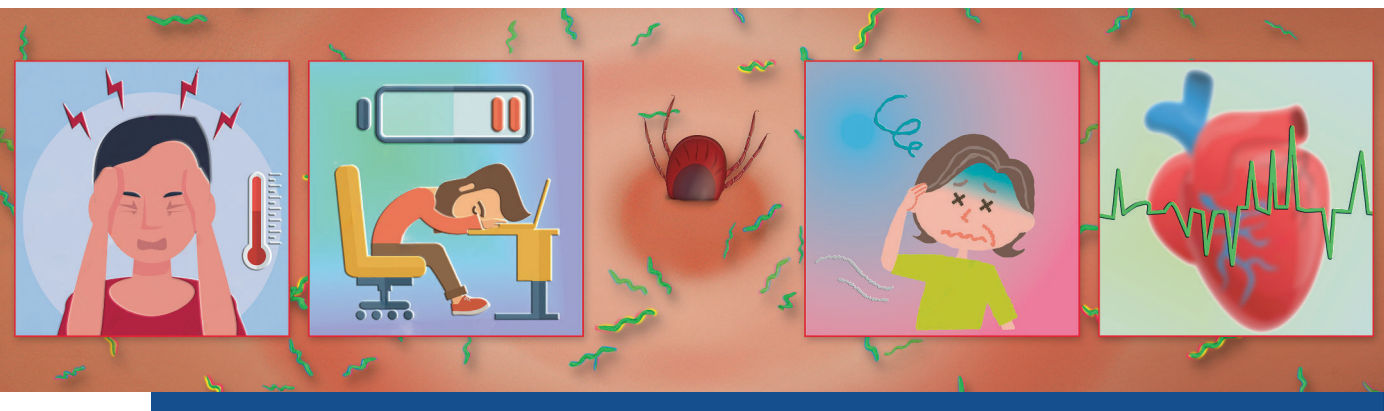


NEDERLANDS TIJDSCHRIFT VOOR
MEDISCHE MICROBIOLOGIE



Thema: Lyme borreliose

Screening *Borrelia*-antistoffen
Diagnostiek van Lyme

Ingezonden

Influenzaseizoen 2022-2023

Verenigingsnieuws

Strategische toekomstvisie NVMM
Podcast MedMic



Nederlands Tijdschrift voor
Medische Microbiologie
Het officiële orgaan van de
Nederlandse Vereniging voor Medische
Microbiologie (NVMM) informeert lezers
over zowel fundamentele als klinische
relevante ontwikkelingen binnen het
vakgebied. Ook biedt het plaats voor
promoties, symposium- en congres-
verslagen en cursusaankondigingen.

NVMM-secretariaat
Postbus 21020, 8900 JA Leeuwarden
Tel. (058) 293 94 95
Fax (058) 293 92 00
E-mail: secretariaat@nvmm.nl
Internet: www.nvmm.nl

Hoofredactie
Dr. Bert Mulder

Redactie
Dr. Jarne M. van Hattem, Nicolien M.
Hanemaaijer, dr. Jaap J. van
Hellemond, Maarten Heuvelmans,
Jan A. Kaan, dr. Bob Meek, dr. Simone
Moorlag, Milou Ohm, dr. Janette C.
Rahamat-Langendoen,
Gro L. Vlaspoolder

Redactiesecretariaat
Alphatekst, Marina Kapteyn
Baronie 42
2404 XG Alphen aan den Rijn
tel. 06 12076835
marina@alphatekst.nl

Coverbeeld: Hans den Boer

*Frequentie 4 x per jaar. Alle rechten voorbehouden.
Op deze uitgave is het redactiereglement van
toepassing.
Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd,
opgeslagen in een geautomatiseerd gegevens-
bestand of openbaar gemaakt, in enige vorm of op
enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door
fotokopieën, opnamen, of enige andere manier,
zonder voorafgaande schriftelijke toestemming
van de redactie. De redactie verklaart dat deze
uitgave op zorgvuldige wijze en naar beste weten is
samengesteld; evenwel kan de redactie op geen
enkele wijze instaan voor de juistheid of volledigheid
van de informatie. De redactie aanvaardt dan
ook geen enkele aansprakelijkheid voor schade,
van welke aard ook, die het gevolg is van bedoelde
informatie. Gebruikers van deze uitgave wordt
met nadruk aangeraden deze informatie niet
geïsoleerd te gebruiken, maar af te gaan op hun
professionele kennis en ervaring en de te gebruiken
informatie te controleren.*

Inhoud

Pagina

Van de redactie

Wat ons toekomt 3
Bert Mulder

Transmissieroute

Toekomstdromen 4
Wim Ang

Thema: Lyme borreliose

Screening op *Borrelia*-specifieke serumantistoffen -
Alternatieven voor de C6 Lyme ELISA 5
Dieneke Hoeve-Bakker, Tamara van Gorkom

Een diagnostisch algoritme voor Lyme neuroborreliose 16
Tamara van Gorkom, Dieneke Hoeve-Bakker

Ingezonden

Influenzaseizoen 2022/2023 in Nederland -
Langdurige circulatie van griepvirussen 29
*Ron Fouchier, Adam Meijer, Mariëtte Hooiveld, Dirk Eggink,
Albert Jan van Hoek, Rianne van Gageldonk-Lafeber,
Marit de Lange, Marion Koopmans*

Verenigingsnieuws

Werken aan een toekomstbestendige strategische visie 37
Het NVMM-bestuur

MedMic, de podcast over de grote impact van de
kleine dingen in het leven 39
Vishal Hira, Andreas Voss

Voortgangstoets

Opgave 40
Antwoord en toelichting 43
Jaap Herderscheê, Caspar Hodiamont

Proefschrift

Nieuw tijdperk van lipidentargeting - Peptideantibiotica 41
Rhythm Shukla

Promoties & oraties

46

Wat ons toekomst

Bert Mulder, hoofdredacteur

Dit is de eerste editie van het *Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie (NTMM)* van 2024. Het jaar begon met positief nieuws voor patiënten met langdurige COVID-symptomen (long covid). Op 4 januari publiceerden onderzoekers van Amsterdam UMC en VU in *Nature Communications* dat long covid een fysieke oorzaak heeft. Het wordt veroorzaakt door verstoringen in bloedvaten, het immuunsysteem en/of het zenuwstelsel. Na fysieke, cognitieve of emotionele inspanning ontstaat extreme vermoeidheid, bekend als post-exertionele malaise (PEM).

Op 10 januari trad zorgminister Ernst Kuipers onverwachts af vanwege een buitengewoon hoogleraarschap in Singapore vanaf 1 mei. Organisaties zoals PostCovidNL, Long Covid Nederland en VONE (Vergeet ons niet Ernst(!)) hebben jarenlang tevergeefs gepleit voor Nederlandse behandelklinieken voor long covid. Met het vertrek van Kuipers ontstond eindelijk de mogelijkheid om financiering te regelen voor de langverwachte behandelklinieken, waar niet alleen aandacht zal zijn voor long covid, maar ook voor andere post-infectie-syndromen zoals chronische Q-koorts en chronische Lymeziekte.

Lyme borreliose is tevens het thema van dit eerste *NTMM* in 2024. Dieneke Hoeve-Bakker belicht alternatieven voor de detectie van *Borrelia*-specifieke antistoffen, nu twee veelgebruikte C6 ELISA-tests van de markt zijn verdwenen. Samen met Tamara van Gorkom beschrijft ze een diagnostisch algoritme voor de complexe diagnose van neuroborreliose. Tamara's abstract over dit onderwerp werd eerder vermeld als prijswinnaar van het beste abstract op het NVMM Najaarscongres.

Een andere prijswinnaar, Rhythm Shukla, bespreekt haar proefschrift (KNAW-prijs voor beste proefschrift 2023) over een nieuw tijdperk van lipidetargeting met peptideantibiotica. In dit nummer komt ook de

voortgangstoets aan bod: Jaap Herderscheë en Casper Hodiament bespreken een vraag over farmacokinetiek van antibiotica. In de Transmissieroute beschrijft Wim Ang zijn toekomstdromen over metagenomics, en de vaste rubriek promoties en oraties ontbreekt evenmin. Een traditionele terugblik op het influenzaseizoen 2022/2023 door Ron Fouchier et al. beschrijft dat het griepseizoen na Kerst 2022 slechts vier weken boven de drempel van influenza-achtige ziektebeelden uitsteeg, maar toch duurde tot en met week 11 van 2023.

De hoofdredactie is bijzonder verheugd dat het NVMM-bestuur dit keer veel verenigingsnieuws heeft opgenomen in het *NTMM*. Ten eerste informatie over de NVMM-podcast MedMic vanuit de commissie Communicatie, waarin Vishal Hira en Andreas Voss een breder publiek willen voorzien van de juiste informatie over diverse microbiologische onderwerpen. Tijdens heidagen heeft het NVMM-bestuur gewerkt aan een nieuwe toekomstbestendige strategische visie, die tijdens de ALV begin april op Papendal wordt gepresenteerd. De speerpunten van deze visie worden kort beschreven, en het bestuur nodigt alle leden uit om tijdens de ALV mee te denken en mee te werken aan toekomstbestendigheid voor de komende vijf jaar. Dus graag tot ziens op Papendal, en anders tot het volgende *NTMM*.

Toekomstdromen

Wim Ang, Comicro

Gelukkig hebben we een vak met veel technologische ontwikkelingen waardoor de kwaliteit van onze diagnostische onderzoeken steeds beter wordt. Hoe zit het nu met die toekomst, die ons al wordt voorgespiegeld sinds 16S PCR werd gekoppeld aan sequencing van mengsels van micro-organismen en de term 'metagenomics' werd gemunt. Dat was in 1998. We zijn nu ruim 25 jaar verder en de belofte van een microbiologisch lab zonder kweek is nog niet ingelost. Toch is de hoeksteen van de bacteriologische diagnostiek nog steeds kweek op een vast of vloeibaar medium. Onze laboratoria zijn nog steeds gevuld met stapels agarplaten in allerlei kleuren en sommige collega's heb ik wel eens horen zeggen dat Louis Pasteur nog best uit de voeten zou kunnen in een hedendaags laboratorium.

Titels als "Clinical metagenomics – future and challenges", "Future potential of metagenomics in clinical laboratories" geven al aan dat er misschien wel ontwikkelingen in de juiste richting zijn, maar dat voorspellingen over een kweekloze microbiologie nog lang niet zijn uitgekomen. Zou het dan beter zijn, alles met PCR? De diagnostische medische virologie kan heel goed zonder viruskweek, en ook voor de huis-tuin-en-keuken-parasitologie is de PCR niet meer weg te denken. Multiplex PCR-pakketten voor septische artritis of centraalzenuwstelselinfecties bestaan al, en de geautomatiseerde uitvoeringen met cartridges die 24/7 kunnen worden ingezet, worden al veel gebruikt. Die grote stap voorwaarts hebben we dus al gezet; wat voegt het in kaart brengen van al het genomisch materiaal in een monster dan toe? Natuurlijk de belofte dat je pathogenen gaat aantreffen waar je helemaal niet aan had gedacht. Dat zagen we al toen de feces-PCR-testen werden gevalideerd. Aanvragers bleken helemaal niet zo goed te kunnen inschatten of diarree door een virus, bacterie of parasiet werd veroorzaakt, dus een test hebben met alle bekende darmpathogenen zou het beste zijn.

Dan volgt de logische vraag: voegt metagenomics iets toe aan het superbrede multiplexpakket? Wat mij betreft is die vraag nu nog niet beantwoord in het voordeel van metagenomics. Vorige week hadden we in onze vakgroep

discussie over wat de belangrijkste eigenschappen zouden moeten zijn van PCR-diagnostiek in pakketvorm. Betrouwbaarheid en snelheid waren de belangrijkste punten, 'breedheid' van het pakket vonden we veel minder belangrijk, waarschijnlijk gebaseerd op epidemiologische overwegingen. En snelheid is nou net waar het bij metagenomics nog aan schort. Alle stappen achter elkaar zouden wel binnen afzienbare tijd kunnen worden afgewerkt, maar omdat er gespecialiseerd personeel nodig is, kan het nu nog niet zeven dagen per week of buiten kantoor tijden.

