

Poteškoće u dijagnostici neuroborelioze

Oktavija ĐAKOVIĆ-RODE, mr. sc., dr. med.
Snježana ŽIDOVEC-LEPEJ, viši
znanstveni suradnik, dr. sc., dipl. ing.
Tomislav MARETIĆ, mr. sc., dr. med.,
specijalist infektolog

Klinika za infektivne bolesti »Dr. Fran
Mihaljević«, Zagreb

Ključne riječi

Borrelia burgdorferi
neuroborelioza
serološka dijagnostika
indeks protutijela likvor/serum
poteškoće

Key words

Borrelia burgdorferi
neuroborreliosis
serological diagnostics
cerebrospinal fluid/serum antibody index
difficulties

Primljeno: 2006-06-07

Received: 2006-06-07

Prihvaćeno: 2006-06-27

Accepted: 2006-06-27

Znanstveni članak

Neuroborelioza se može manifestirati različitim neurološkim poremećajima koje uzrokuju bakterije *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.). Kliničke manifestacije neuroborelioze nisu patognomonične. Etiološka dijagnoza neuroborelioze uglavnom se temelji na serološkim testovima i određivanju specifičnih protutijela za *B. burgdorferi* s.l. u likvoru. Fenotipske razlike vrsta *B. burgdorferi* s.l., razlike u njihovoj antigenoj strukturi, zemljopisnoj rasprostranjenosti te sposobnosti bolesnika za učinkovitu imunoreakciju određuju specifični humoralni odgovor. U dijelu bolesnika s neuroboreliozom protutijela se sintetiziraju samo intratekalno. Stoga je neophodno istovremeno testirati serum i likvor te odrediti indeks protutijela likvor/serum. U ovom radu analizirani su rezultati serološke dijagnostike 28 bolesnika s kliničkom dijagnozom neuroborelioze. Specifična protutijela IgM i IgG za *B. burgdorferi* s.l. određena su u serumu i likvoru rekombinantnim neizravnim imunoenzimskim testom (rELISA; Biomedica, Wien, Austria) te ELISA metodom »hvatanja« (engl. *capture*) za procjenu intratekalnih protutijela određivanjem indeksa protutijela (cELISA; IDEIA Lyme Neuroborreliosis, Dako, Denmark). Svi reaktivni rezultati u serumu potvrđeni su metodom Western blot (WB; Mikrogen, Germany or DPC Biermann GmbH, Germany). Specifični indeks protutijela u cELISA definiran je prema preporuci proizvođača. Intratekalna protutijela za *B. burgdorferi* s.l. dokazana su u 11 od 28 (39,3%) pacijenata pomoću cELISA i indeksa protutijela likvor/serum. Detektabilna protutijela u likvoru primjenom rELISA nađena su u 21 od 28 (75%) pacijenata. U 19 od 28 (67,9%) pacijenata rezultati rELISA potvrđeni su metodom WB. Sve serološke rezultate treba interpretirati u skladu s kliničkim i epidemiološkim podacima i koristiti ih za potvrdu kliničke dijagnoze, budući da serološki testovi za dokazivanje protutijela za *B. burgdorferi* nisu još standardizirani.

Difficulties in neuroborreliosis diagnostics

Scientific article

Neuroborreliosis includes a variety of neurological disorders caused by *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Clinical manifestation of neuroborreliosis is not pathognomonic. The etiological diagnosis is based mainly on serological tests and determination of specific anti-*B. burgdorferi* antibodies in cerebrospinal fluid (CSF). Specific antibodies response is influenced by phenotypic differences among *B. burgdorferi* species, different antigenic structure, their different geographic spreading, and patient's possibility to react to infection. In some patients with neuroborreliosis antibodies could be produced only intrathecally. Therefore, it is always necessary to test serum and CSF simultaneously and determine the CSF/serum antibody index. In our study serological results of 28 patients with clinical diagnosis of neuroborreliosis were analyzed. Serum and CSF anti-*B. burgdorferi* IgM and IgG antibodies were determined by recombinant indirect ELISA (rELISA; Biomedica, Wien, Austria) and capture ELISA for intrathecal antibody synthesis detection by CSF/serum antibody index determination (cELISA; IDEIA Lyme Neuroborreliosis, Dako, Denmark). All sera positive results were confirmed by Western blot (WB; Mikrogen,

Germany or DPC Biermann GmbH, Germany). The specific antibody index in cELISA was calculated as defined by manufacturer. 11/28 (39,3%) patients had proved intrathecal antibodies to *B. burgdorferi* by cELISA antibody index. 21/28 (75,0 %) patients had significant CSF antibody titre by rELISA. 19/28

(67,9 %) patients had confirmed rELISA results by WB. All serological results should be interpreted according to clinical and epidemiological data and used to confirm the clinical diagnosis, while serologic assays for anti-*B. burgdorferi* antibodies have not been standardized yet.

