13-concentratie in liquor, Reibergram-classificatie en pleiocytose.

Concluderend wordt aangetoond dat gebruik van meerdere parameters bijdraagt aan verbeterde LNB-diagnostiek. Een gezamenlijke prospectieve studie wordt voorgesteld om te onderzoeken of een gestandaardiseerd diagnostisch algoritme voor verbeterde LNB-diagnostiek kan worden ontwikkeld.

Abstract

Diagnosis of Lyme neuroborreliosis (LNB) is complex. It is mostly made based on clinical symptoms, supported by laboratory diagnostics. Laboratory diagnostics primarily focuses on detection of intrathecally produced *Borrelia*-specific antibodies and can be supported by other routine and specific cerebrospinal fluid (CSF) and serum parameters. None of the available parameters can independently confirm an active infection and a validated diagnostic algorithm for LNB diagnosis is lacking.

Using a retrospective cross-sectional study design, seven commercial antibody tests were evaluated, followed by a multiparameter analysis to investigate the added value of other CSF/serum parameters for LNB diagnosis. Of the 156 patients included, 10 were classified as "definite", 7 as "probable", and 139 as "non-LNB"-patient following European neurology guidelines. The sensitivity and specificity of the antibody tests ranged between 47.1 and 100 percent and between 95.7 and 100 percent, respectively. Combining multiple parameters

Diakonessenhuis, Utrecht, afdeling Medische Microbiologie en Immunologie en Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Centrum voor Infectieziektebestrijding, Bilthoven; dr. T. van Gorkom, postdoctoraal onderzoeker ziekte van Lyme, drs. B.J.A. Hoeve-Bakker, PhD-student.
Correspondentieadres: dr. T. van Gorkom, e-mailadres: tvgorkom@diakhuis.nl.

Dit artikel is een bewerking van: van Gorkom T, Voet W, van Arkel GHJ, Heron M, Hoeve-Bakker BJA, Notermans DW, Thijsen SFT, Kremer K. Retrospective evaluation of various serological assays and multiple parameters for optimal diagnosis of Lyme neuroborreliosis in a routine clinical setting. Microbiol Spectr. 2022 Apr 11:e0006122.

increased sensitivity (range: 94.1-100 percent); however, slightly decreased specificity (range: 92.8-96.4 percent). The key parameter is intrathecal *Borrelia*-specific antibody detection, followed by 2-tier serology on serum, CSF-CXCL13 levels, Reibergram-classification and pleocytosis.

To conclude, a multiparameter strategy is of added value for LNB diagnosis. A standardized diagnostic algorithm for improved LNB diagnosis may be developed in a joint prospective study.

Inleiding

Lyme neuroborreliose (LNB) is een door teken overgedragen infectieziekte van het perifere en/of centrale zenuwstelsel veroorzaakt door *Borrelia burgdorferi* sensu lato [1]. LNB presenteert zich vaak als een pijnlijke meningoradiculitis met of zonder betrokkenheid van de hersenzenuwen [2]. De jaarlijkse LNB-incidentie in Nederland in 2010 werd geschat op 2,6 per 100.000 inwoners [3].

LNB-diagnostiek is gebaseerd op klinische symptomen en wordt ondersteund door laboratoriumdiagnostiek. Volgens de richtlijnen van de Europese Federatie van Neurologische Sociëteiten (EFNS) wordt een patiënt geïdentificeerd met 'zekere' LNB bij passende kliniek in aanwezigheid van intrathecale *Borrelia*-specifieke antistofsynthese en pleiocytose (≥ 5 leukocyten/ μ L liquor) [2]. Het aantonen van intrathecale *Borrelia*-specifieke antistofsynthese vereist een gelijktijdige meting van *Borrelia*-specifieke antistoffen in liquor en serum gevolgd een *Borrelia*-specifieke antistofindex (AI)-berekening. Hierbij moet zowel rekening gehouden worden met de totale hoeveelheid antistoffen in beide materialen als met de functionaliteit van de bloed-liquorbarrière [2,4]. Deze manier van antistofdetectie is echter complex, vereist de nodige expertise en wordt niet door elk medisch-microbiologisch laboratorium uitgevoerd. In de praktijk wordt er daarom regelmatig voor gekozen om alleen liquor te onderzoeken op de aanwezigheid van *Borrelia*-specifieke antistoffen.

Voor het bepalen van intrathecale *Borrelia*-specifieke antistofsynthese zijn verschillende commerciële antistoftesten beschikbaar. Zeven van deze testen zijn geëvalueerd in een retrospectieve cross-sectionele studieopzet. Met een multiparameteranalyse is onderzocht of de diagnostische prestaties van deze testen verder konden worden verbeterd. Hierbij zijn de volgende extra parameters meegenomen: pleio-

cytose, totaaleiwit, *Borrelia*-DNA en B-cel chemokine (C-X-C motief) ligand 13 (CXCL13) (alle bepaald in liquor), *Borrelia*-specifieke antistoffen (bepaald in serum), bloed-liquorbarrière-functionaliteit en intrathecale totale antistofsynthese (bepaald in liquor en serum).

Methoden

Studiepopulatie

Alle opeenvolgende patiënten kwamen voor inclusie in aanmerking indien een liquor-serumpaar (tijd tussen beide afnames ≤ 24 uur) was verzonden naar het medisch-microbiologisch laboratorium van het Diaconessenhuis Utrecht in de periode tussen augustus 2013 en juni 2016. Voorwaarde voor inclusie was de beschikbaarheid van $\geq 1250 \mu$ L liquor en $\geq 110 \mu$ L serum. Patiënten werden geïdentificeerd als 'zekere', 'mogelijke', of 'niet-LNB'-patiënt volgens de EFNS-richtlijnen [2]. Intrathecale *Borrelia*-specifieke antistofsynthese was bewezen indien de meerderheid van de geëvalueerde liquor-serumtesten een pathologische ($\geq 1,5$) *Borrelia*-specifieke IgM- en/of IgG-AI-waarde had (hierna genoemd: consensusstrategie) [5]. Vanwege het beperkte aantal LNB-patiënten in de studiepopulatie zijn zes patiënten van buiten de vooraf gedefinieerde studieperiode geïncludeerd (van februari 2011 tot juli 2013, en van juli 2016 tot november 2017). Alle zes waren in het Diaconessenhuis gediagnosticeerd met LNB.

Borrelia-specifieke antistofdetectie in liquor-serum-paren en liquor

De zeven geselecteerde antistoftesten verschillen van elkaar in techniek, *Borrelia*-antigenen en/of kwantificeringsmethode (zie *tabel 1*, *pagina 18*). Bij vijf antistoftesten, zogeheten liquor-serumtesten, werden liquor-serumparen getest op aanwezigheid van *Borrelia*-specifieke antistoffen gevolgd door een *Borrelia*-specifieke AI-berekening. Bij twee antistoftesten, zogeheten liquortesten, werd alleen de liquor getest op aanwezigheid van *Borrelia*-specifieke antistoffen als bewijs voor intrathecale synthese. In januari 2019 heeft de fabrikant van de *recom*Line immunoblot (IB) de interpretatie van de *recom*Line IgG IB herzien (zie *tabel 1*). Beide interpretatiecriteria zijn in deze studie onderzocht; alleen de herziene interpretatiecriteria zijn echter in het artikel uitgewerkt.

Tabel 1. Overzicht van de geëvalueerde antistoftesten.