Bij welke klinische syndromen hebben we dan wel te maken met een bijna onuitputtelijke hoeveelheid potentiële pathogenen, die de capaciteit van een multiplex, megaplex of hyperplex superbreed PCR-panel te boven gaat? Tsjja, de ernstig immuungecompromitteerde patiënt, de reiziger uit de tropen? Of alleen maar de patiënt bij wie de reguliere PCR-pakketten en conventionele kweek niets opleveren? Kortom, meer vragen dan antwoorden. Wat wel duidelijk is, is dat de ontwikkelingen nog lang niet zijn gestopt. Als serologisch geïnteresseerde microbioloog heb ik gezien dat verbetering van kwaliteit en verlaging van de doorlooptijd hand in hand kunnen gaan als er een prikkel is om marktaandeel te veroveren. De fabrikanten van immuno-analyzers hebben goed naar elkaars pakketten gekeken en de verschillende merken ontlopen elkaar niet meer veel.

Met dat perspectief kijk ik ook naar PCR-diagnostiek. Ik zie ruimte voor verdere automatisering en verbreding van syndromale pakketten die op analyzers kunnen worden gedraaid die door minder hoog geschoold personeel kunnen worden bediend. De COVID-pandemie heeft ons geleerd dat met de juiste afspraken en samenwerking met collega's van andere labspecialismen microbiologische diagnostiek 24/7 kan worden uitgevoerd op verantwoorde wijze. En metagenomics? Ik hoop dat het niet bij een belofte blijft.

De Transmissieroute wordt voortgezet door Harold Thiesbrummel.

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 studiepopulaties [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 VIsE 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 studiepopulatie 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 geïnccludeerd 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.

Studiepopulatie

In totaal werden 74 patiënten met verschillende lymemanifestaties geïnccludeerd, 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 Atroficans (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 intrathecaal 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 intrathecale *Borrelia*-specifieke antistofsynthese kon worden aangetoond. Vier (50,0 procent) van de acht pLNB-patiënten hadden pleiocytose; de overige vier (50,0 procent) hadden intrathecale *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 solitaire 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

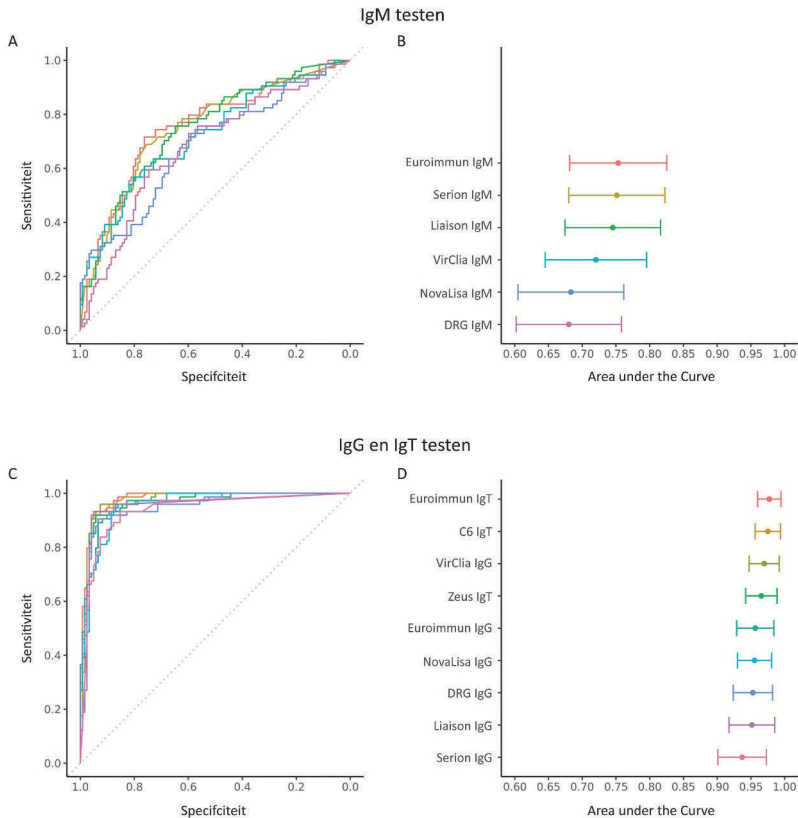
De paarsgewijze overeenkomst tussen twee testen op basis van de gecombineerde Ig/IgT-resultaten was redelijk tot uitstekend, met κ -waarden variërend van 0,53 tot 0,78. Voor de meeste testen nam de mate van overeenstemming aanzienlijk toe wanneer IgM-resultaten buiten beschouwing werden gelaten (κ tussen 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.



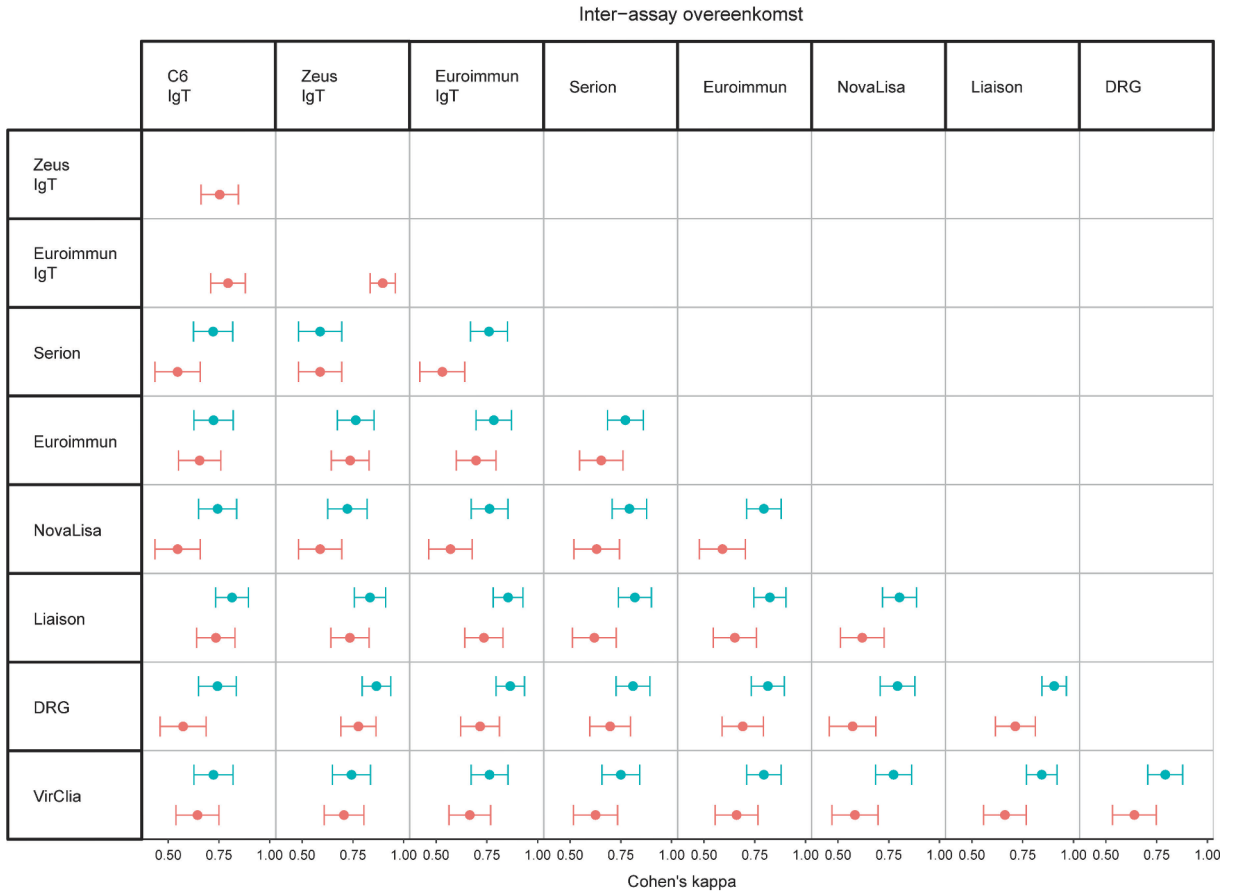
EM op basis van uitsluitend klinische symptomen aanbeveelt [5].

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 Cata. 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.

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 intrathecaal 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 recomLine immunoblot (IB) de interpretatie van de recomLine 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 verschilden 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 procentbetrouwbaarheidsintervallen (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]) ^f	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 ⁱ	< 0,001 ⁱ	0,279
Positieve CXCL13-uitslag op liquor	9 (90,0)	1 (14,3)	2 (1,4)	0,004 ⁱ	< 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 ⁱ	1,000
C6 ELISA (serum)	10 (100)	7 (100)	38 (27,3)	1,000	< 0,001 ⁱ	< 0,001 ⁱ
Tweestaps-serologie (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 $\times 10^{-3}$) [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 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 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]).

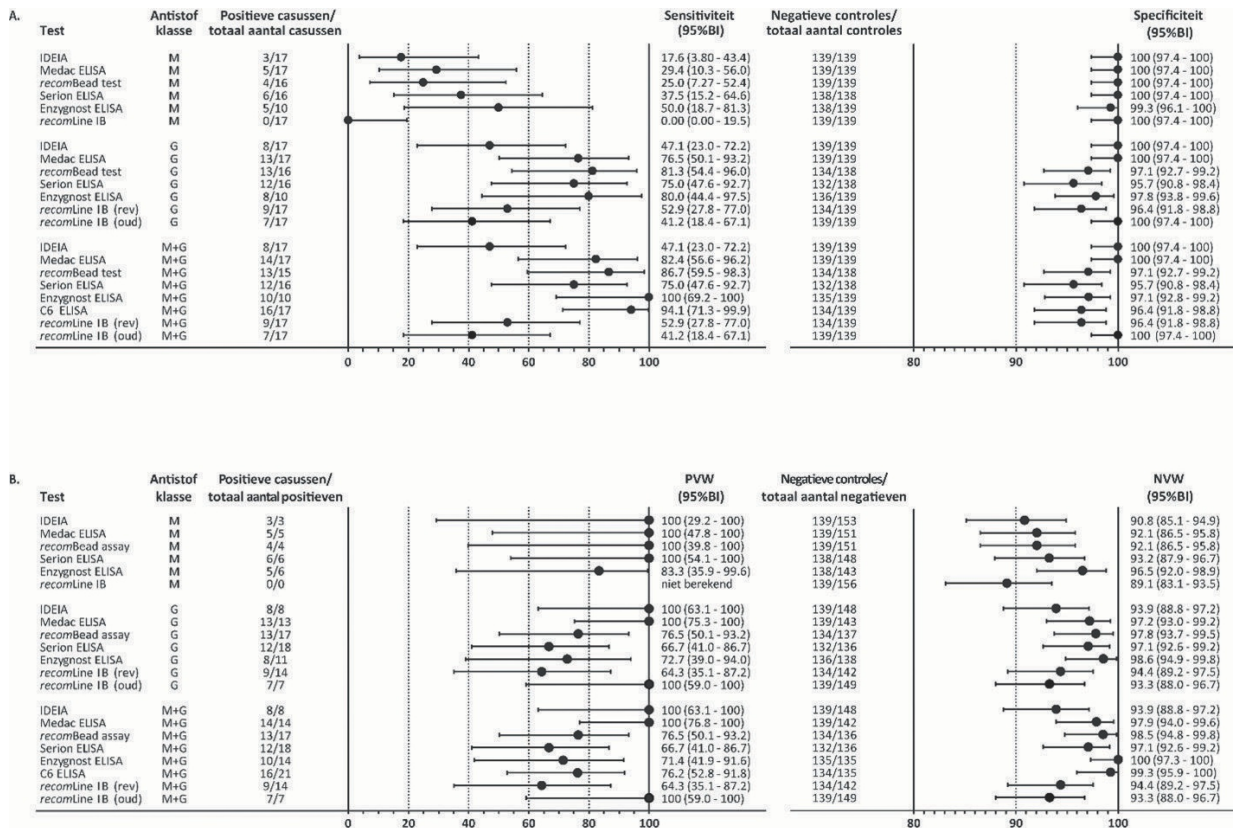
Het percentage *recomLine* IB-positieven in liquor op basis van totaal Ig was bij zekere LNB-patiënten vergelijkbaar met die in serum (80,0 procent [8/10] respectievelijk 90 procent [9/10]), $P = 1,000$ (zie *tabel S2* in ref [5]). Bij mogelijke LNB-patiënten was dit percentage in liquor lager dan in 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 ⁱ	< 0,001 ⁱ	0,005 ⁱ
	IgM en/of IgG	9/9 (100) ^f	3/7 (42,9)	6/138 (4,3) ^f	0,019 ⁱ	< 0,001 ⁱ	0,005 ⁱ
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 ⁱ
	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 ⁱ	< 0,001 ⁱ	0,259
	IgG (oud) ^h	7/10 (70,0)	0/7 (0,0)	0/139 (0,0)	0,010 ⁱ	< 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 ⁱ	< 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 ⁱ	< 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 prestatiekarakteristieken (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) ^c	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	<i>Borrelia</i> 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 VlsE-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 × 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.