Testen (fabrikant) ^a	Techniek	Antigenen ^b	Kwantificering	Berekening AI	Normale AI-waarde	Dubieuze AI-waarde	Pathologische AI-waarde
Liquor-serumtesten							
IDEIA™ Lyme Neuroborreliosis IgM en IgG kit (Oxoid, Hampshire, Engeland)	Capture ELISA	Gezuiverd natief DK1 flagel (p41) <i>Ba</i>	Semi-kwantitatief	(OD liquor/ OD serum) *	AI < 0,3 of OD liquor < 0,150	-	AI ≥ 0,3
Borrelia IgM en IgG ELISA Medac (Medac GmbH, Hamburg, Duitsland)	ELISA	OspC and VlsE (IgM) en VlsE (IgG)	Kwantitatief	Volgens Reiber en Peter [4]	0,6 ≤ AI ≤ 1,3	1,3 < AI ≤ 1,5	AI > 1,5
recomBead Borrelia IgM en IgG 2.0 (Mikrogen Diagnostik GmbH, Neuried, Duitsland)	Luminex	p100, VlsE, p58, p39, OspA, OspC (<i>Bbss</i> , <i>Ba</i> , <i>Bg</i>), en p18 (<i>Bbss</i> , <i>Ba</i> , <i>Bba</i> , <i>Bg</i> , <i>Bsp</i>) ^c	Semi-kwantitatief	Per antigeen: Volgens Reiber en Peter [4]	0,6 ≤ AI ≤ 1,3	1,3 < AI < 1,5	AI ≥ 1,5
Borrelia burgdorferi IgM en IgG SERION ELISA classic (Instituut Virion/Serion GmbH, Würzburg, Duitsland)	ELISA	Cellysaten <i>Ba</i> en <i>Bg</i> (IgM) en cellysaten <i>Ba</i> en <i>Bg</i> + VlsE van <i>Bg</i> (IgG) [25,26]	Kwantitatief	Volgens Reiber en Peter [4]	0,7 ≤ AI ≤ 1,4	-	AI > 1,5
Enzygnost® Borreliosis/IgM en Enzygnost® Lyme link VlsE/IgG (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Duitsland)	ELISA	Cellysaat <i>Bbss</i> (IgM) en cellysaat <i>Ba</i> + recombinant VlsE (IgG)	Kwantitatief	Volgens Reiber en Peter [4]	0,5 ≤ AI ≤ 1,49	-	AI ≥ 1,5
Liquortesten							
C6 ELISA totaal Ig (IgM/IgG gecombineerd) (Immunetics, Boston, MA, Verenigde Staten)	ELISA	Synthetisch C6 peptide (afkomstig van VlsE) [27]	Semi-kwantitatief ^d	-	-	-	-
recomLine IgM en IgG (Mikrogen Diagnostik GmbH)	Immunoblot	p100, VlsE, p58, p41, p39, OspA, OspC (<i>Bbss</i> , <i>Ba</i> , <i>Bg</i> , <i>Bsp</i>), en p18 (<i>Bbss</i> , <i>Ba</i> , <i>Bba</i> , <i>Bg</i> , <i>Bsp</i>) ^c	Semi-kwantitatief ^e	-	-	-	-

AI = antistofindex; Ig = immunoglobuline; OD = optische dichtheid; Osp = outer surface protein (buitenmembraan eiwit); VlsE = variable major protein-like sequence, expressed; *Bbss* = *B. burgdorferi* sensu strictu; *Ba* = *B. afzelii*; *Bg* = *B. garinii*; *Bba* = *B. bavariensis*; *Bsp* = *B. spielmanii*.

a. Testen zijn uitgevoerd volgens de bijsluiter van de fabrikant, met de volgende uitzonderingen per test: IDEIA, liquor-serum paren in enkelvoud getest en niet in duplo i.v.m. beperkte hoeveelheid monstermateriaal, tenzij de liquor een OD-waarde ≥ 0,100 had, deze zijn herhaald; Medac ELISA en *recomBead*-test, dubieuze AI-waarden niet herhaald i.v.m. beperkte hoeveelheid monstermateriaal; Enzygnost ELISA, getest met aangepast protocol i.v.m. een randeffect in de zowel de IgG- [28] als IgM-test (data niet gepubliceerd); Serion ELISA, geen uitzonderingen, C6 ELISA, protocol beschrijft alleen het gebruik van serum, voor liquor is een 1:5 verdunning getest, vergelijkbaar met een eerdere studie [29]; en *recomLine* immunoblot (IB), om praktische redenen is het serumprotocol gebruikt voor het testen van de liquoren, echter voor IgM is een 1:10 (i.p.v. een 1:51) en voor IgG een 1:20 verdunning (i.p.v. een 1:101) gebruikt.

b. Antigenen zijn recombinant, tenzij anders aangegeven.

c. Reactiviteit tegen meerdere OspC of p18 antigenen wordt 1x gescoord.

d. C6 ELISA resultaten op liquoren zijn geïnterpreteerd middels de berekening van een Lyme index (LI) m.b.v. de volgende formule: $LI = OD \text{ liquor} / (OD \text{ kalibrator} + 0,3)$, identiek aan de werkwijze voor serum. Resultaten zijn geïnterpreteerd als negatief ($LI \leq 0,90$), dubieus ($0,91 < LI < 1,09$), of positief ($LI \geq 1,10$).

e. Voor zowel liquor als serum hebben de banden verschillende scores (punten). Voor IgM: p100 = 5, VlsE = 5, p58 = 4, p41 = 1, p39 = 4, OspA = 5, OspC = 8, p18 = 5. Voor IgG: p100 = 5, VlsE = 5, p58 = 4, p41 = 1, p39 = 5, OspA = 5, OspC = 5, p18 = 5. Resultaten zijn gebaseerd op de som van de scores van de banden die een vergelijkbare of hogere intensiteit hebben dan de intensiteit van de cutoff-band. De totaalsom per Ig wordt geïnterpreteerd als negatief (≤ 5 punten), dubieus (6 punten), of positief (≥ 7 punten). De fabrikant van de *recomLine* IB heeft de interpretatie van de *recomLine* IgG IB in januari 2019 herzien door de score van de VlsE-band met één punt te verhogen van 5 naar 6, waarbij tevens de totaalsom voor de IgG-interpretatie is aangepast naar: negatief (≤ 5 punten), dubieus (6-7 punten), of positief (≥ 8 punten).

Bloed-liquorbarrièrefunctionaliteit en intrathecale totale antistofsynthese

Om de bloed-liquorbarrièrefunctionaliteit en de intrathecale totale antistofsynthese (IgM en IgG) te onderzoeken, zijn de liquor- en serumconcentraties van albumine, totaal IgM en totaal IgG bepaald via nefelometrie en gebruikt om de liquor/serumquotiënt (Q) voor albumine (Q_{Alb}), totaal IgM (Q_{IgM}) en totaal IgG (Q_{IgG}) te berekenen [6]. De Q_{Alb} wordt gebruikt om de bloed-liquorbarrièrefunctionaliteit te beoordelen, en is verstoord wanneer de Q_{Alb} hoger is dan de leeftijdsafhankelijke Q_{Alb} [4]. Intrathecale totale antistofsynthese is bewezen als, rekening houdend met de status van de bloed-liquorbarrière, de Q_{IgM} en/of Q_{IgG} boven de referentiewaarde ligt, en de intrathecale fractie totaal IgM en/of totaal IgG > 10 procent [7]. Beide parameters kunnen tegelijkertijd in een Reibergram zichtbaar worden gemaakt, waarbij de Q_{Alb} op de x-as, en de Q_{IgM} (of Q_{IgG}) op de y-as wordt geplaatst [7].

Berekening *Borrelia*-specifieke AI

Voor de *Borrelia*-specifieke AI-berekening zijn antistoftestspecifieke methodes gebruikt (zie tabel 1). De IDEIA liquor-serumtest, een capture ELISA, behoeft geen correctie voor een verstoorde bloed-liquorbarrière [8]. Voor de overige liquor-serumtesten wordt intrathecale *Borrelia*-specifieke antistofsynthese aangetoond met een *Borrelia*-specifieke AI-berekening volgens Reiber [4]. Deze methode houdt rekening met de bloed-liquorbarrièrefunctionaliteit en een polyspecifieke immuunrespons. Aangezien de interpretatiecriteria van de *Borrelia*-specifieke AI-waarden in tabel 1 enigszins verschillen tussen de vier liquor-serumtesten, werden de volgende door Reiber gedefinieerde interpretatiecriteria gebruikt: $AI \geq 1,5$ is pathologisch, $0,6 \leq AI \leq 1,3$ is normaal en $AI < 0,6$ is een methodologische fout [9]. *Borrelia*-specifieke AI-waarden tussen 1,3 en 1,5 werden in de huidige studie als normaal beschouwd.

Borrelia-specifieke antistofdetectie in serum

Borrelia-specifieke serumantistoffen werden aangetoond met een door de Nederlandse Richtlijn Lymeziekte aanbevolen tweestapsprotocol [10]. De C6 ELISA werd gebruikt als screeningtest, en dubieuze en positieve C6 ELISA-resultaten werden geconfirmeerd met de recomLine IB. De recomLine IB werd ook uitgevoerd op C6 ELISA-negatieve sera om alle

liquoruitslagen te kunnen vergelijken met die van het corresponderende serum, om zodoende inzicht te krijgen in de herkomst van de antistoffen. Voor de recomLine IgG IB-uitslagen op serum zijn, net als bij de liquor, de oude en herziene interpretatiecriteria van de recomLine IgG IB (zie tabel 1) toegepast en zijn alleen de herziene interpretatiecriteria uitgewerkt.

Klinische symptomen en aanvullende parameters

Informatie over klinische symptomen, pleiocytose, en totale eiwit- en glucoseconcentraties in de liquor ten tijde van actieve ziekte werden opgevraagd uit het patiënten- en/of laboratoriuminformatiesysteem. Voor zekere en mogelijke LNB-patiënten werd ook informatie over symptoomduur en antibiotica-behandeling voor LNB opgevraagd.

Resultaten van de in-house *Borrelia*-species PCR en twee CXCL13-testen op liquor zijn eerder gerapporteerd [6]. Het huidige CXCL13-resultaat was gebaseerd op het gecombineerde resultaat van de twee CXCL13-testen: negatief als één of beide testen negatief waren, positief als beide testen positief waren.

Data-analyse

Voor afzonderlijke IgM- en IgG-testen zijn de totale Ig-resultaten gebaseerd op een combinatie van de resultaten van beide immunoglobulinen: negatief wanneer IgM en IgG negatief waren, en positief wanneer ten minste één daarvan positief was. Voor alle statistische analyses werd Rstudio (versie 1.4.1717) gebruikt [11]. De Fisher's exacttest werd gebruikt voor ongepaarde nominale data, de McNemar's chikwadraattest met continuïteitscorrectie werd gebruikt voor gepaarde nominale data, en de exacte Wilcoxon-Mann-Whitneytest werd gebruikt voor kwantitatieve ongepaarde data in een 2x2 tabel met behulp van het 'stats'-pakket [12]. Ongepaarde nominale data in een 2x4 tabel werden geanalyseerd met de approximate Monte Carlo (10^6 resampling) Pearson's chikwadraattest met behulp van het 'coin'-pakket [13]. Afhankelijk van de verdeling werd ofwel het (geometrisch) gemiddelde met 95 procent-betrouwbaarheidsintervallen (BI), ofwel de mediaan met bereik getoond. Een ruwe P-waarde < 0,050 werd als statistisch significant beschouwd, maar werd pas geïnterpreteerd na correctie voor alle statistische analyses in deze studie. Hiervoor werd de Benjamini-Hochberg (BH)-procedure toegepast [14]. De false-discovery rate (FDR) werd vastgesteld op 2,0 procent

en minder dan één fout-positief testresultaat was toegestaan in de lijst van afwijzingen. Voor elke antistof-test zijn de sensitiviteit, specificiteit, positief voorspellende (PVW) en negatief voorspellende waarde (NVW) met 95 procent BI berekend met het 'epiR'-pakket [15], waarbij alle zekere en mogelijke LNB-patiënten als 'casus', en alle niet-LNB-patiënten als 'controle' werden gedefinieerd.

Voor de multiparameteranalyse werd gebruikgemaakt van random-forest (RF)-modellering [16]. Per antistof-test werd een RF-model gebouwd met het 'randomForest'-pakket [17]. Elk RF-model bevatte 13 parameters, waarvan de eerste zes bestonden uit:

- (i) intrathecale *Borrelia*-specifieke antistofsynthese (normaal/pathologisch);
- (ii) tweestaps-serologie op serum (negatief/positief);
- (iii) pleiocytose (nee/ja);
- (iv) CXCL13 in liquor (negatief/positief);
- (v) verhoogd totaaleiwit in liquor (nee/ja);
- (vi) *Borrelia*-DNA in liquor (negatief/positief).

Bloed-liquorbarrièrefunctionaliteit en intrathecale totale antistofsynthese werden meegenomen in het RF-model door gebruik te maken van het Reibergram. Alle patiënten konden als volgt worden ingedeeld in een van de vier (van in totaal vijf) gebieden van het Reibergram: 107/156 patiënten in gebied 1 (normale bloed-liquorbarrière/geen intrathecale totale antistofsynthese); 25/156 patiënten in gebied 2 (verstoorde bloed-liquorbarrière/geen intrathecale totale antistofsynthese); 9/156 patiënten in gebied 3 (verstoorde bloed-liquorbarrière/wel intrathecale totale antistofsynthese); en 15/156 patiënten in gebied 4 (normale bloed-liquorbarrière/wel intrathecale totale antistofsynthese). Op basis van deze indeling werden de volgende zeven parameters voor in het RF-model geconstrueerd: (i) alle gebieden apart; (ii) gebied 1 versus de rest (elke afwijking van normaal); (iii) gebied 2 versus de rest (het effect van een verstoorde bloed-liquorbarrière); (iv) gebied 3 versus de rest (het effect van een verstoorde bloed-liquorbarrière met intrathecale totale antistofsynthese); (v) gebied 4 versus de rest (het effect van intrathecale totale antistofsynthese); (vi) gebied 2+3 versus 1+4 (het effect van een verstoorde bloed-liquorbarrière met/ zonder intrathecale totale antistofsynthese) en (vii) gebied 3+4 versus 1+2 (het effect van intrathecale

totale antistofsynthese met/ zonder een verstoorde bloed-liquorbarrière). Voor alle RF-modellen werden zekere en mogelijke LNB-patiënten gedefinieerd als 'casus' en alle niet-LNB-patiënten als 'controle'. De predicties uit elk RF-model werden gebruikt voor het maken van een receiver operating characteristic (ROC)-curve en het berekenen van de oppervlakte onder de curve (AUC). Voor elk RF-model werd de optimale afkapwaarde voor het voorspellen van LNB berekend aan de hand van het punt op de ROC-curve het dichtst bij de linkerbovenhoek, bepaald door de volgende formule:

$$\sqrt{((1-\text{gevoeligheid})^2 + (1-\text{specificiteit})^2)}$$

De optimale afkapwaarde werd gebruikt om de sensitiviteit, specificiteit, PVW en NVW van elk RF-model te berekenen. Er werden geen 95 procent BI's berekend aangezien de prestatiekenmerken gebaseerd zijn op voorspellingen. Voor elk RF-model werd de kans op misclassificatie en de relatieve bijdrage van elke parameter berekend [17], waarna de parameters gerangschikt werden van 1 (hoogste relatieve bijdrage) tot 13 (laagste relatieve bijdrage). Deze rangschikking werd vervolgens gebruikt voor het bepalen van de gemiddelde rangschikking om het belang van elke parameter te bepalen bij het voorspellen van LNB.

Resultaten

Studiepopulatie

In totaal werden 156 patiënten geïnccludeerd, van wie 150 afkomstig waren uit de vooraf gedefinieerde studieperiode, en zes buiten deze periode. Tien (6,4 procent) van de 156 patiënten werden geclassificeerd als zekere, en zeven (4,5 procent) als mogelijke LNB-patiënt (zie *tabel 2*). Vier (57,1 procent) van de zeven mogelijke LNB-patiënten hadden pleiocytose en drie (42,9 procent) hadden intrathecale *Borrelia*-specifieke antistofsynthese. De overige 139 patiënten (89,1 procent) werden ingedeeld als niet-LNB-patiënt. 39 (28,1 procent) van hen hadden klinische symptomen verdacht voor LNB, van wie 36 (92,3 procent) noch pleiocytose noch intrathecale *Borrelia*-specifieke antistofsynthese hadden; de overige drie (7,7 procent) patiënten hadden pleiocytose waarvoor een andere oorzaak werd gevonden dan LNB (zie *tabel 1* in ref [5]). 100 (71,9 procent) van de 139 niet-LNB-patiënten

Tabel 2. Overzicht van de demografische en klinische parameters voor de zekere LNB-, mogelijke LNB- en niet-LNB-patiënten.