Influenzaseizoenen 2022/2023 in Nederland

Langdurige circulatie van griepvirussen

Ron Fouchier, Adam Meijer, Mariëtte Hooiveld, Dirk Eggink, Albert Jan van Hoek, Rianne van Gageldonk-Lafeber, Marit de Lange, Marion Koopmans

Samenvatting

De griepepidemie van 2022/2023 begon in week 50 van 2022 en duurde tot en met week 11 van 2023. Het aantal meldingen van influenza-achtige ziekte (IAZ) lag vanaf week 51 slechts vier weken boven de epidemische drempel van 5,8 personen met IAZ per 10.000 inwoners, maar vanwege een snelle toename van detecties van griepvirussen in week 50 en voortdurende hoge aantallen detecties tot en met week 11 was het toch een vrij lange epidemie. Influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) en B/Victoria-lijnvirussen werden allemaal frequent gedetecteerd. Binnen elk van deze (sub)typen werd grote genetische diversiteit waargenomen, maar werd substantiële antigene drift niet gezien. Voor de overgrote meerderheid van de virussen was er geen genetisch of fenotypisch bewijs voor resistentie tegen beschikbare medicijnen. Twee A(H1N1)pdm09-virussen hadden genetische markers in neuraminidase (S247N, D199G/H275Y) die wijzen op resistentie tegen neuraminidaseremmers, waarvan er één na kweek fenotypisch werd bevestigd. Mensen die voor dit seizoen de griepvaccinatie kregen hadden 53 procent minder kans op griep. Na het griepseizoen, in augustus 2023, werd nog een A(H1N1)v varkensgriepvirus zoonose vastgesteld, zonder aanwijsbare directe link met blootstelling aan varkens.

Abstract

The 2022/2023 influenza epidemic started in week 50 of 2022 and lasted until week 11 of 2023. Reports of influenza-like illness (ILI) were only 4 weeks above the epidemic threshold of 5.8 persons with ILI per 10,000 population from week 51 onwards, but due to a rapid increase in influenza virus detections in week 50 and continued high detection rates through week 11, it was still a fairly long epidemic. Influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B/Victoria line viruses were all detected

frequently. Within each of these (sub)types, substantial genetic diversity was observed, but substantial antigenic drift was not seen. For the majority of viruses, there was no genetic or phenotypic evidence for resistance to available drugs. Two A(H1N1)pdm09 viruses had genetic markers in neuraminidase (S247N, D199G/H275Y) indicating resistance to neuraminidase inhibitors, one of which could be cultured and confirmed phenotypically. People who received the influenza vaccine this season had a 53 percent lower risk of influenza. After the influenza season, in August 2023, an A(H1N1)v swine influenza virus zoonosis was identified, without a demonstrable direct link with exposure to pigs.

Inleiding

Influenzavirussen van type A, B en C veroorzaken griep bij mensen, waarbij type A en B voor de grootste ziektelast zorgen [1]. In Nederland krijgen mensen van 60 jaar en ouder en patiënten met een (medische) indicatie de griepvaccinatie aangeboden in het kader van het Nationaal Programma Grieppreventie [2]. Het quadrivalent griepvaccin bevat componenten van A(H1N1)pdm09, A(H3N2), B/Yamagata en B/Victoria-virussen [3,4]. De exacte vaccinsamenstelling wordt

Erasmus MC, afdeling Viroscience, Nationaal Influenza Centrum, Rotterdam, prof. dr. R.A.M. Fouchier, prof. dr. M.P.G. Koopmans, virologen. RIVM, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Centrum Infectieziektebestrijding, Nationaal Influenza Centrum, Bilthoven, dr. A. Meijer, dr. D. Eggink, virologen, dr. A.J. van Hoek, dr. A.B. van Gageldonk-Lafeber, dr. M.M.A. de Lange, epidemiologen. Nivel, Utrecht, dr. M. Hooiveld, senior onderzoeker. Correspondentieadres: prof. dr. R.A.M. Fouchier (r.fouchier@erasmusmc.nl).

elk jaar opnieuw bekeken om deze te laten aansluiten op de dan circulerende virusvarianten. Vaccinproducenten hebben vervolgens een half jaar de tijd om het nieuwe vaccin voor het volgende seizoen te produceren en distribueren [5].

Het Nationaal Influenza Centrum (NIC) maakt deel uit van het door de WHO gecoördineerde Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) [6]. Dit netwerk volgt internationaal de opkomende virusvarianten om het griepvaccin indien nodig aan te passen. In Europa worden gegevens over griep via het European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) gemeld aan de WHO en worden gekarakteriseerde influenzavirussen opgestuurd naar het WHO Collaborating Centre in Londen. In Nederland registreert het Nivel (Nederlands instituut voor onderzoek van de gezondheidszorg) wekelijks het aantal patiënten met een influenza-achtig ziektebeeld (IAZ) bij huisartsen en vraagt de huisartsen om een deel van deze patiënten met IAZ of met een andere acute luchtweginfectie (ARI) te bemonsteren voor virusdiagnostiek [7]. De influenzavirussen verkregen uit deze huisartspatiënten, aangevuld met virussen van ziekenhuispatiënten en van deelnemers aan het zelftestonderzoek van Infectieradar [8] worden door RIVM en Erasmus MC gekarakteriseerd. Zelfbemonstering van mensen met ARI-klachten in Infectieradar is voor seizoen 2022/2023 toegevoegd als extra bron van informatie over circulatie van SARS-CoV-2 en andere respiratoire virussen, waaronder

influenzavirussen, onder de algemene bevolking. Een groot aantal virussen wordt eerst genetisch gekarakteriseerd, waarna voor een representatieve subset de antigene eigenschappen en de gevoeligheid voor antivirale medicijnen fenotypisch wordt vastgesteld. Dit artikel beschrijft de periode van week 40-2022 tot en met week 20-2023. Om van een griep epidemie te spreken wordt naar de resultaten gekeken in alle beschikbare surveillancebronnen.

Resultaten en discussie

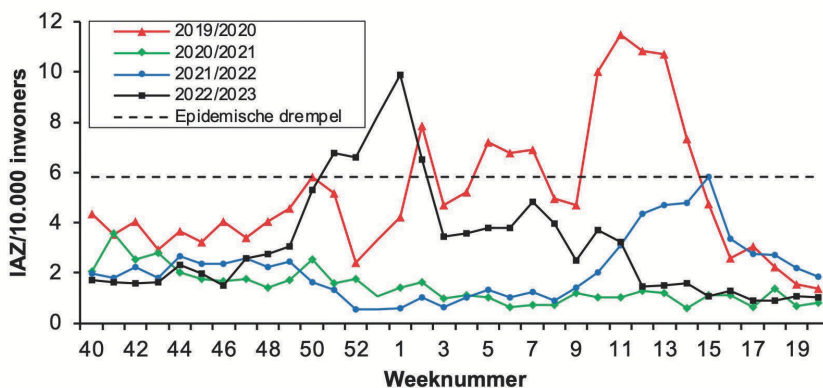
De influenza-epidemie van het seizoen 2022/2023

De influenza-epidemie duurde dit seizoen in totaal 14 weken, van week 50 tot en met week 11 van 2023 (zie *figuur 1*). Het aantal IAZ-gevallen per 10.000 inwoners lag in de weken 51 en 52 van 2022 en de weken 1 en 2 van 2023 boven de epidemische drempel van 5,8 patiënten met IAZ per 10.000 inwoners (zie *figuur 1*) [9]. In week 1 van 2023 werd een piek van 9,9 IAZ-gevallen per 10.000 inwoners bereikt. In week 3 van 2023 daalde de IAZ-incidentie onder de epidemische drempel, maar vanwege het aanzienlijke aantal detecties van influenzavirussen in diverse bronnen (zie *figuur 2*) werd het einde van de epidemie pas aangekondigd in week 11 van 2023.

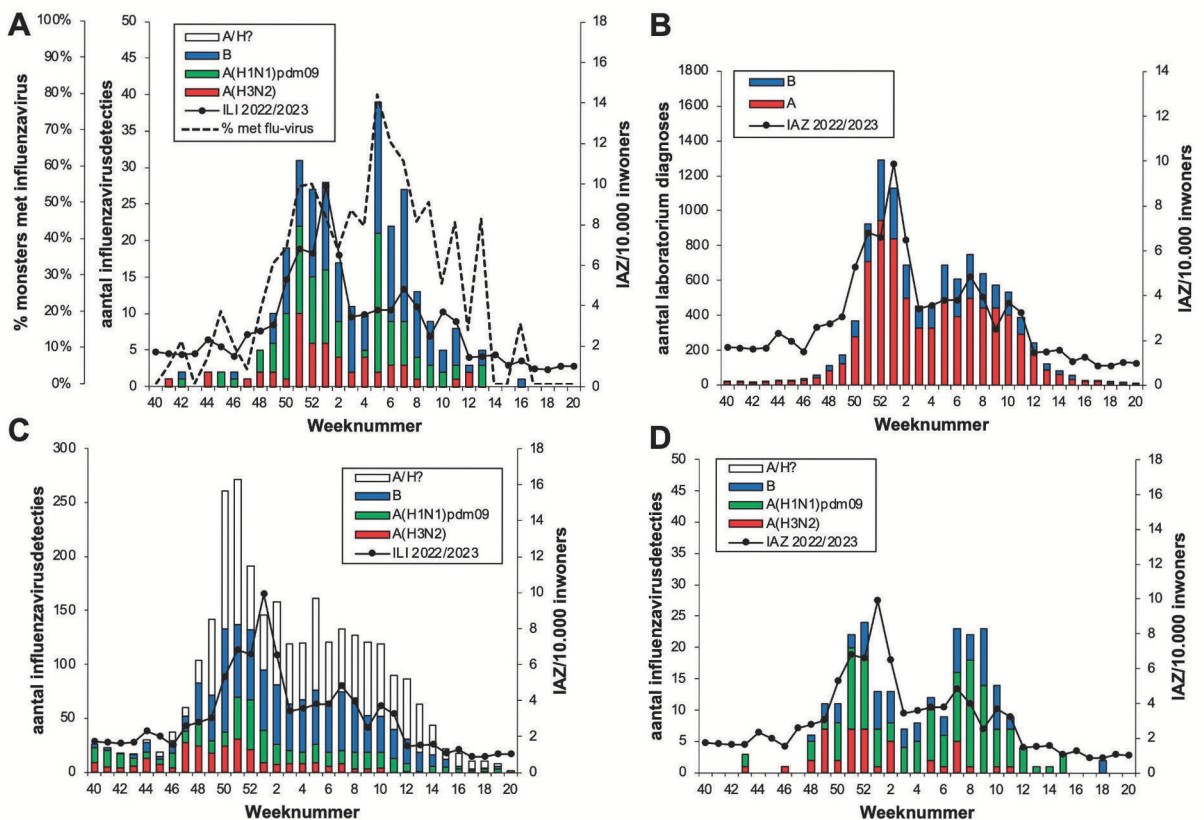
Overzicht van de onderzochte influenzavirussen

In 796 monsters afgenomen door peilstationhuisartsen bij IAZ-patiënten werd 145 keer (48 procent) een

Figuur 1. Klinische influenza-activiteit in Nederland in de seizoenen 2019/2020 tot en met 2022/2023, weergegeven als het wekelijkse aantal patiënten met een influenza-achtig ziektebeeld per 10.000 inwoners, gerapporteerd door de huisartsenpeilstations. Bron: Nivel.