Parameter ^a	Waarde voor de betreffende studiegroep ^b			Ruwe P-waarde voor BH vergelijking ^{b,e}		
	zLNB (n = 10) ^c	mLNB (n = 7) ^d	niet-LNB (n = 139)	zLNB vs mLNB	zLNB vs niet-LNB	mLNB vs niet-LNB
Geslacht (aantal mannen [procent])	7 (70,0)	5 (71,4)	66 (47,5)	1,000	0,203	0,266
Leeftijd (gemiddelde [95 procent BI]/[bereik])	61,2 (48,1-74,3)/(10,7-89,2)	54,1 (46,1-62,0)/(42,1-74,3)	51,8 (49,1-54,6)/(17,2-83,4)	0,133	0,063	0,740
Duur symptomen in dagen (geom. gemiddelde [95 procent BI]/[bereik]) ^f	26,3 (11,9-58,0)/(3,0-174)	51,9 (19,1-140)/(8,0-288)	64,1 (44,3-92,8)/(0,0-2911)	0,364	0,075	0,633
Pleiocytose						
Pleiocytose liquor ≥ 5 leukocyten/ μ L (n [procent])	10 (100)	4 (57,1)	22 (15,8)	0,051	< 0,001 ⁱ	0,019 ^g
Pleiocytose liquor/ μ L (geom. gemiddelde [95 procent BI]/[bereik])	76,7 (38,9-151)/(8,3-394)	6,7 (3,2-14,2)/(2,0-21,0)	1,1 (0,8-1,6)/(0,0-821)	< 0,001 ⁱ	< 0,001 ⁱ	0,001 ⁱ
Glucose gehalte in liquor in mmol/l (geom. gemiddelde [95 procent BI]/[bereik])	3,3 (2,9-3,7)/(2,3-5,1)	3,8 (3,6-4,1)/(3,5-4,6)	3,6 (3,5-3,7)/(1,0-7,7)	0,012 ^h	0,029 ^h	0,127
Totaaleiwit in liquor						
Verhoogd totaaleiwit (ja [procent]) ^g	6 (60,0)	0 (0,0)	10 (7,2)	0,035 ^h	< 0,001 ⁱ	1,000
Totaaleiwit in g/l (gemiddelde [95 procent BI]/[bereik])	940 (687-1190)/(430-1490)	461 (370-553)/(300-650)	450 (389-512)/(170-4280)	0,006 ^h	< 0,001 ⁱ	0,279
Positieve CXCL13-uitslag op liquor	9 (90,0)	1 (14,3)	2 (1,4)	0,004 ^h	< 0,001 ⁱ	0,138
Positieve <i>Barrelia</i> -species PCR-uitslag op liquor	2 (20,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,485	0,004 ^h	1,000
C6 ELISA (serum)	10 (100)	7 (100)	38 (27,3)	1,000	< 0,001 ⁱ	< 0,001 ⁱ
Tweestapsserologie (serum)^h						
<i>Barrelia</i> -specifiek IgM (n [procent])	3 (30,0)	3 (42,9)	5 (3,6)	0,644	0,010 ^h	0,003 ⁱ
<i>Barrelia</i> -specifiek IgG (rev) ^h (n [procent])	9 (90,0)	6 (85,7)	29 (20,9) ^h	1,000	< 0,001 ⁱ	< 0,001 ⁱ
<i>Barrelia</i> -specifiek IgG (oud) ^h (n [procent])			27 (19,4)	1,000	< 0,001 ⁱ	< 0,001 ⁱ
<i>Barrelia</i> -specifiek IgM en/of IgG (rev) ^h (n [procent])	9 (90,0)	6 (85,7)	31 (22,3) ^h	1,000	< 0,001 ⁱ	0,001 ⁱ
<i>Barrelia</i> -specifiek IgM en/of IgG (oud) ^h (n [procent])			29 (20,9)	1,000	< 0,001 ⁱ	< 0,001 ⁱ
Albumine						
Verstoorde bloed-liquorbarrière (n [procent])	9 (90,0)	3 (42,9)	22 (15,8)	0,101	< 0,001 ⁱ	0,097
Q albumine (gemiddelde $\times 10^{-2}$ [95 procent BI]/[bereik])	13,6 (9,9-17,2)/(5,7-24,2)	7,0 (4,7-9,3)/(3,7-12,5)	6,1 (5,1-7,2)/(1,1-72,3)	0,019 ^h	< 0,001 ⁱ	0,188
Intrathecale totale antistofsyntheseⁱ						
Intrathecale totale IgM (n [procent])	7 (70,0)	3 (42,9)	7 (5,0)	0,350	< 0,001 ⁱ	0,007 ⁱ
Intrathecale totale IgG (n [procent])	5 (50,0)	0 (0,0)	9 (6,5)	0,044 ^h	< 0,001 ⁱ	1,000
Intrathecale totale IgM en/of IgG (n [procent])	7 (70,0)	3 (42,9)	14 (10,1)	0,350	< 0,001 ⁱ	0,035 ^h

- a. BI = bereikbaarheidsinterval; geom = geometrisch; CXCL13, B-cell chemokine (C-X-C motief) ligand 13; Q = quotiënt.
- b. Patiënten zijn ingedeeld als zekere Lyme neuroborreliose (zLNB), mogelijke LNB (mLNB), of niet-LNB patiënt volgens de EFNS richtlijnen [2] en consensusstrategie zoals beschreven in de materiaal en methode.
- c. 6/10 (60,0 procent) zekere LNB-patiënten kwamen uit de vooraf vastgestelde studieperiode (augustus 2013 - juni 2016), 4/10 (40,0 procent) kwamen van buiten deze periode, zie ook *tabel S2* in ref [5].
- d. 5/7 (71,4 procent) mogelijke LNB-patiënten kwamen uit de vooraf vastgestelde studieperiode (augustus 2013 - juni 2016), 2/7 (28,6 procent) kwamen van buiten deze periode, zie ook *tabel S2* in ref [5].
- e. BH = Benjamini-Hochberg.
- f. Duur van de symptomen in dagen voor zekere en mogelijke LNB-patiënten is ook opgenomen in *tabel S2* in ref [5].
- g. Een verhoogde totale eiwitconcentratie in de liquor is leeftijdsafhankelijk (referentiebereik: 150 tot 300 mg/ml voor leeftijden ≤ 10 jaar, 200 tot 500 mg/ml voor leeftijden tussen 10 en 40 jaar, en 250 tot 800 mg/ml voor leeftijden > 40 jaar [30]).
- h. De tweestapsserologie op serum is uitgevoerd met de C6 ELISA als screeningstest, waarbij positieve (en dubieuze) C6 ELISA-resultaten zijn bevestigd met de recomLine IgM en IgG immunoblot (IB). De fabrikant van de recomLine IB heeft de interpretatie van de recomLine IgG IB in januari 2019 herzien door de score van de VISE-band met één punt te verhogen van 5 naar 6, en wat effect had op het testresultaat (*tabel 1*). Voor twee niet-LNB-patiënten veranderde het recomLine IgG IB resultaat van negatief naar dubieus (dubieuze resultaten werden positief gescoord), zie ook *tabel S2* in ref [5]. Dientengevolge worden zowel de resultaten getoond van de herziene (rev) als van de oude interpretatiecriteria.
- i. Intrathecale totale IgM- en/of totale IgG-synthese is bewezen als de intrathecale fractie groter is dan 10 procent, zoals beschreven door Reiber [7].
- j. Significante P-waarde na toepassing van de Benjamini-Hochberg-procedure (FDR $\leq 2,0$ procent).
- k. Niet-significante P-waarde na toepassing van de Benjamini-Hochberg-procedure (FDR $> 2,0$ procent).

hadden geen klinische symptomen wijzend op LNB. 81 van hen hadden noch pleiocytose noch intrathecale *Borrelia*-specifieke antistofsynthese; de overige 19 niet-LNB-patiënten hadden alleen pleiocytose. *Tabel 2* geeft een gedetailleerd overzicht van de demografische kenmerken en klinische parameters van de studiepopulatie.

Borrelia-specifieke antistoffen in serum

Alle zekere en mogelijke LNB-patiënten hadden een positieve (of dubieuze) C6 ELISA-uitslag, en dit was significant hoger dan bij niet-LNB-patiënten (zie *tabel 2*). Na IB-confirmatie waren de percentages positieve testuitslagen voor IgM, IgG, of totaal Ig bij zekere en mogelijke LNB-patiënten vergelijkbaar en significant hoger dan bij niet-LNB-patiënten. Uitzondering hierop was het percentage positieve IgM-testuitslagen tussen zekere LNB- en niet-LNB-patiënten.

Bloed-liquorbarrièrefunctionaliteit en intrathecale totale antistofsynthese

Een verstoorde bloed-liquorbarrière werd vaker gevonden bij zekere dan bij mogelijke LNB-patiënten en significant vaker dan bij niet-LNB-patiënten (zie *tabel 2*). Intrathecale totale antistofsynthese was bij zekere LNB-patiënten gebaseerd op een IgM-respons met of zonder IgG, bij mogelijke LNB-patiënten op een solitaire IgM-respons, en bij niet-LNB-patiënten op een IgM- en/of IgG-respons (zie *tabel S2* in ref [5]). Een intrathecale totale IgM-respons werd significant vaker gevonden bij zekere en mogelijke LNB-patiënten dan bij niet-LNB-patiënten (zie *tabel 2*). Een intrathecale totale IgG-respons – met of zonder IgM – kwam vaker voor bij zekere dan bij mogelijke LNB-patiënten en significant vaker dan bij niet-LNB-patiënten (zie *tabel 2*).

Intrathecale Borrelia-specifieke antistofsynthese

Het percentage pathologische AI-waarden voor *Borrelia*-specifiek IgM, IgG of totaal Ig voor de vijf liquor-serumtesten was bij zekere LNB-patiënten significant hoger dan bij niet-LNB-patiënten (zie *tabel 3*). De meeste van deze percentages waren ook hoger bij mogelijke LNB-patiënten dan bij niet-LNB-patiënten, en dit was significant voor *Borrelia*-specifiek IgG en totaal Ig, behalve voor de IDEIA. Het percentage positieve AI-resultaten voor *Borrelia*-specifiek IgM was alleen significant hoger bij gebruik van de Enzygnost IgM ELISA. Alle zekere LNB-patiënten, en alle

mogelijke LNB-patiënten zonder pleiocytose ($n = 3$) hadden een pathologische *Borrelia*-specifieke IgG AI-waarde met of zonder een pathologische *Borrelia*-specifieke IgM AI-waarde (zie *tabel S2* in ref [5]). Van de mogelijke LNB-patiënten met pleiocytose ($n = 4$) hadden er twee een pathologische *Borrelia*-specifieke IgM AI-waarde in één of twee van de liquor-serumtesten. 12 (8,6 procent) van de 139 niet-LNB-patiënten hadden een pathologische *Borrelia*-specifieke IgM en/of IgG AI-waarde in één ($n = 10$) of twee ($n = 2$) van de liquor-serumtesten (zie *tabel S2* in ref [5]).

Borrelia-specifieke antistoffen in liquor

Alle zekere LNB-patiënten en het merendeel van de mogelijke LNB-patiënten hadden significant vaker een positieve C6 ELISA-uitslag op de liquor dan niet-LNB-patiënten (zie *tabel 3*). Met de *recomLine* IB werd geen IgM in de liquor gedetecteerd, en IgG *recomLine* IB-positiviteit kwam vaker voor bij zekere dan bij mogelijke LNB-patiënten, en significant vaker dan bij niet-LNB-patiënten (zie *tabel 3*).

Borrelia-specifieke IgM en IgG in liquor vs serum

Borrelia-specifieke antistoffen in liquor zijn geen direct bewijs voor intrathecale antistofproductie, maar kunnen ook verklaard worden door passieve diffusie vanuit het bloed. Het percentage C6 ELISA-positieven in liquor bij zekere LNB-patiënten verschilde niet van die in serum (100 procent [10/10], beide; zie *tabel S2* in ref [5]). Bij mogelijke LNB-patiënten was het percentage C6 ELISA-positieven in liquor ook vergelijkbaar met die in serum (85,7 procent [6/7] respectievelijk 100 procent [7/7], $P = 1,000$). Bij niet-LNB-patiënten was het percentage C6 ELISA-positieven in liquor echter significant lager dan in serum (3,6 procent [5/139] respectievelijk 27,3 procent [38/139], $P < 0,001$ [FDR $\leq 2,0$ procent]).

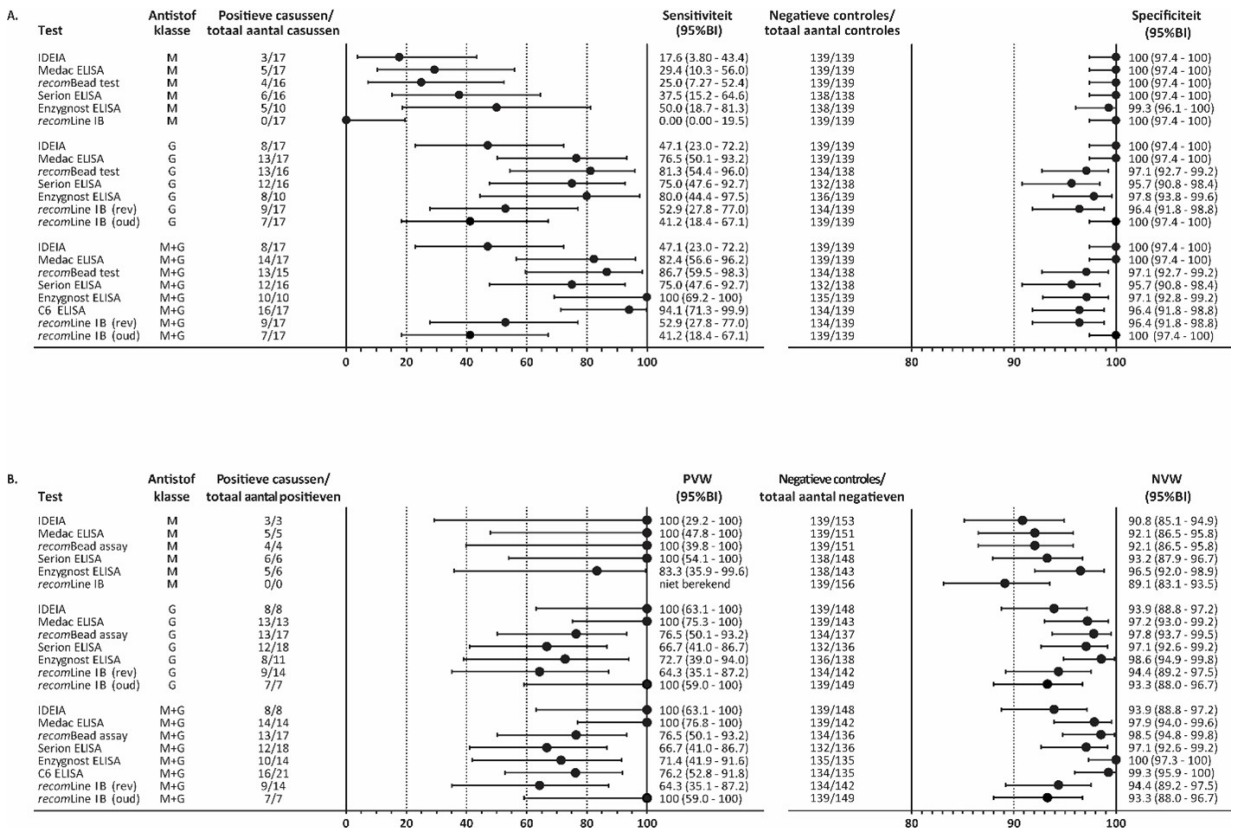
Het percentage *recomLine* IB-positieven in liquor op basis van totaal Ig was bij zekere LNB-patiënten vergelijkbaar met die in serum (80,0 procent [8/10] respectievelijk 90 procent [9/10]), $P = 1,000$ (zie *tabel S2* in ref [5]). Bij mogelijke LNB-patiënten was dit percentage in liquor lager dan in serum (14,3 procent [1/7] respectievelijk 85,7 procent [6/7], $P = 0,074$). Bij niet-LNB-patiënten was de totale Ig *recomLine* IB-positiviteit in liquor significant lager dan in serum (3,6 procent [5/139] respectievelijk 25,2 procent [35/139], $P < 0,001$ [FDR $\leq 2,0$ procent]).

Tabel 3. Resultaten van de vijf liquor-serumtesten en de twee liquortesten voor de zekere LNB-, mogelijke LNB- en niet-LNB-patiënten.

Test	Antistofklasse	Aantal patiënten met een positief testresultaat per totaal (procent) voor de desbetreffende studiegroep ^a			Ruwe P-waarde voor BH vergelijking ^{a,d}		
		zLNB (n = 10) ^b	mLNB (n = 7) ^c	niet-LNB (n = 139)	zLNB vs mLNB	mLNB vs niet-LNB	mLNB vs niet-LNB
IDEIA	IgM	2/10 (20,0)	1/7 (14,3)	0/139 (0,0)	1,000	0,004 ⁱ	0,048 ^j
	IgG	7/10 (70,0)	1/7 (14,3)	0/139 (0,0)	0,050	< 0,001 ⁱ	0,048 ^j
	IgM en/of IgG	7/10 (70,0)	1/7 (14,3)	0/139 (0,0)	0,050	< 0,001 ⁱ	0,048 ^j
Medac ELISA	IgM	4/10 (40,0)	1/7 (14,3)	0/139 (0,0)	0,338	< 0,001 ⁱ	0,048 ^j
	IgG	10/10 (100)	3/7 (42,9)	0/139 (0,0)	0,015 ⁱ	< 0,001 ⁱ	< 0,001 ⁱ
	IgM en/of IgG	10/10 (100)	4/7 (57,1)	0/139 (0,0)	0,051	< 0,001 ⁱ	< 0,001 ⁱ
recomBead-test ^e	IgM	4/10 (40,0)	0/6 (0,0) ^e	0/139 (0,0)	0,234	< 0,001 ⁱ	1,000
	IgG	10/10 (100)	3/6 (50,0) ^e	4/138 (2,9) ^e	0,036 ⁱ	< 0,001 ⁱ	0,001 ⁱ
	IgM en/of IgG	10/10 (100)	3/5 (60,0) ^e	4/138 (2,9) ^e	0,095	< 0,001 ⁱ	< 0,001 ⁱ
Serion ELISA ^f	IgM	5/9 (55,6) ^f	1/7 (14,3)	0/138 (0,0) ^f	0,145	< 0,001 ⁱ	0,048 ^j
	IgG	9/9 (100) ^f	3/7 (42,9)	6/138 (4,3) ^f	0,019 ^j	< 0,001 ⁱ	0,005 ^j
	IgM en/of IgG	9/9 (100) ^f	3/7 (42,9)	6/138 (4,3) ^f	0,019 ^j	< 0,001 ⁱ	0,005 ^j
Enzygnost ELISA ^g	IgM	3/5 (60,0) ^g	2/5 (40,0) ^g	1/139 (0,7)	1,000	< 0,001 ⁱ	0,003 ^j
	IgG	5/5 (100) ^g	3/5 (60,0) ^g	3/139 (2,2)	0,444	< 0,001 ⁱ	< 0,001 ⁱ
	IgM en/of IgG	5/5 (100) ^g	5/5 (100) ^g	4/139 (2,9)	1,000	< 0,001 ⁱ	< 0,001 ⁱ
C6 ELISA	IgM en/of IgG	10/10 (100)	6/7 (85,7)	5/139 (3,6)	0,412	< 0,001 ⁱ	< 0,001 ⁱ
recomLine IB ^h	IgM	0/10 (0,0)	0/7(0,0)	0/139 (0,0)	1,000	1,000	1,000
	IgG (rev) ^h	8/10 (80,0) ^h	1/7 (14,3) ^h	5/139 (3,6) ^h	0,015 ^j	< 0,001 ⁱ	0,259
	IgG (oud) ^h	7/10 (70,0)	0/7 (0,0)	0/139 (0,0)	0,010 ^j	< 0,001 ⁱ	1,000
	IgM en/of IgG (rev) ^h	8/10 (80,0) ^h	1/7 (14,3) ^h	5/139 (3,6) ^h	0,015 ^j	< 0,001 ⁱ	0,259
	IgM en/of IgG (oud) ^h	7/10 (70,0)	0/7 (0,0)	0/139 (0,0)	0,010 ^j	< 0,001 ⁱ	1,000