Figuur 2A/B/C/D. Virusdetecties in het influenzaseizoen 2022/2023. Detecties in door peilstations afgenomen monsters van patiënten met een IAZ (A), gemeld in de virologische weekstaten (B), in monsters ingestuurd vanuit diagnostische ziekenhuislaboratoria (C) en ingestuurd in het kader van Infectieradar (D). Afgebeeld zijn de wekelijkse aantallen influenzavirusdetecties, opgesplitst naar (sub)type. De aantallen zijn weergegeven als balken en als percentage van de monsters waarin een influenzavirus werd aangetroffen (A, stippellijn), af te lezen op de linker verticale as. Het aantal IAZ per 10.000 inwoners per week is weergegeven op de rechter verticale as. Door maximering van het aantal inzendingen per ziekenhuis dat in aanmerking kwam voor sequentieanalyse is een relatief groot aantal influenzavirussen type A in panel C niet gekarakteriseerd ("A/H?").



influenzavirus type B gevonden, 101 keer (34 procent) een A(H1N1)pdm09-virus en 53 keer (18 procent) een A(H3N2) virus. In 961 monsters van ARI-patiënten werd 57 keer (45 procent) een influenzavirus type B gevonden, 51 keer (40 procent) een A(H1N1)pdm09-virus en 18 keer (14 procent) een A(H3N2) virus. Van de 2878 door diagnostische ziekenhuislaboratoria aangemelde influenzavirussen waren er 1963 (68 procent) van het A-type en 915 (32 procent) van het B-type. Van de 682 volledig gekarakteriseerde

influenza A-virussen waren er 420 (62 procent) van subtype A(H1N1)pdm09 en 262 (38 procent) van subtype A(H3N2). Van de 242 in Infectieradar gedetecteerde influenzavirussen waren er 131 (54 procent) van het A(H1N1)pdm09 subtype, 67 (28 procent) van het B-type en 44 (18 procent) van het A(H3N2)-subtype. Alle uit de diverse bronnen gekarakteriseerde influenza B-virussen behoorden tot de Victorianlijn.

Tabel 1. Antigene karakterisering van Nederlandse influenza A(H1N1)pdm09-virussen.

Virus	Clade	HAR titer* van antiserum van fretten geïnfecteerd met					
		NL/307/19	GD/SWL1536/19	NL/475/20	NL/10227/21	Vic/2570/19	NL/121/20
NL/307/19	6B.1A.5a	2560	1920	2560	1280	320	480
GD/SWL1536/19	6B.1A.5a.1	1280	1920	1920	1920	240	240
NL/475/20	6B.1A.5a.1	2560	2560	2560	2560	320	320
NL/10227/21	6B.1A.5a.1	480	1280	960	5120	240	240
Vic/2570/19	6B.1A.5a.2	320	960	640	1280	960	1280
NL/121/20	6B.1A.5a.2	240	480	320	1280	1280	1920
NL/1932/22	6B.1A.5a.1	960	1920	1920	1920	240	240
NL/1595/22	6B.1A.5a.1	1280	2560	2560	2560	240	160
NL/514/23	6B.1A.5a.2a	80	480	320	960	1280	1920
NL/808/23	6B.1A.5a.2a	480	640	320	960	640	1280
NL/10245/23	6B.1A.5a.2a	240	320	240	240	3840	3840
NL/763/23	6B.1A.5a.2a	160	480	320	640	1920	1920
NL/10468/23	6B.1A.5a.2a	80	120	120	640	1920	1920
NL/11972/22	6B.1A.5a.2a	240	960	480	480	2560	3840
NL/611/23	6B.1A.5a.2a	320	480	320	640	960	1920
NL/11831/22	6B.1A.5a.2a.1	60	120	80	120	5120	5120
NL/1426/22	6B.1A.5a.2a.1	160	120	80	240	640	1280
NL/657/23	6B.1A.5a.2a.1	240	120	120	320	1280	1280
Vic/4897/22	6B.1A.5a.2a.1	20	60	30	80	1280	1920

Karakterisering van influenza A(H1N1)pdm09-virussen

Van de 559 onderzochte A(H1N1)pdm09-virussen van dit seizoen behoorden er 422 (75 procent) tot clade 6B.1A.5a.2a, waartoe ook de vaccinstam van 2022/2023 behoorde. Acht virussen (1 procent) behoorden tot clade 6B.1A.5a.1 en 129 virussen (23 procent) behoorden tot de nieuwe clade 6B.1A.5a.2a.1 (zie *figuur 3a*). In de hemagglutinatie-remmingstest (HAR) met frettersera reageerden alle 6B.1A.5a.2a- en 6B.1A.5a.2a.1-virussen goed met antisera opgewekt tegen de vaccinstam A/Victoria/2570/2019 en het celkweek-virus A/Nederland/121/2020 van dezelfde clade. De geteste set virussen was wel genetisch divers, met aminozuurveranderingen in HA op onder meer posities 137, 142 en 216. Alleen de weinig gedetecteerde virussen van de oude clade 6B.1A.5a.1 reageerden minder met de referentiesera in de HAR (zie *tabel 1*).

Karakterisering van influenza A(H3N2)-virussen

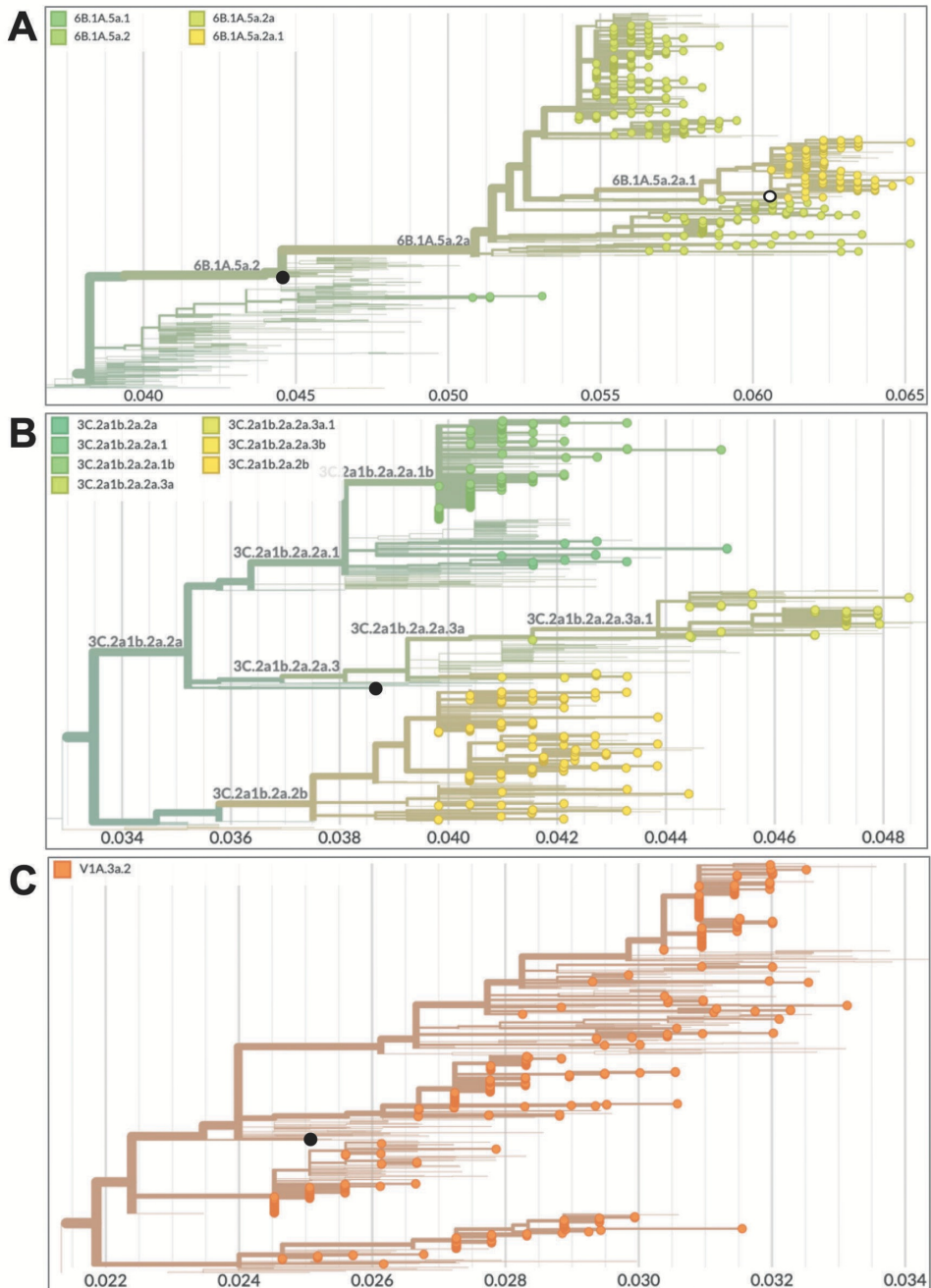
Van de 317 gekarakteriseerde A(H3N2)-virussen behoorden er 125 (39 procent) tot clade 3C.2a1b.2a.2b en 192 (61 procent) tot clade 3C.2a1b.2a.2a, waartoe

de vaccinstam van 2022/2023 behoorde. Deze laatste clade was echter genetisch zeer divers (zie *figuur 3b*). Een genetisch diverse set virussen (met aminozuurveranderingen op onder meer posities 133, 135, 137, 140, 156, 192 en 223 in HA) werd getest in de HAR, gebruikmakend van kalkoen-erythrocyten met gemodificeerde suikers [10]. Alle geteste virussen werden goed herkend door antisera opgewekt tegen de vaccinstam A/Darwin/9/2021 en het Nederlandse prototype virusisolaat A/Nederland/7/2021 (zie *tabel 2, pagina 34*).

Karakterisering van influenza B-virussen

Alle 436 dit seizoen gekarakteriseerde influenza-virussen type B waren van de Victorialijn, clade V1A.3a.2, net als de 2022/2023 vaccinstam (zie *figuur 3c*). In de HAR reageerden alle influenza B-virussen van dit seizoen goed met antisera opgewekt tegen de vaccinstam B/Austria/1359417/2021 en het Nederlandse referentievirus B/Nederland/10007/2021 (zie *tabel 3, pagina 34*). Deze geteste set virussen was wel genetisch divers, met aminozuurveranderingen in HA op onder meer posities 128, 129 en 197.

Figuur 3. Genetische analyse van de influenzavirussen in Nederland in het seizoen 2022/2023. Stambomen voor (A) influenzavirus A(H1N1)pdm09, (B) influenzavirus A(H3N2) en (C) influenza B-virus van de Victorianlijn zijn gemaakt met NextClade. Clades zijn in kleuren weergegeven, waarbij stippen de recente Nederlandse virussen weergeven en dunne lijntjes virussen van elders. De zwarte stip is de vaccinstam, de witte stip in 3a is de nieuwe vaccinstam voor volgend seizoen.



Tabel 2. Antigene karakterisering van Nederlandse influenza A(H3N2)-virussen.

Virus	Clade	HAR titer* van antiserum van fretten geïnfecteerd met						
		NL/124/20	NL/69/20	NL/122/20	NL/2498/19	Cambodia/20	NL/7/21	Darwin/9/21
NL/124/20	3C.2a1b.1a	1920	480	80	320	10	<20	<40
NL/69/20	3C.2a1b.1b	160	1280	80	240	20	<20	80
NL/122/20	3C.2a1b.2b	640	240	1920	1280	80	320	<40
NL/2498/19	3C.2a1b.2a	320	160	320	1280	20	120	<40
Cam/e0826360/20	3C.2a1b.2a.1a	1280	80	20	120	1280	640	2560
NL/7/21	3C.2a1b.2a.2a.1	40	10	<10	40	20	5120	1280
Darwin/9/21	3C.2a1b.2a.2a	320	480	160	160	160	10240	5120
NL/1431/22	3C.2a1b.2a.2a.1	40	<10	<10	40	10	5120	1920
NL/10142/23	3C.2a1b.2a.2a.1b	480	80	<10	40	60	7680	5120
NL/12136/22	3C.2a1b.2a.2a.1b	120	80	<10	40	40	2560	2560
NL/10277/23	3C.2a1b.2a.2a.1b	40	40	<10	10	30	2560	1280
NL/10226/23	3C.2a1b.2a.2a.1b	40	40	<10	30	40	5120	1280
NL/10228/23	3C.2a1b.2a.2a.1b	160	40	<10	<10	40	2560	1920
NL/10160/23	3C.2a1b.2a.2a.3a.1	40	40	<10	20	40	2560	1920
NL/652/23	3C.2a1b.2a.2a.3a.1	80	40	<10	20	40	3840	3840
NL/10132/23	3C.2a1b.2a.2a.3b	30	<10	<10	<10	40	1920	1280
NL/442/23	3C.2a1b.2a.2a.3b	20	10	<10	<10	10	2560	1920
NL/10162/23	3C.2a1b.2a.2b	40	40	<10	40	40	2560	960
NL/496/23	3C.2a1b.2a.2b	40	40	<10	60	40	1280	480
NL/1867/22	3C.2a1b.2a.2b	80	<10	<10	40	40	3840	960
NL/10290/23	3C.2a1b.2a.2b	160	80	40	40	80	2560	1280
NL/11812/22	3C.2a1b.2a.2b	240	40	<10	40	60	3840	1920
NL/11832/22	3C.2a1b.2a.2b	320	80	<10	40	160	2560	2560

Tabel 3. Antigene karakterisering van Nederlandse influenza B virussen van de Victorianlijn.