- a. Patiënten zijn ingedeeld als zekere Lyme neuroborreliose (zLNB), mogelijke LNB (mLNB), of niet-LNB patiënt volgens de EFNS richtlijnen [2] en consensusstrategie zoals beschreven in de materiaal en methode.
- b. 6/10 (60,0 procent) zekere LNB-patiënten kwamen uit de vooraf vastgestelde studieperiode (augustus 2013 - juni 2016), 4/10 (40,0 procent) kwamen van buiten deze periode, zie ook *tabel S2* in ref [5].
- c. 7/7 (71,4 procent) mogelijke LNB-patiënten kwamen uit de vooraf vastgestelde studieperiode (augustus 2013 - juni 2016), 2/7 (28,6 procent) kwamen van buiten deze periode, zie ook *tabel S2* in ref [5].
- d. BH = Benjamini-Hochberg.
- e. Voor drie patiënten kon ofwel de IgM AI-waarde (één mLNB-patiënt) ofwel de IgG AI-waarde (één mLNB- en één niet-LNB-patiënt) niet met de *recomBead*-test worden bepaald wegens onvoldoende materiaal.
- f. Voor twee patiënten, één zLNB- en één niet-LNB-patiënt, konden de IgM- en IgG AI-waarden niet met de Serion ELISA worden bepaald wegens onvoldoende materiaal.
- g. Voor zeven patiënten, vijf zLNB- en twee mLNB-patiënten, konden de IgM- en IgG-AI-waarden niet worden bepaald met de Enzygnost ELISA, omdat de ELISA uit de handel werd genomen.
- h. De fabrikant van de *recomLine* immunoblot (IB) heeft de interpretatie van de *recomLine* IgG IB in januari 2019 herzien door de score van de VisE-band met één punt te verhogen van 5 naar 6, en wat effect had op het testresultaat (*tabel 1*). Voor zeven patiënten, één zLNB, één mLNB en vijf niet-LNB-patiënten, veranderde het *recomLine* IgG IB resultaat van negatief naar dubieus (dubieuze resultaten werden positief gescoord), zie ook *tabel S2* in ref [5]. Dientengevolge worden zowel de resultaten getoond van de herziene (rev) als van de oude interpretatiecriteria.
- i. Significante P-waarde na toepassing van de Benjamini-Hochberg-procedure (FDR ≤ 2,0 procent).
- j. Niet-significante P-waarde na toepassing van de Benjamini-Hochberg-procedure (FDR > 2,0 procent).

Figuur 1. Overzicht van de sensitiviteit en specificiteit (A) en de positieve (PVW) en negatieve voorspellende waarde (NVW) (B) en 95 procent betrouwbaarheidsintervallen (BI's) van de vijf antistoftesten op liquor-serumparen en de twee antistoftesten op liquor voor IgM (M), IgG (G), of IgM en IgG gecombineerd (M+G).



Casussen bestonden uit zekere en mogelijke LNB-patiënten, en controles bestonden uit niet-LNB-patiënten. De positieve casussen per totaal aantal casussen (A) zijn gebaseerd op het aantal pathologische AI-waarden (liquor-serumtesten) of positieve testuitslagen (liquortesten) onder alle casussen en zijn gebruikt om de sensitiviteit te berekenen. De negatieve controles per totaal aantal controles (A) zijn gebaseerd op het aantal normale AI-waarden (liquor-serumtesten) of negatieve testuitslagen (liquortesten) onder alle controles en zijn gebruikt om de specificiteit te berekenen. De positieve casussen (B) zijn casussen met een pathologische AI-waarde (liquor-serumtesten) of een positieve testuitslag (liquortesten) per totaal aantal positieven (d.w.z. alle patiënten [casussen + controles] met een pathologische AI-waarde [liquor-serumtesten] of een positieve testuitslag [liquortesten]). De negatieve controles (B) zijn controles die een normale AI-waarde (liquor-serumtesten) of een negatieve testuitslag (liquortesten) hebben per totaal aantal negatieven (d.w.z. alle patiënten [casussen + controles] met een normale AI-waarde [liquor-serumtesten] of een negatieve testuitslag [liquortesten]). De fabrikant van de *recomLine* immunoblot (IB) heeft de interpretatie van de *recomLine* IgG IB in januari 2019 herzien door de score van de VisE-band met één punt te verhogen van 5 naar 6, en wat effect had op het testresultaat (zie tabel 1 en 3). Dientengevolge worden zowel de resultaten getoond van de herziene (rev) als van de oude interpretatiecriteria. Voor de *recomLine* IgM IB kon de PVW niet worden berekend omdat er bij deze test geen positieve uitslagen waren.

Diagnostische prestaties van de zeven antistof-testen

De IgM-sensitiviteit varieerde van 0,0 tot 50,0 procent, die van IgG van 47,1 tot 81,3 procent en de totale Ig-sensitiviteit was vergelijkbaar met die van IgG (bereik: 47,1-100 procent, zie *figuur 1A*). Voor de Medac en Enzygnost ELISA's was de totale Ig-sensitiviteit iets hoger dan die voor IgG, wat werd verklaard door een solitaire IgM-respons bij twee mogelijke LNB-patiënten in één, respectievelijk beide liquor-serumtesten (zie *tabel S2* in ref [5]). De totale Ig-sensitiviteit van de *recomBead*-test was ook iets hoger dan die voor IgG, wat werd verklaard door het ontbreken van een IgM-resultaat voor één mogelijke LNB-patiënt wegens onvoldoende materiaal (zie *tabel S2* in ref [5]).

De IgM- en IgG-specificiteit was hoog (99,3 tot 100 procent respectievelijk 95,7 tot 100 procent, zie *figuur 1A*). De totale Ig-specificiteit was identiek aan die van IgG, met uitzondering van de Enzygnost ELISA, die iets lager was door een solitaire IgM-respons bij één niet-LNB-patiënt (zie *tabel S2* in ref [5]).

De sensitiviteit en specificiteit van de C6 ELISA waren respectievelijk 94,1 en 96,4 procent. De overlap van de 95 procent BI's bij zowel IgM, IgG als totaal Ig toonde aan dat er geen verschil was tussen de zeven antistof-testen voor wat betreft sensitiviteit en specificiteit (zie *figuur 1A*).

Potentiële rol van aanvullende parameters voor de diagnostiek van LNB

RF-modellering toonde aan dat de zeven antistof-testspecifieke RF-modellen vergelijkbaar hoog presteerden getuige de hoge AUC-waarden (zie *tabel 4A*, *pagina 26*). Kans op misclassificatie van patiënten varieerde van 3,4 procent tot 7,1 procent. De sensitiviteit en NVW van de meeste RF-modellen lagen boven de bovengrens van de respectievelijke BI's van de antistof-testen, behalve voor die van de C6- en Enzygnost ELISA (zie *tabel 4A*, *figuur 1A en 1B*). De specificiteit en PVW van de meeste RF-modellen waren vergelijkbaar met die van de antistof-testen, behalve voor de IDEIA en de Medac ELISA, waarvoor de specificiteit en PVW van het RF-model onder de ondergrens van respectievelijk 95 procent BI's van de antistof-testen lagen.

Voor elk RF-model werd de relatieve bijdrage van de parameters gevisualiseerd in een heat map (zie *tabel 4B*). Opvallend was dat de onderzochte parameters in elk RF-model vergelijkbaar waren gerangschikt. De

belangrijkste parameter voor het voorspellen van LNB was de aanwezigheid van intrathecaal geproduceerde *Borrelia*-specifieke antistoffen, gevolgd door *Borrelia*-specifieke serumantistoffen en CXCL13 in de liquor. Van alle op het Reibergram gebaseerde parameters bleek een verstoorde bloed-liquorbarrière met intrathecale totale antistofsynthese (Reibergram-gebied 3) het meeste bij te dragen.

Discussie

In deze studie zijn de prestaties van zeven antistof-testen voor LNB-diagnostiek geëvalueerd op een goed gedefinieerde studiepopulatie. Van alle onderzochte prestatiekenmerken (sensitiviteit, specificiteit, PVW en NVW) liet de sensitiviteit van de zeven antistof-testen voor de diagnose van LNB de grootste variatie zien, hoewel dit niet significant was. Antigeenvariatie tussen de testen kan ten grondslag liggen aan een verschil in sensitiviteit [18]. Daarnaast kunnen antigenen van de infecterende stam verschillen van de gebruikte antigenen in de test, kunnen antigenen op verschillende tijdstippen tot expressie komen en/of onderhevig zijn aan antigene variatie [19,20]. Het percentage positieve uitslagen bij antistof-testen gebaseerd op meerdere antigenen of cellysaten zal naar verwachting hoger zijn dan die van testen gebaseerd op slechts één of een beperkt aantal antigenen. Dit was ook zichtbaar in de huidige studie waarbij de sensitiviteit van de IDEIA, gebaseerd op het p41-antigeen, het laagst was en die van de Enzygnost ELISA, gebaseerd op een cellysaat, het hoogst. Daarnaast is het bekend dat de IDEIA een lage sensitiviteit heeft in de vroege fase van een infectie, die kan oplopen tot 100 procent bij langere ziekteduur [8]. De keuze tussen het gebruik van testen gebaseerd op hele cellysaten of testen gebaseerd op één - of een aantal - specifieke (recombinante) antigenen hangt af van de gewenste balans tussen sensitiviteit en specificiteit. Bij streven naar minimalisatie van fout-positieven (lees: hoge PVW), is een test met hoge specificiteit, bij voorkeur gebaseerd op één - of een aantal - specifieke (recombinante) antigenen, aan te bevelen. Om te voorkomen dat actieve LNB-patiënten worden gemist (lees: hoge NVW) gaat de voorkeur uit naar een test met een hoge sensitiviteit. In dit geval geniet een test op basis van hele cellysaten - of meerdere (recombinante) antigenen - de voorkeur, aangezien een groter aantal verschillende antigenen de kans op een positief testresultaat vergroot. De pre-

Tabel 4. De prestatiekenmerken van de zeven antistoftesten en de 12 extra parameters middels random forest-modellering (A) en de relatieve bijdrage van alle geteste parameters (B) voor de predictie van Lyme neuroborreliose.

A						B													
Waarden van de prestatiekenmerken van de antistoftest-specifieke RF-modellen						Relatieve bijdrage van elke van de parameter in elk van de antistoftest-specifieke RF-modellen ^a													
Antistof-test	Oppervlakte onder de curve	Kans op misclassificatie	Sensitiviteit	Specificiteit	Positief voorspellende waarde	Negatief voorspellende waarde	Antistof-test	2-staps serologie (serum) ^b	CXCL13 (liquor)	Reibergram; gebied 3 ^d	Pleocyotose	Reibergram; alle gebieden afzonderlijk ^d	Reibergram; gebied 3+4 ^d	Reibergram; gebied 1 ^d	Reibergram; gebied 2+3 ^d	Reibergram; gebied 4 ^d	Totaal eiwit (liquor)	Reibergram; gebied 2 ^d	Borrelia spp PCR (liquor)
IDEIA	0.973	7.1	94.1	92.8	61.5	99.2	211	204	174	146	125	95	81	60	63	58	43	28	27
Medac ELISA	0.991	5.1	100	94.2	68.0	100	354	173	141	115	123	74	60	55	46	40	40	10	28
recomBead test	0.993	4.6	100	94.9	68.2	100	303	157	170	131	91	126	82	115	78	63	47	43	28
Serion ELISA	0.986	5.2	100	94.2	66.7	100	250	178	191	118	137	101	64	92	72	52	18	37	33
Enzygnost ELISA	0.986	3.4	100	96.4	66.7	100	250	111	88	123	41	85	68	61	56	39	-29	32	0
C6 ELISA	0.987	4.5	94.1	95.7	72.7	99.3	318	145	153	115	139	108	78	90	59	55	28	18	27
recomLine IB (rev) ^e	0.970	7.1	94.1	92.8	61.5	99.2	94	231	197	145	148	99	89	69	62	65	71	18	27
recomLine IB (oud) ^e	0.972	7.1	94.1	92.8	61.5	99.2	174	217	179	147	128	99	86	65	63	64	43	27	27
Gemiddelde rangschikking/parameter	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt	nvt	1.7	2.4	2.6	4.1	5.1	5.6	7.4	7.6	8.9	10.1	11.0	12.1	12.3

- a. Elk random forest (RF) model is gebaseerd op de volgende 13 parameters (B): (i) de desbetreffende antistoftest voor de bepaling van intrathecale *Borrelia*-specifieke antistofsynthese, (ii) tweestaps-serologie op serum, (iii) CXCL13 in de liquor, (iv) pleiocyotose, (v) totaaleiwit in liquor, (vi) *Borrelia* species PCR op liquor, en zeven variabelen gebaseerd op één of meerdere gebieden van het Reibergram zoals beschreven in de materiaal en methode.
- b. De relatieve bijdrage van elke parameter is berekend zoals beschreven door Liaw en Wiener [17] en is weergegeven door middel van een hittemap (hoogste waarden zijn donkeroranje, laagste waarden zijn diepblauw).
- c. De tweestaps-serologie op serum is uitgevoerd met de C6 ELISA als screeningstest, waarbij positieve (en dubieuze) C6 ELISA-resultaten zijn bevestigd met de *recomLine* IgM en IgG immunoblot (IB). De *recomLine* IB-uitslagen die gebruikt zijn voor de tweestaps-serologie zijn gebaseerd op de herziene interpretatiecriteria van de *recomLine* IgG IB (zie tabel 1, 2).
- d. Voor elk RF-model werd de bijdrage van de Reibergramclassificatie beoordeeld zoals beschreven in de materiaal en methode.
- e. Voor elk RF-model werden de 13 parameters gerangschikt op basis van hun relatieve bijdrage aan de predictie van LNB van 1 (hoogste bijdrage) tot 13 (laagste bijdrage). De gemiddelde rangschikking van elke parameter werd berekend aan de hand van de individuele rangschikking in elk van de zeven RF-modellen. NB: het RF-model van de *recomLine* IgG IB-resultaten gebaseerd op de oude interpretatiecriteria is niet meegenomen bij het bepalen van de gemiddelde rangschikking.
- f. De fabrikant van de *recomLine* IB heeft de interpretatie van de *recomLine* IgG IB in januari 2019 herzien door de score van de VIsE-band met één punt te verhogen met één punt te verhogen van 5 naar 6, en wat effect had op het testresultaat (zie tabel 1, 2 en 3). Dientengevolge worden zowel de resultaten getoond van de herziene (rev) als van de oude interpretatiecriteria.

valentie van LNB speelt hierbij ook een belangrijke rol. Met een testsensitiviteit van 95 procent bestaat de kans dat 5 procent van de LNB-patiënten wordt gemist. Bij een geschatte LNB-prevalentie in Nederland van 0,26 procent [3], is het risico om een actieve LNB-patiënt

over het hoofd te zien zeer klein (5 procent \times 0,26 procent = 0,013 procent). Bijgevolg zou de NVW boven de 99 procent liggen, zelfs als de prevalentie van LNB zo'n 100 maal hoger zou liggen [21]. Voor de meeste antistoftesten was de sensitiviteit lager dan 100

procent, wat verklaard kan worden door het feit dat naast zekere, ook mogelijke LNB-patiënten als casus werden beschouwd. Vanuit klinisch oogpunt verdient dit de voorkeur zodat er geen LNB-patiënten worden gemist.