Virus	Clade	HAR titer* van antiserum van fretten geïnfecteerd met						
		NL/302/18	NL/2444/19	Wash/2/19	NL/11305/22	Croatia/19	NL/10007/21	Austria/21
NL/302/18	V1A.1	480	80	240	80	120	10	10
NL/2444/19	V1A.3	480	1280	1280	960	240	60	60
Wash/2/19	V1A.3	1280	1920	3840	960	480	120	120
NL/11305/22	V1A.3	240	320	320	960	160	30	30
Croatia/7789/19	V1A.3a	1280	480	2560	640	3840	640	640
NL/10007/21	V1A.3a.2	480	480	320	320	480	1920	2560
Aus/1359417/21	V1A.3a.2	240	480	320	960	1280	1920	2560
NL/11963/22	V1A.3a.2	240	240	240	240	480	1920	1920
NL/10258/23	V1A.3a.2	240	240	160	160	480	1920	1920
NL/828/23	V1A.3a.2	240	320	320	240	480	1920	1920
NL/10191/23	V1A.3a.2	240	120	120	240	480	1280	1280
NL/233/23	V1A.3a.2	240	240	240	240	480	1920	1280
NL/10335/23	V1A.3a.2	240	240	240	240	480	1280	1920
NL/10486/23	V1A.3a.2	320	240	240	320	640	1920	1920
NL/10316/23	V1A.3a.2	160	240	240	240	960	1920	2560
NL/728/23	V1A.3a.2	160	240	160	160	640	1280	1280
NL/10253/23	V1A.3a.2	120	240	160	160	480	1280	1280
NL/589/23	V1A.3a.2	240	480	160	480	480	1920	1280

Vaccineffectiviteit

Mensen die voor het seizoen 2022/2023 de griepkrik kregen, hadden 53 procent minder kans om griep te krijgen. De effectiviteit in alle leeftijden was 46 procent tegen A(H1N1)pdm09-virussen, 36 procent tegen A(H3N2)-virussen en 76 procent tegen influenza B-virussen [11].

Vaccinsamenstelling voor het seizoen 2023/2024

Op 24 februari 2023 adviseerde de WHO voor het noordelijk halfrond over de samenstelling van het influenzavaccin voor 2023/2024, waarbij alleen de component voor A(H1N1)pdm09 werd aangepast [12]. Op 29 september 2023 tijdens de bijeenkomst voor het zuidelijk halfrond werd geadviseerd om de Yamagata-component in de toekomst niet langer op te nemen in de griepkrik omdat virussen van deze lijn sinds maart 2020 wereldwijd niet meer zijn gedetecteerd [13-15]. Voor Nederland en veel andere landen kwam dit advies te laat voor uitvoering in het 2023/2024 seizoen en mogelijk ook voor 2024/2025, gezien het nationale adviestraject hierover en de lopende contracten. De geadviseerde samenstelling van het trivalente vaccin is:

- A/Victoria/4897/2022 (H1N1)pdm09-achtig virus;
- A/Darwin/9/2021 (H3N2)-achtig virus;
- B/Austria/1359417/2021-achtig virus, van de Victoria-lijn.

Voor een quadrivalent vaccin wordt tevens B/Phuket/3073/2013-achtig virus geadviseerd als Yamagata-component.

Gevoeligheid voor antivirale middelen

Tijdens het seizoen 2022/2023 werd voor 1316 influenzavirussen (562 A(H1N1)pdm09, 317 A(H3N2) en 437 B) de genoomsequentie onderzocht op aminozuursubstituties die resistentie tegen antivirale middelen kunnen veroorzaken [16]. Neuraminidase (NA) met S247N werd gevonden in 1 A(H1N1)pdm09-virus maar omdat dit virus niet kon worden gekweekt kon resistentie niet fenotypisch worden bevestigd. In een ander A(H1N1)pdm09 positief monster werd D199G/D(91 procent G) en H275Y/H(8 procent Y) gevonden in het NA. Na kweek bevatte dit monster D199G/D(24 procent G) en H275Y/H(75 procent Y), met een 445-voudige reductie in remming door oseltamivir en tweevoudig door zanamivir, vooral

veroorzaakt door 275Y. K360E werd waargenomen in het NA van 21 procent van de onderzochte influenza B-virussen. Hoewel deze substitutie geassocieerd is met een verhoogde resistentie tegen neuraminidaseremmers (met name peramivir), bleek dat fenotypisch niet het geval voor deze Nederlandse influenza B-virussen. Mogelijk zorgden substituties A395V en L396F nabij K360E in het NA voor een normale gevoeligheid voor neuraminidaseremmers. In geen van de onderzochte virussen werden mutaties gevonden in het PA-gen die geassocieerd zijn met resistentie tegen baloxavir.

A(H1N1)v varkensgriepviruszoönose

Hoewel deze rapportage de periode van week 40/2022 tot en met week 20/2023 betreft, is een A(H1N1)v varkensgriepviruszoönose in augustus 2023 het vermelden waard. Een volwassen persoon uit Noord-Brabant die deelnam aan Infectieradar [17] diende op 21 augustus een zelf afgenomen gecombineerde neus- en keeluitstrijk in. De reden was dat de persoon ARI-symptomen ontwikkelde op 20 augustus met acuut begin van koude rillingen, niezen, hoesten, hoofdpijn, asthenie. De persoon kreeg de dag erna koorts en meldde geen onderliggende ziekte. Het monster bleek positief voor influenza A-virus en door sequencing werd vastgesteld dat het een clade 1C.2.2 ('Eurasian avian') varkensgriepvirus betrof, nauw verwant aan virussen die bij Nederlandse varkens circuleerden in 2022 en 2023 [18]. Het virus bleek gevoelig voor oseltamivir en zanamivir en het PA-eiwit bevatte geen mutaties die eerder in verband zijn gebracht met verminderde gevoeligheid voor baloxavir. Opvallend was dat uit vervolgvragen geen duidelijke indicatie van de bron van de infectie naar boven gekomen is. Er waren geen zieke personen onder de directe contacten van de persoon.

Conclusie

De influenza-epidemie van 2022/2023 duurde 11 weken en werd veroorzaakt door influenza B, A(H1N1)pdm09- en A(H3N2)-virussen. De IAZ-incidentie was in slechts vier opeenvolgende weken boven de epidemische drempelwaarde van de peilstations, maar het aantal influenzavirusdetecties bleef dusdanig hoog dat toch 11 weken van een epidemie kon worden gesproken. De ernst en duur van

de epidemieën na de COVID-19 pandemie ten opzichte van eerdere seizoenen is nog altijd moeilijk in te schatten door mogelijke verschillen in onder meer huisartsbezoek en testbeleid. Ondanks de grote genetische diversiteit tussen de virussen die in 2022/2023 werden gekarakteriseerd, was de antigene diversiteit beperkt en sloot de vaccincompositie goed aan bij de in Nederland circulerende virussen. De vaccineffectiviteit van ongeveer 52 procent was daarmee in overeenstemming. Voor 2023/2024 werd door het WHO GISRS-netwerk een update van de A(H1N1)pdm09-component geadviseerd maar niet voor de andere componenten. Deze update is gebaseerd op tekenen van toenemende mismatch met humane sera, maar niet zo zeer met frettersera. De belangrijkste recente aanbeveling voor de grieprik was dat de B/Yamagata-component in de toekomst het beste kan worden weggelaten uit het vaccin omdat virussen van deze lijn wereldwijd niet meer lijken te circuleren. De nieuwe A(H1N1v) varkensgriepviruszoönose die in Infectieradar werd ontdekt was opmerkelijk omdat een directe link met blootstelling aan varkens niet kon worden aangetoond. Alertheid op infecties van mensen met varkensgriepvirus in Nederland blijft geboden.

Dankbetuigingen

Wij zijn zeer erkentelijk voor de bijdragen van de peilstationhuisartsen en patiënten van Nivel Zorgregistraties Eerste Lijn. Zonder de inzet in 2022/2023 van de diagnostische laboratoria was deze surveillance evenmin mogelijk geweest. Ook personen die aan Infectieradar meedoen en zelf monstertjes hebben afgenomen voor pathogeendetectie zijn wij zeer erkentelijk. De auteurs danken M. Pronk, P. Lexmond, dr. M. Richard, M. Silva, M. Bechthold-Hoogstad en H. Abdul (NIC-Erasmus MC), M. Bagheri, G. Goderski, J. Sluimer, C. Herrenbrugh, S. van den Brink, L. Wijsman, T. Sprong, dr. A. Teirlinck, dr. D. Reukers, drs. L. Jenniskens (NIC-RIVM) voor de uitstekende technische ondersteuning. N. Veldhuijzen, M. Riethof, M. Klinkhamer, R. van den Burgh en R. van den Broek (Nivel) worden bedankt voor hun inzet voor de Nivel Peilstations. Prof. G.J. Boons en dr. R. De Vries (Universiteit Utrecht) worden bedankt voor het leveren van gemodificeerde erythrocyten. Wij bedanken iedereen die bijdraagt aan de surveillance in varkens [18] en in het bijzonder Joke van der Giessen en Annelies Kroneman (RIVM), Manon Houben en Erhard van der Vries (Royal GD) en Evelien Germeraad (WBVR). Al onze influenzavirussequenties zijn beschikbaar via GISAID en wij danken GISAID en alle data-inzenders voor het delen van data.

The authors gratefully acknowledge the generous gift of influenza reference viruses and antisera from dr. N. Lewis from the World Influenza Centre in London.

Referenties

1. Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, et al. Influenza. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 4:3.
2. <https://www.rivm.nl/griep-grieprik/grieprik/achtergrondinformatie-grieprik>.
3. <https://www.who.int/publications/m/item/recommended-composition-of-influenza-virus-vaccines-for-use-in-the-2022-2023-northern-hemisphere-influenza-season>.
4. Meijer A, Fouchier R, Donker GA, et al. Influenzavaccinatie in Nederland – naar het quadrivalent influenzavaccin. *Ned Tijdschr Med Microbiol*. 2019;27:148-55.
5. Meijer A, Timmermans J, Donker GA, et al. Elk jaar een nieuw griepvaccin. Hoe wordt de samenstelling ervan bepaald? *Tijdschr Infect*. 2017;12:33-40.
6. Hay AJ, McCauley JW. The WHO global influenza surveillance and response system (GISRS)—A future perspective. *Influenza Other Respir Viruses*. 2018;12:551-7.
7. <https://www.nivel.nl/nl/panels-en-registraties/nivel-zorgregistraties-eerste-lijn>.
8. <https://www.rivm.nl/griep-grieprik/feiten-en-cijfers#irzelftest>.
9. Hooiveld M, Hendriksen J, Fouchier R, et al. Grenswaarde griep epidemie winter 2020-2021. Utrecht: Nivel, 2020. <https://www.nivel.nl/nl/nieuws/grenswaarde-griep-epidemie-2020-2021-vastgesteld-op-58-100000-inwoners>.
10. Broszeit F, van Beek RJ, Unione L, et al. Glycan-remodeled erythrocytes facilitate antigenic characterization of recent A/H3N2 influenza viruses. *Nat Commun*. 2021;12:5449.
11. Maurel M, Pozo F, Pérez-Gimeno G, et al. Influenza vaccine effectiveness in Europe: Results from the 2022–23 VEBIS (Vaccine Effectiveness, Burden and Impact Studies) primary care multicentre study. *Authorea*. October 10, 2023.
12. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/who-influenza-recommendations/vcm-northern-hemisphere-recommendation-2023-2024/202302_seasonal_recommendation_a.pdf?sfvrsn=42612ae5_3&download=true.
13. Paget J, Caini S, Del Riccio M, van Waarden W, Meijer A. Has influenza B/Yamagata become extinct and what implications might this have for quadrivalent influenza vaccines? *Euro Surveill*. 2022;27(39):2200753.
14. Caini S, Meijer A, Nunes MC, Henaff L, Zounon M, Boudewijns B, Del Riccio M, Paget J. Is influenza B/Yamagata extinct and what public health implications could this have? An updated literature review and comprehensive assessment of global surveillance databases. *medRxiv* 2023.09.25.23296068.
15. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/who-influenza-recommendations/vcm-southern-hemisphere-recommendation-2024/202309_qanda_recommendation.pdf?sfvrsn=7a6906d1_5.
16. <https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/laboratory-network/quality-assurance/antiviral-susceptibility-influenza/neuraminidase-inhibitor>.
17. <https://www.infectieradar.nl/welcome>.
18. <https://www.rivm.nl/zoonoson/surveillance-landbouwhuisdieren/surveillance-varkensinfluenza>.