Pathologische AI-waarden bij niet-LNB-patiënten werden met name gevonden bij de IgG liquor-serumtesten die gebruikmaken van cellysaten. Pathologische AI-waarden bij niet-LNB-patiënten kunnen verklaard worden door de aanwezigheid van persisterende antistoffen na een doorgemaakte LNB of kruisreactieve antigenen [20,22]. Twee niet-LNB-patiënten, beide bekend met neurosyfilis, hadden een pathologische AI-waarde in ofwel de Serion IgG, ofwel de Enzygnost IgG ELISA, waarschijnlijk veroorzaakt door kruisreagerende *Treponema*-antistoffen [23]. Aangezien geen van de overige niet-LNB-patiënten met een pathologische AI-waarde pleiocytose en passende kliniek had, werd een actieve LNB-infectie onwaarschijnlijk geacht [24].

Het gebruik van een liquor-serumtest en de berekening van een AI-waarde is ingewikkeld. Een antistoftest op alleen liquor als bewijs voor intrathecale *Borrelia*-specifieke antistofsynthese zou derhalve de voorkeur genieten. Positieve uitslagen van dergelijke testen zijn echter lastig te interpreteren aangezien de aanwezigheid van antistoffen in de liquor verklaard kan worden door intrathecale synthese, passieve diffusie vanuit het bloed of een traumatische liquorpunctie. De C6 ELISA-resultaten op liquor in de huidige studie zijn veelbelovend en laten zien dat een test op alleen liquor van toegevoegde waarde kan zijn, zeker als de NVW heel hoog is. Positieve testuitslagen op alleen liquor zouden echter wel bevestigd moeten worden met een liquor-serumtest die rekening houdt met de bloed-liquorbarrièrefunctionaliteit en een polyspecifieke immuunrespons [4].

In de huidige studie blijkt dat LNB-diagnostiek verbeterd kan worden als er naar meerdere parameters wordt gekeken. Met name de tweestaps-serologie op serum, CXCL13 in de liquor, een verstoorde bloed-liquorbarrière in combinatie met intrathecale totale antistofsynthese (Reibergram-gebied 3) en pleiocytose zijn van toegevoegde waarde. Het meenemen van deze parameters verhoogt de sensitiviteit en NVW, maar gaat wel ten koste van de specificiteit en PVW. In de klinische praktijk zal echter de voorkeur worden gegeven aan over- versus onderbehandeling van LNB-

patiënten. Om onderbehandeling zoveel mogelijk te beperken, genieten antistoffen met een hoge NVW de voorkeur. Daarnaast toont de huidige studie de toegevoegde waarde van het gebruik van meerdere parameters in combinatie met een op Reiber gebaseerde liquor-serumtest, aangezien de NVW voor dergelijke combinaties het hoogst was. De resultaten van de multiparameteranalyse zijn veelbelovend en bieden de mogelijkheid voor het ontwikkelen van een diagnostisch algoritme voor LNB.

Concluderend wordt aangetoond dat de volgende vijf parameters (in afnemende volgorde van belangrijkheid) ten goede komen aan LNB-diagnostiek:

- (i) detectie van intrathecaal geproduceerde *Borrelia*-specifieke antistoffen;
- (ii) tweestaps-serologie op serum;
- (iii) CXCL13-concentratie in liquor;
- (iv) Reibergramclassificatie;
- (v) pleiocytose.

Een gezamenlijke prospectieve studie wordt voorgesteld om te onderzoeken of het mogelijk is om een gestandaardiseerd diagnostisch algoritme te ontwikkelen ter verbetering van LNB-diagnostiek.

Referenties

1. Steere AC, Strle F, Wormser GP, et al. Lyme borreliosis. Nat Rev Dis Primers. 2016;2:16090.
2. Mygland A, Ljostad U, Fingerle V, Rupprecht T, Schmutzhard E, Steiner I. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. Eur J Neurol. 2010;17:8-4.
3. 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.
4. Reiber H, Peter JB. 2001. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. J Neurol Sci. 2001;184:101-22.
5. van Gorkom T, Voet W, van Arkel GHJ, et al. Retrospective Evaluation of Various Serological Assays and Multiple Parameters for Optimal Diagnosis of Lyme Neuroborreliosis in a Routine Clinical Setting. Microbiol Spectr. 2022;10:e0006122.
6. van Gorkom T, van Arkel GHJ, Heron M, Voet W, Thijsen SFT, Kremer K. The Usefulness of Two CXCL13 Assays on Cerebrospinal Fluid for the Diagnosis of Lyme Neuroborreliosis: a Retrospective Study in a Routine Clinical Setting. J Clin Microbiol. 2021;59:e0025521.
7. Reiber H. External quality assessment in clinical neurochemistry: survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/serum quotients. Clin Chem. 1995;41:256-63.
8. Hansen K, Lebech AM. Lyme neuroborreliosis: a new sensitive diagnostic assay for intrathecal synthesis of *Borrelia burgdorferi*-specific immunoglobulin G, A, and M. Ann Neurol. 1991;30:197-205.

9. Reiber H. Knowledge-base for interpretation of cerebrospinal fluid data patterns. *Essentials in neurology and psychiatry*. Arq Neuropsychiatr. 2016;74:501-12.
10. Kwaliteitsinstituut voor de Gezondheidszorg (CBO). 2013. Dutch guidelines Lyme disease 2013. Available at [In Dutch]: <https://www.rivm.nl/nieuws/cbo-richtlijn-lymeziekte-definitief>.
11. RStudio. Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA, USA. <https://www.rstudio.com>.
12. R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
13. Hothorn T, Hornik K, van de Wiel MA, Zeileis A. Implementing a Class of Permutation Tests: The coin Package. *Journal of Statistical Software* 2008;28:23.
14. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*. 1995;57:289-300.
15. R documentation. Tools for the Analysis of Epidemiological Data. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.rdocumentation.org/packages/epiR/versions/2.0.19>.
16. Breiman L. Random Forests. *Machine Learning* 2001;45:5-32.
17. Liaw A, Wiener M. Classification and regression by randomForest. *R news*. 2002;2:18-22. doi:<https://CRAN.R-project.org/doc/Rnews/>.
18. Stanek G, Lusa L, Ogrinc K, Markowicz M, Strle F. Intrathecally produced IgG and IgM antibodies to recombinant VlsE, VlsE peptide, recombinant OspC and whole cell extracts in the diagnosis of Lyme neuroborreliosis. *Med Microbiol Immunol*. 2014;203:125-32.
19. Roessler D, Hauser U, Wilske B. Heterogeneity of BmpA (P39) among European isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and influence of interspecies variability on serodiagnosis. *J Clin Microbiol*. 1997;35:2752-8.
20. Talagrand-Reboul E, Raffetin A, Zachary P, Jaulhac B, Eldin C. Immunoserological Diagnosis of Human Borreliosis: Current Knowledge and Perspectives. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:241.
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. Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18:484-509.
23. Blatz R, Kuhn HJ, Hermann W, Rytter M, Rodloff AC. [Neurosyphilis and neuroborreliosis. Retrospective evaluation of 22 cases]. *Nervenarzt*. 2005;76:724-32.
24. Henningsson AJ, Gyllemark P, Lager M, Skogman BH, Tjernberg I. Evaluation of two assays for CXCL13 analysis in cerebrospinal fluid for laboratory diagnosis of Lyme neuroborreliosis. *Apmis*. 2016;124:985-90.
25. Baranton G, Postic D, Saint G, I, et al. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol*. 1992;42:378-83.
26. Canica MM, Nato F, du ML, Mazie JC, Baranton G, Postic D. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scand J Infect Dis*. 1993;25:441-8.
27. Liang FT, Steere AC, Marques AR, Johnson BJ, Miller JN, Philipp MT. Sensitive and specific serodiagnosis of Lyme disease by enzyme-linked immunosorbent assay with a peptide based on an immunodominant conserved region of *Borrelia burgdorferi* vlsE. *J Clin Microbiol*. 1999;37:3990-6.
28. van Gorkom T, van Arkel GHJ, Voet W, Thijsen SFT, Kremer K. Consequences of the Edge Effect in a Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Diagnosis of Lyme Neuroborreliosis. *J Clin Microbiol*. 2021;59:e0328020.
29. van Burgel ND, Brandenburg A, Gerritsen HJ, Kroes AC, van Dam AP. High sensitivity and specificity of the C6-peptide ELISA on cerebrospinal fluid in Lyme neuroborreliosis patients. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:1495-500.
30. Kooijmans H, Mohrmann M, Smeets LC, Souverijn JHM, Tox GHM. 2013. Handboek "Medische laboratoriumdiagnostiek". Uitgever: Prelum uitgevers, Houten, 2e editie 2013.