Werken aan een toekomstbestendige strategische visie

Het NVMM-bestuur

Het NVMM-bestuur werkt aan een nieuwe visie en strategie en presenteert die tijdens de ALV in april. Wat kunnen jullie verwachten?

We zien allemaal dat de wereld om ons heen verandert. Maar welke ontwikkelingen hebben echt invloed op ons beroep en onze vereniging? Zo zien we dat onze professionele beroepsstandaard, maar ook die van andere zorgverleners, niet altijd automatisch meer wordt omarmd door stakeholders, de beslissers bij VWS, zorgverzekeraars en politiek. Daarnaast hebben nieuwe ontwikkelingen als AI invloed op ons vak. Ook zien we een toenemend tekort aan financiële middelen en aan personeel. Deze schaarste en focus op financiële prikkels knabbelen aan de kwaliteit van zorg. En als we niet oppassen dreigen we de grip te verliezen op centralisatie van diagnostiek. Tot slot ervaren we een diversiteit aan belangen die spelen bij onze leden.



Bestuur en bureau NVMM tijdens de heidagen, vlnr: Heiman Wertheim (voorzitter), Juliette Severin, Gunnar Andriess (secretaris), Selina van der Vliet (beleidsadviseur), Welmoed Silvis, Suzan Pas, Bas Mourik, Akke van der Bij, Paul Savelkoul (penningmeester), Anne Wensing, Elizabeth Moreel (AIOS), Niels van Haarlem (directeur).

Heidagen

De wereld verandert. Deze ontwikkelingen dagen het bestuur van de NVMM uit om goed in de spiegel te kijken: doen we nog wel de juiste dingen als vereniging? Waarop moeten we ons richten? Waar willen we 'staan' met ons beroep en ons vak over pakweg vijf jaar? En hoe kan het bureau ons daarin ondersteunen?

Eind 2023 hebben we ons letterlijk opgesloten in een huisje op de hei en ons gebogen over deze vragen. Onder leiding van een onafhankelijke procesbegeleider hebben we twee dagen met elkaar gewerkt aan een strategische visie van de NVMM. Hierbij hebben we geluisterd naar de signalen uit commissies, werkgroepen en vakgroepen.

Het waren twee inspirerende dagen! We hebben een schets gemaakt van waar we in 2028 willen staan, een zogeheten 'roadmap' naar een gemeenschappelijke toekomst. Wij zijn al aan de slag gegaan om deze verder in te kleuren. Tijdens de komende ALV zullen we de 'roadmap' presenteren en jullie feedback hierop ophalen.

De komende vijf jaar

Wat willen wij als NVMM de komende vijf jaar bereiken? Allereerst blijven de vereniging en haar leden zich inzetten voor de patiënt en de maatschappij. Over vijf jaar zijn wij toonaangevend en daarmee de partij waar men naar toe gaat voor adviezen over de infectieziektezorgketen. We worden herkend en erkend als dé betrouwbare professional voor de infectieziektezorg in de volle breedte.

De NVMM kan dit bereiken door meer in te zetten op haar wetenschappelijke taak en door een vereniging te zijn waar talenten beter worden ingezet. We stimuleren jonge, nieuwe én bestaande leden om een actieve rol te pakken die past bij hun talenten. Wetenschap, innovatie en kwaliteit zijn het fundament

waarop we de verenging verder gaan ontwikkelen. Om dit te realiseren heeft de NVMM een goed functionerend bureau nodig waarin de basisprocessen op orde zijn, om de leden waar nodig goed te ondersteunen.

We zijn innovatief. Dat doen we door in te spelen op innovaties zoals AI en andere vormen van digitalisering binnen de patiëntenzorg en de openbare gezondheidszorg (OGZ). Dat doen we niet alleen, maar in samenwerking met andere deskundigen en verenigingen. De meerwaarde van de medische microbiologie is duidelijk en zichtbaar in de infectieziektezorgketen.

Dit kan alleen door samen goed op te trekken en onderling tijdig af te stemmen. Daarom zullen we ook er aan werken om de vereniging nog meer te verenigen. De NVMM heeft al vele verbindingen tussen de verschillende disciplines en leden; deze willen we versterken en meer gelijkgericht maken. Zo zijn we beter geïntegreerd in het veranderende zorglandschap.

Speerpunten

Hierboven heeft u in een notendop de contouren kunnen lezen waaraan we komende tijd gaan werken en waarbij we de leden gaan betrekken. Het is ambitieus en we hebben er vertrouwen in dat we deze doelen ook gaan bereiken. We zullen de komende maanden leden, commissies en werkgroepen

betrekken bij de verdere uitwerking.

Het is belangrijk om goed te kijken welke stappen we nú kunnen zetten. Waarop moeten we ons richten? Daarvoor hebben we vijf speerpunten benoemd, te weten:

1. *Wetenschap en innovatie als basis.*
2. *Het verbeteren van de organisatie van vereniging, bestuur en bureau.*
3. *Het zichtbaar maken van onze meerwaarde bij stakeholders.*
4. *De positionering van ons vak met oog voor de verandering die we zien bij patiënt en maatschappij.*
5. *Het belang van digitalisering en AI.*

Het vervolg

Twee dagen op de hei heeft een strategische visie met speerpunten opgeleverd. Maar daarmee zijn we er nog lang niet. Belangrijk is om samen met de leden de visie verder te ontwikkelen. En het bestuur heeft jullie nodig om uiteindelijk deze visie te omarmen en in de praktijk uit te dragen. We willen een open en proactieve vereniging zijn, waarin de leden actief zijn, continu van elkaar leren en verbeteren. Zo zijn en blijven wij toonaangevend in wat we doen.

We roepen jullie dan ook op om tijdens de ALV in april met ons mee te denken en mee te werken. Een concrete stap op weg naar 2028!

MedMic, de podcast over de grote impact van de kleine dingen in het leven

Vishal Hira, Andreas Voss

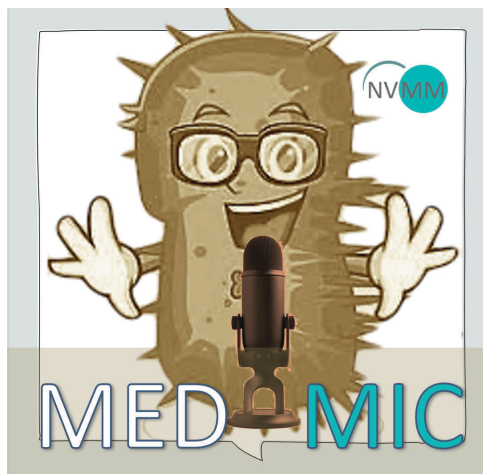
Het zal jullie waarschijnlijk niet ontgaan zijn, ook de NVMM gaat met haar tijd mee en heeft een eigen podcast, genaamd MedMic. Het idee om een podcast te beginnen ontstond in 2022 in de Commissie Communicatie. Met 17 miljoen virologen in de bevolking, had iedereen een mening over infecties, diagnostiek, maar ook de mensen die zich daarmee bezighielden. Soms was dit een goed onderbouwde mening, maar vaak was de mening helaas gebaseerd op informatie van personen die wat minder kaas van de materie hebben gegeten.

De bedoeling van de podcast is om het publiek van juiste informatie voorzien, maar ook om mensen te enthousiasmeren voor de wondere wereld van de microbiologie en eigenlijk alles wat er in de wereld van infectieziekten speelt. Ondergetekenden besloten om hiermee aan de slag te gaan. Ons initiële plan, het maken van een professionele podcast met state of the art geluidsapparatuur en een professionele editor bleek financieel niet helemaal haalbaar te zijn, maar daar lieten we ons niet door uit het veld slaan. Laptops kunnen immers geluid opnemen en de afstand Gouda-Groningen bleek makkelijk te overbruggen met Teams. Het gebrek aan *sound editing skills* werd gecompenseerd door Stijn van Drimmelen, een student marketing die zijn geweldige vaardigheden voor een zeer schappelijk bedrag met ons wilde delen. Bijkomend voordeel was dat Stijn meteen een 'lekencheck' kon doen: als hij iets niet snapte, dan moest het over.

Voortvarend begonnen we aan onze eerste podcast. Over het onderwerp was al snel consensus, namelijk duurzaamheid. We hadden een ambitieus plan: drie verschillende personen interviewen over verschillende aspecten van duurzaamheid op verschillende niveaus. Dat zouden we wel even doen, dachten we. Helaas bleek 'even' wat verkeerd ingeschat te zijn, maar na een symbolische negen maanden hadden we een

prachtige aflevering en waren we een flinke dosis ervaring rijker. De opnametijd van de volgende aflevering hebben we weten te verkorten naar 45 minuten.

Inmiddels staan er op het moment van schrijven al zeven afleveringen online en hebben we volop plannen voor meer. Alle afleveringen zijn te beluisteren via de NVMM-site en de bekende podcastkanalen als Spotify, Apple Podcasts, Google Podcasts, maar ook via Medicast. Hoewel MedMic voornamelijk gericht is op een algemeen publiek, denken wij dat de afleveringen ook erg interessant zijn voor onze collega's en hopen wij dat jullie de podcast zullen aanbevelen aan anderen. Uiteraard horen wij graag wat jullie wel en niet bevalt, evenals ideeën voor leuke thema's.



Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie, Commissie Communicatie, dr. V. Hira, arts-microbioloog, prof. dr. A. Voss, arts-microbioloog.
Correspondentieadres: dr. V. Hira (vishalhira@gmail.com).

De volgende zeven afleveringen zijn te beluisteren:

Aflevering 1, Duurzaamheid

In deze eerste aflevering spreken we met prof. dr. Greet Voss over het Gezondheidsraadadvies "Verduurzaming van hulpmiddelen in de zorg". Dr. Erlangga Yusuf, voorzitter van de NVMM werkgroep Duurzaamheid, vertelt over de plannen van de werkgroep en Geesje Roo-Brand, arts-assistent medische microbiologie, geeft wat praktische voorbeelden van wat zij in het UMCG hebben gedaan.

Aflevering 2, SRI

Hierin hebben we het over het Samenwerkingsverband Richtlijnen Infectiepreventie.

Aflevering 3, Arts-microbioloog

In deze aflevering leggen we uit wat ons beroep nu eigenlijk inhoudt.

Aflevering 4, Halloween

Deze speciale aflevering is bedoeld om mensen de stuipen op het lijf te jagen. Van een patiënt horen we hoe ze het heeft ervaren om beestjes in haar hoofd te hebben.

Aflevering 5, Actualiteit

Tijdens de World AMR Awareness Week bespraken we het thema 'antibioticaresistentie'. Verder praten we met dr. Jean-Luc Murk over het grote probleem van de dalende vaccinatiegraad en de consequenties ervan.

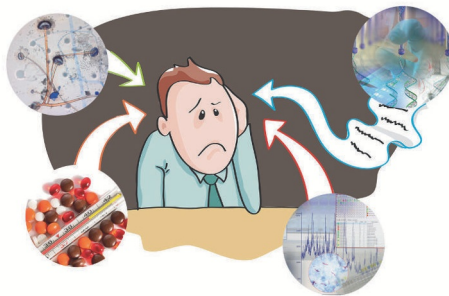
Aflevering 6, Griepseizoen

Met dr. Marjolein Knoester bespreken we in deze aflevering wat het griepseizoen voor ons betekent.

Aflevering 7, Schurft

Scabiës blijft een groot probleem, vooral bij studenten. In deze aflevering vertelt Frederieke Ormel, aios IZB, over scabiës en de rol van de GGD. We interviewen ook een ervaringsdeskundige, studente Lotte.

VOORTGANGSTOETS



Opgave Antibioticaleer

VRAAG

Wanneer je het doseringsschema wilt aanpassen moet je rekening houden met de PK/PD-index van het desbetreffende antibioticum.

Voor optimale effectiviteit dient rekening gehouden te worden met:

- a) Index is $fAUC/MIC$: dagdosering in 1 gift toedienen
- b) Index is $\% fT > MIC$: dagdosering verdelen over meerdere giften
- c) Index is $fAUC/MIC$: dagdosering verdelen over meerdere giften
- d) Index is $\% fT > MIC$: dagdosering in 1 gift toedienen.

Antwoord en toelichting: pagina 43 ev.

Nieuw tijdperk van lipidentargeting

Peptideantibiotica

Rhythm Shukla

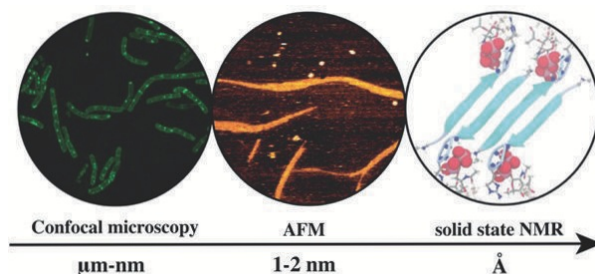
Antimicrobiële resistentie (AMR) is een wereldwijd gezondheidsprobleem. De momenteel gebruikte antibiotica worden steeds ineffectiever en de klinische pijn van nieuwe antimicrobiële stoffen is zo goed als leeg. Nieuwe antibiotica met nieuwe werkingsmechanismen zijn nodig om antibioticumresistentie te bestrijden.

De zogeheten macrocyclische depsipeptide antibiotica als teixobactine en clovibactine vormen een nieuwe groep die specifiek binden aan bacteriële lipiden in biologische membranen. Het moleculaire mechanisme van deze antibiotica is lastig te onderzoeken. Veel van deze lipidegerichte antibiotica maken gebruik van supramoleculaire mechanismen en oligomeriseren op membraanoppervlakken nadat ze aan het doel gebonden zijn. Om het algemene mechanisme van dergelijke antibiotica te begrijpen is het noodzakelijk om verschillende technieken te combineren, zodat deze processen op verschillende resoluties en tijdschalen bestudeerd kunnen worden. In de studies beschreven in dit proefschrift introduceren we een nieuwe methode, gebaseerd op vaste stof *nuclear magnetic resonance* (vsNMR), met aanvullende geavanceerde microscopietechnieken zoals hogesnelheid *atomic force microscopy* (HS-AFM) en confocale microscopie, en biofysische technieken zoals isothermale titratie-calorimetrie (ITC), om de moleculaire mechanismen van deze antibiotica op atomair niveau in relevante membraanomstandigheden te bestuderen (zie *figuur 1*). Dit maakt het mogelijk het supramoleculaire mechanisme van lipidebindende geneesmiddelen op biologische membranen holistisch te beschrijven.

Teixobactine en clovibactine zijn geïsoleerd uit (voorheen) niet-kweekbare groundbacteriën. Beide antibiotica richten zich op de voorlopers van de

biosynthetische route van peptidoglycaan, de lipide II-cyclus. Lipide II en andere celwandprecursoren zoals lipide I en C55PP zijn essentiële lipiden in het bacteriële celmembraan en zijn sterk geconserveerd (zie *figuur 2*, pagina 42). Middelen gericht op lipide II of andere voorlopers van celwandbiosynthese hebben per definitie zeer veel potentie om effectieve antibiotica te worden.

Figuur 1. Het deduceren van het werkingsmechanisme van antibiotica in verschillende resoluties (micrometer tot Ångström) met behulp van confocale microscopie, AFM en vsNMR, rechtstreeks op levende bacteriële cellen of in relevante membraanomgevingen.

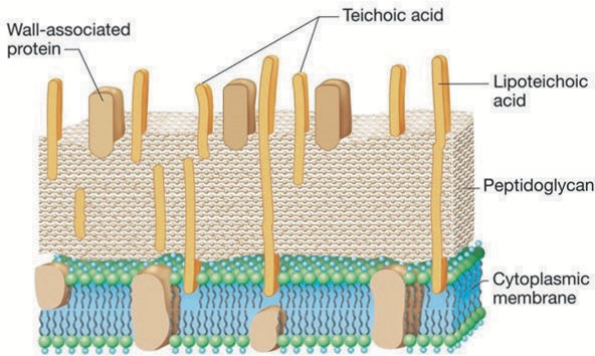


Uit ons onderzoek is gebleken dat teixobactine een dubbele werking heeft:

- i) het remmen van de peptidoglycaansynthese door binding aan lipide II;
- ii) het verstoren van het membraan door het vormen van grote supramoleculaire structuren die de bacteriële membraan destabiliseren.

Dr. R. Shukla, postdoctoral candidate AMOLF.
Correspondentieadres: r.shukla@amolf.nl.

Figuur 2. Een schematische weergave van de gram-positieve celenvlop, waarbij de prominente peptidoglycaanlaag in grampositieve bacteriën duidelijk zichtbaar is.



Ons onderzoek heeft aangetoond dat de enduracididine C-terminale kopgroep van teixobactine specifiek bindt aan de pyrofosfaat-suikergroep van lipide II, terwijl de N-terminus het pyrofosfaat van een ander lipide II-molecuul verplaatst. Deze configuratie bevordert de vorming van een β -sheet van aan het doelwit gebonden teixobactinen, waardoor een supramoleculaire fibrillaire structuur ontstaat. Deze supramoleculaire fibrillaire structuren tasten het bacteriële membraan vervolgens verder aan.

Clovibactine richt zich op de sterk geconserveerde pyrofosfaat (PPi)-groep van belangrijke celwandprecursoren zoals C55PP, lipide I, lipide II en lipide IIIWTA en vormt een 'hydrofobe handschoen' rond de PPi-groep. Zo'n ongewone interactie is vermoedelijk entropisch gunstig door het verwijderen van de fosfaatgebonden watermoleculen. De efficiënte en selectieve binding aan lipide II-precursoren wordt bereikt door de supramoleculaire complexvorming en daaropvolgende oligomerisatie tot de onomkeerbare assemblage van fibrillen. In tegenstelling tot de fibrillen van teixobactine zijn de fibrillen van clovibactine mobieler en nestelen ze zich niet zo diep in het membraanoppervlak. Omdat clovibactine geen specifieke interacties met de suikers heeft, is het nog beter bestand tegen de ontwikkeling van resistentie. Hoewel ze structureel verwant zijn, binden teixobactine en clovibactine dus op verschillende manieren aan de lipiden. De specifieke binding aan de geconserveerde componenten van de bacteriële celenvlop verklaart

waarom resistentieontwikkeling nagenoeg ontbreekt. Overkoepelend is wel duidelijk dat oligomerisatie en structuurvorming de kern vormen van hoe verschillende lipide II-gerichte antibiotica werken. En dus selectief op membranen die lipide II bevatten, waardoor geen toxiciteitsprobleem voor eukaryote cellen te verwachten is.

Het effect van membraanlading op het mechanisme van teixobactine

Bacteriële membranen zijn zeer dynamische structuren. Bacteriële cellen moduleren de samenstelling van hun membranen tijdens verschillende stadia van de groeicyclus en kunnen dit ook doen als reactie op externe stressfactoren zoals antibiotica. De bindingsaffiniteit van teixobactinen aan lipide II wordt sterk beïnvloed door de aanwezigheid van anionische lipiden. Het is dus belangrijk om de effecten van verschillende lipiden op het mechanisme van teixobactine te begrijpen, om een potentieel scenario van resistentie te begrijpen.

Op basis van onze huidige vsNMR-data blijkt dat niet alleen de lading, maar ook de verhouding van lipiden in het membraan de bindingsmodus van teixobactine sterk beïnvloedt. Verder onderzoek toont aan dat de negatief geladen lipiden, die ruim aanwezig zijn in bacteriële membranen, elektrostatich de binding van teixobactine aan het membraan vergemakkelijken. In het licht van deze resultaten speculeren we dat anionische lipiden een nucleatieplaats bieden waar vrije peptiden ook kunnen binden in niet-stoichiometrische verhoudingen. Het kan mogelijk aanleiding geven tot verschillende conformaties en tot veranderingen in de kinetiek van het systeem.

De inzichten over hoe deze nieuwe antibiotica werken tezamen met de verschillende technieken beschreven in dit proefschrift maken het mogelijk om nog betere middelen en therapieën te ontwikkelen om bacteriële pathogenen te doden, zonder de ontwikkeling van resistentie.

Dit artikel is gebaseerd op het proefschrift New Era of Lipid-Targeting Peptide Antibiotics, 2023, <https://doi.org/10.33540/1631>, ISBN 978-90-393-7535-8.

Antwoord en toelichting

Jaap Herderscheë, Caspar Hodiament



Het antwoord

Antwoord **b** is het door de toetsingscommissie beoogde antwoord.

Bespreking

Voor een effectieve behandeling zijn adequate concentraties van het antimicrobiële middel op de plek van de infectie noodzakelijk. Het acroniem ADME (absorptie, distributie, metabolisme, excretie) wordt gebruikt om de processen te beschrijven die de concentratie van een middel in het lichaam beïnvloeden [1]. Het concentratieverloop van een middel in de tijd is afhankelijk van de farmacokinetiek (PK). PK wordt vaak beschreven als “wat het lichaam doet met het middel” en wordt beïnvloed door factoren als: distributievolume, eiwitbinding en biologische beschikbaarheid. De relatie tussen de concentratie en het effect van het middel (op micro-organismen, op het lichaam) is de farmacodynamiek (PD). Ook wel bekend als “wat het middel doet met het lichaam”.

De relatie tussen PK en PD wordt uitgedrukt als PK/PD-index. De drie meest gebruikte indices zijn:

- 1) de totale blootstelling per tijdseenheid in relatie tot de MIC (AUC/MIC);
- 2) de maximale concentratie versus de MIC (C_{Max}/MIC);
- 3) de tijd dat de concentratie boven de MIC is (%T > MIC).

In deze formules wordt soms een ' f ' gebruikt om te specificeren dat het om de vrije, actieve stof gaat. Welke index het effect van het middel het beste voorspelt is primair afhankelijk van twee eigenschappen, te weten:

- 1) concentratie-afhankelijkheid, met andere woorden of hogere concentraties met snellere afdoding gepaard gaan;
- 2) of er na blootstelling persisterende effecten zijn [1,2].

Met behulp van deze twee eigenschappen kunnen drie groepen gedefinieerd worden:

- 1) concentratie-afhankelijke werking;
- 2) concentratie-onafhankelijke werking zonder persisterende effecten;
- 3) concentratie-onafhankelijke werking met persisterende effecten.

Concentratie-onafhankelijk kan ook als tijdsafhankelijk worden gelezen. Deze drie groepen zullen wij in het vervolg van dit artikel toelichten.

Amsterdam UMC, afdeling Medische Microbiologie en Infectiepreventie, dr. J. Herderscheë, aios medische microbiologie, dr. C. Hodiament, arts-microbioloog.
Correspondentieadres: J. Herderscheë
(j.herderschee@amsterdamumc.nl).

Bij het interpreteren van PK/PD-indices is het belangrijk rekening te houden met de afwijkende PK bij kritisch-zieke patiënten ten opzichte van niet-kritisch zieke patiënten [3]. Indices en doseringen bepaald in de ene patiëntengroep kunnen dus niet zonder meer bij andere patiëntengroep gebruikt worden.

De werking van aminoglycosiden, daptomycine, fluorochinolonen en metronidazol is *concentratie-afhankelijk*. Daarnaast is er bij deze middelen sprake van persisterende effecten. Dat wil zeggen dat

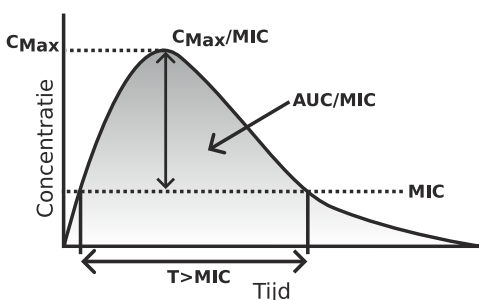
- 1) deze middelen bacteriën afdoden over een brede range van concentraties;
- 2) hogere concentraties de afdoding versnellen;
- 3) bacteriën een langdurige herstelperiode hebben na blootstelling aan het middel voordat zij weer kunnen groeien [2].

Voor deze groep middelen wordt meestal de C_{Max}/MIC of AUC/MIC gebruikt. De beste index is niet altijd eenduidig en er is niet altijd overeenkomst tussen diermodellen en data uit klinische studies [2]. Zo was in diermodellen de AUC/MIC de beste maat voor het effect van aminoglycosiden, terwijl dit in klinische trials de C_{Max}/MIC was [2]. De vraag is echter of dit daadwerkelijk de beste maat is, of de beste maat die met de data berekend kon worden [4]. Bij het kiezen van een doseringsschema moet naast het effect ook met bijwerkingen rekening gehouden worden. Zo is nefrotoxiciteit bij gentamicine gerelateerd aan te hoge dalspiegels; om nefrotoxiciteit te minimaliseren wordt gentamicine daarom eenmaal daags gedoseerd om een hoge maximale concentratie te combineren met een zo laag mogelijke dalspiegel [5]. Overigens zal bij

een eenmaaldaagse dosering de C_{Max}/MIC sterk gerelateerd zijn aan de AUC/MIC .

De groep waarbij het effect *concentratie-onafhankelijk* is *zonder langdurige effecten* omvat de bètalactamantibiotica. De werking is afhankelijk van de tijd dat de concentratie boven de MIC is (%T > MIC) [1,2]. Het verhogen van de concentratie boven de MIC heeft een zeer beperkt effect, de bactericide werking is in de regel maximaal bij een concentratie van drie tot vijf keer de MIC [2]. Met uitzondering van ceftriaxon en ertapenem is de halfwaardetijd van de in Nederland veelgebruikte bètalactamantibiotica kort. Om concentraties onder de MIC te vermijden moet dus frequent gedoseerd worden (het beoogde antwoord op de toetsvraag) of via verlengde/continue infusie [6]. Zo voorkwam continue infusie van cefotaxim bij het grootste deel (meer dan 95 procent) van kritisch-zieke patiënten dalspiegels < 1 mg/l (het cefotaximbreekpunt voor Enterobacterales) terwijl spiegels < 1 mg/l wel optraden bij ongeveer 30 procent van de patiënten die cefotaxim via intermitterende infusie toegediend kregen [7,8]. Of er bij kritisch-zieke patiënten een indicatie is voor continue infusie van ceftriaxon is minder eenduidig [9]. Bij deze patiëntengroep is verlengde infusie van anti-pseudomonale penicillinen (grotendeels piperacilline/tazobactam) en continue infusie van carbapenems (grotendeels meropenem) ook geassocieerd met een lagere mortaliteit en wordt daarom ook aanbevolen door de Sepsis SWAB-richtlijn [10,11]. In de betreffende meta-analyse werd geen statistisch significant verschil gevonden voor cefalosporinen. Mogelijk heeft dit een methodologische oorzaak: er waren slechts vijf heterogene studies met 145 patiënten geïnccludeerd. Bij gebrek aan klinische uitkomstmaten voor andere klinische situaties worden deze resultaten in combinatie met PK/PD-data vaak geëxtrapolerd naar een algemene voorkeur voor verlengde/continue infusie van alle bètalactamantibiotica met een korte halfwaardetijd. Het is echter lastig om te beoordelen of dit ook altijd noodzakelijk is omdat harde data omtrent het te halen target veelal ontbreken. Dierexperimenten met wekedeleninfecties en pneumonieën suggereren dat het effect van bètalactamantibiotica in die situaties reeds maximaal is wanneer de concentratie 60 tot 70 procent van de tijd boven de MIC is [2]. Dit is echter niet zonder meer van toepassing op mensen of in andere klinische situaties. Zo werd in een klinische studie met ernstig

Figuur 1. Veelgebruikte PK/PD-indices (gereproduceerd uit referentie [1]).



zieke patiënten die behandeld werden met ceftazidim en cefepime vaker genezing gezien bij de groep waarbij de concentratie 100 procent van de tijd boven de MIC was dan bij de groep die dit target niet haalde (82 versus 32 procent) [12]. Een intuïtieve manier om hier naar te kijken is dat het beste target bepaald wordt door patiënteigenschappen, de verwekker en het ziektebeeld.

De laatste groep bevat alle middelen met een *concentratie-onafhankelijke werking waarbij er wel sprake is van langdurige na-effecten*. Dit is een grote groep middelen, met onder andere de macroliden, clindamycine, tetracyclinen, linezolid en vancomycine. Net als bij de bètalactamantibiotica heeft het verhogen van de concentratie van het middel slechts een beperkt effect op de afdoding [2]. De AUC/MIC is de meest gebruikte index binnen deze groep, maar is niet voor ieder middel in deze groep aangetoond [5]. Van bovenstaande middelen worden in de dagelijkse praktijk alleen van vancomycine spiegels bepaald om de therapie te monitoren. Hierbij wordt een AUC/MIC-ratio met een target van ≥ 400 aanbevolen [13]. Bij een MIC van 1 mg/l is dit een AUC van ≥ 400 mg*h/l. Dit target is voornamelijk berekend op basis van retrospectieve studies bij patiënten met MRSA-bacteriëmiëën, maar wordt in de praktijk ook gebruikt voor coagulase-negatieve stafylokokken (CNS'en) en andere (doorgaans) vancomycinegevoelige micro-organismen zoals enterokokken. Belangrijk hierbij is dat het EUCAST-breekpunt van CNS'en tweemaal hoger ligt dan van *S. aureus* (4 en 2 mg/l respectievelijk) [8]. Om een AUC/MIC van ≥ 400 te behalen voor een stafylokok met een vancomycine MIC van 2 mg/l zou de AUC 800 mg*h/l moeten zijn. Vanaf een AUC van 600 mg*h/l wordt het risico op nefrotoxiciteit echter al onacceptabel geacht. Er is dus weinig therapeutische breedte om de hogere targets na te streven [13].

Samenvattend kunnen antimicrobiële middelen op basis van twee eigenschappen in drie groepen ingedeeld worden: concentratie-afhankelijk, concentratie-onafhankelijk zonder persisterende effecten, en concentratie-onafhankelijk met persisterende effecten. Deze groepen corresponderen met de PK/PD-index die het effect het beste voorspelt. Het is belangrijk te beseffen dat veel van de beschikbare PK/PD-data uit diermodellen komen ("mice lie and monkeys exaggerate"). Ook zijn er voor veel combinaties van

patiëntengroep en ziektebeeld geen klinische studies gedaan om PK/PD-principes direct te verbinden aan klinische uitkomsten.

Referenties

1. Asin-Prieto E, Rodriguez-Gascon A, Isla A. Applications of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) analysis of antimicrobial agents. *J Infect Chemother*. 2015; 21(5):319-29.
2. Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis*. 1998; 26(1):1-10; quiz 11-2.
3. Roberts JA, Abdul-Aziz MH, Lipman J, et al. Individualised antibiotic dosing for patients who are critically ill: challenges and potential solutions. *Lancet Infect Dis*. 2014; 14(6):498-509.
4. Drusano GL, Ambrose PG, Bhavnani SM, Bertino JS, Nafziger AN, Louie A. Back to the future: using aminoglycosides again and how to dose them optimally. *Clin Infect Dis*. 2007; 45(6):753-60.
5. Kucers' the use of antibiotics: a clinical review of antibacterial, antifungal, antiparasitic and antiviral drugs. Seventh edition ed. 2017, Boca Raton: CRC Press.
6. Grupper M, Kuti JL, Nicolau DP. Continuous and Prolonged Intravenous beta-Lactam Dosing: Implications for the Clinical Laboratory. *Clin Microbiol Rev*. 2016; 29(4):759-72.
7. Aardema H, Bult W, Van Hateren K, et al. Continuous versus intermittent infusion of cefotaxime in critically ill patients: a randomized controlled trial comparing plasma concentrations. *J Antimicrob Chemother*. 2019; dkz463.
8. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. v14.0. 2024.
9. Garot D, Respaud R, Lanotte P, et al. Population pharmacokinetics of ceftriaxone in critically ill septic patients: a reappraisal. *Br J Clin Pharmacol*. 2011; 72(5):758-67.
10. Vardakas KZ, Voulgaris GL, Maliaros A, Samonis G, Falagas ME. Prolonged versus short-term intravenous infusion of antipseudomonal beta-lactams for patients with sepsis: a systematic review and meta-analysis of randomised trials. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18(1):108-20.
11. Sieswerda E, Bax HI, Hoogerwerf JJ, et al. The Dutch Working Party on Antibiotic Policy (SWAB) guideline for empirical antibacterial therapy of sepsis in adults. Stichting Werkgroep Antibiotica Beleid. 2020.
12. McKinnon PS, Paladino JA, Schentag JJ. Evaluation of area under the inhibitory curve (AUC) and time above the minimum inhibitory concentration (T>MIC) as predictors of outcome for cefepime and ceftazidime in serious bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 31(4):345-51.
13. Rybak MJ, Le J, Lodise TP, et al. Therapeutic monitoring of vancomycin for serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A revised consensus guideline and review by the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, the Pediatric Infectious Diseases Society, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Am J Health Syst Pharm*. 2020; 77(11):835-64.

PROMOTIES

27 november 2023 - S. Rosendo Machado

Transcriptional regulation of host responses to virus infection in *Aedes aegypti* mosquitoes

Promotoren: prof. dr. ir. R.P. van Rij
 Copromotor: dr. P. Miesen
 Radboudumc Nijmegen, afd. Medische Microbiologie

4 december 2023 - V. Betting

Determinants of the piRNA regulatory potential in *Aedes* mosquitoes

Promotor: prof. dr. ir. R.P. van Rij
 Copromotor: dr. P. Miesen
 Radboudumc Nijmegen, afd. Medische Microbiologie

6 december 2023 - P.M. Kolijn

Immuunogenetische en proteoomanalyses voor verbeterde minimaal-invasieve vroegdetectie van lymfatische maligniteiten

Promotoren: prof. dr. A.W. Langerak en prof. dr. ir. R.C.H. Vermeulen
 Erasmus MC Rotterdam, afd. Immunologie. Universiteit Utrecht

15 december 2023 - B.M. ter Ellen

Viral inflammation: Sensing, signaling, safeguarding: DENV and SARS-CoV-2

Promotor: prof. dr. J.M. Smit
 Copromotoren: dr. I.A. Rodenhuis-Zybert en dr. J.Moser
 UMC Groningen, afd. Medische Microbiologie en Infectiepreventie

17 januari 2024 - C. Andolina

From a little spark may burst a flame
 "Understanding the dynamics and infectivity of asymptomatic *P. falciparum* infections

Promotor: prof. dr. J.T. Bousema
 Radboudumc Nijmegen, afd. Medische Microbiologie

24 januari 2024 - D.K. Bhatt

Oncolytic Virotherapy – Analysis, design, models

Promotoren: prof. dr. C.A.H.H. Daemen en prof. dr. R. Chammas
 Copromotoren: dr. C. Oyarce Diaz en dr. L. Nogueira de Sousa Andrade
 UMC Groningen, afd. Medische Microbiologie en Infectiepreventie

25 januari 2024 - M.A. Molina Beitia

Composition and dynamics of the cervicovaginal microbiome in relation to hrHPV infections

Promotor: prof. dr. M.A. Huijnen
 Copromotoren: dr. W.P.J. Leenders en dr. K.M. Andralojc
 Radboud UMC Nijmegen, afd. Medische Microbiologie

25 januari 2024 - A.C.M. de Bruin

Highly Pathogenic Avian Influenza Virus

Promotor: prof. dr. R.A.M. Fouchier
 Copromotor: dr. M.J. Richard
 Erasmus MC Rotterdam, afd. Viroscience

ORATIE

31 januari 2024 - S.M.H. Zweijpfenning

Non-tuberculous mycobacteria: Turning the antibiotic nightmare around

Promotor: prof. dr. M.J. Boeree
Copromotoren: dr. W. Hoefsloot en
dr. J. van Ingen
Radboudumc Nijmegen, afd. Medische
Microbiologie

8 februari 2024 - A.M. Tanmoy

Salmonella enterica serovar *Typhi* in Bangladesh:
Antimicrobiële resistentie en genomische
achtergrond

Promotoren: prof. dr. H.P. Endtz en
prof. dr. S.K. Saha
Copromotor: dr. F. Komurian-Pradel
Erasmus MC Rotterdam, afd. Medische
Microbiologie en Infectieziekten.
Bangladesh Institute of Child Health

20 februari 2024 - K.S. Schmitz

Disease models for treatment or prevention of
respiratory virus infections

Promotor: prof. dr. R.L. de Swart
Copromotor: dr. R.D. de Vries
Erasmus MC Rotterdam, afd. Viroscience

11 april 2024 - Prof. dr. M.I. de Jonge

Prof. dr. M.I. (Marien) de Jonge, hoogleraar aan
Radboudumc Nijmegen met de leeropdracht
Infectie en Immuniteit houdt zijn inaugurele rede,
getiteld "Een dorst naar kennis".

Radboudumc Nijmegen, afd. Laboratorium-
geneeskunde



Nederlandstalige Tuberculose Diagnostiek Dagen 2024

Tuberculose Diagnostiek Dagen 2024

13 & 14 juni 2024

Landgoed Hotel Holthurnsche Hof
Zevenheuvelenweg 48A
6571 CK Berg en Dal