Uvod

Neuroboreliozu se može manifestirati različitim neurološkim poremećajima koje uzrokuju veoma pokretne spirohete iz roda *Borrelia* [1]. Prema homologiji DNA borelije su svrstane u 12 vrsta. Bolesti u ljudi najčešće su povezane s 3 vrste borelija: *Borrelia afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi* sensu stricto (»u užem smislu«), koje zajednički nazivamo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (»u širem smislu«) [2, 3]. Opisi bolesti uzrokovanih drugim vrstama borelija (*B. bisettii*, *B. lusitanae* i *B. spielmanii*) su rijetki. Nije poznato uzrokuju li vrste *B. valaisiana*, *B. japonica*, *B. sinica*, *B. tanukii*, *B. turdi* i *B. andersonii* bolesti u ljudi. U Europi nalazimo sve za čovjeka patogene vrste, za razliku od Sjeverne Amerike gdje je jedina patogena vrsta *B. burgdorferi* sensu stricto. U Aziji se nalaze za čovjeka patogene *B. afzelii* i *B. garinii* [4].

Prirodni rezervoari borelija su brojne domaće i divlje životinje, posebice mali glodavci i ptice. Prijenos s jedne životinjske vrste na drugu osiguravaju krpelji iz roda *Ixodes*. Različite vrste krpelja obitavaju na različitim geografskim područjima, što je povezano s raširenošću vrsta borelija. U Europi najvažniju ulogu u širenju humanih infekcija ima krpelj *Ixodes ricinus* koji parazitira i na čovjeku. U Sjevernoj Americi se nalaze druge vrste krpelja *I. pacificus* i *I. scapularis*, dok u Aziji prevladava *I. persulcatus* [4].

Sojevi *B. burgdorferi* sensu lato su genetički varijabilni. *Borrelia* spp. ima vrlo mali bakterijski genom (910 kb), ali i devet cirkularnih plazmida kao i 12 linearnih plazmida [5]. *B. burgdorferi* sensu lato sastoji se od stotinjak različitih proteina veličine 15 do 110 kD čije antigenske determinante potiču nastanak specifičnih protutijela. Heterogenost antigenskih determinanti, a time i sintetiziranih protutijela od posebnog je značenja za serološke testove što uvelike otežava standardizaciju metoda [2, 4].

Kliničke manifestacije neuroborelioze nisu patognomonične. Neuroboreliozu može zahvatiti središnji i periferni živčani sustav. Manifestirati se može kao rana i kasna neuroboreliozu. Najčešća klinička slika rane neuroborelioze je meningoradikuloneuritis (Garin-Bijadoux-Bannwarthov sindrom), kasnije s perifernom neuropatijom i često pridruženim acrodermatitis chronica atrophicans. Garin-Bijadoux-Bannwarthov sindrom se najčešće javlja unutar oko 4 mjeseca nakon uboda krpelja iako ponekad mogu još biti prisutne kožne manifestacije erythema migrans. Rana neuroboreliozu može se manifestirati i kao oštećenje perifernih živaca i serozni meningitis

ili meningoencefalitis. Ako je oštećenje središnjeg ili perifernog živčanog sustava prisutno 6 mjeseci ili dulje nakon borelijske infekcije radi se o kasnoj neuroboreliozu. Kasna neuroboreliozu razvija se izrazito rijetko, a može se pojaviti kao kronični borelijski limfocitni meningitis i kronični borelijski encefalomijelitis te periferna neuropatija uz najčešće acrodermatitis chronica atrophicans. U likvoru se nalazi limfocitna pleocitoza i intratekalna sinteza borelijskih protutijela, a moguće je borelije dokazati i kultiviranjem likvora na posebnim hranilištima [6, 7].

Etiološka dijagnoza neuroborelioze temelji se na serološkim testovima i određivanju protutijela za *B. burgdorferi* s.l. u likvoru [8, 9, 10]. Specifični humoralni odgovor određuju fenotipske osobitosti borelija, razlike u njihovoj antigenoj strukturi, zemljopisnoj rasprostranjenosti te sposobnosti domaćina za učinkovitu imunoreakciju [11]. U dijela bolesnika s neuroboreliozom stvaraju se samo intratekalna protutijela. Neophodno je pravilno procijeniti porijeklo likvorskih protutijela. Za procjenu se određuje indeks protutijela (engl. *antibody index*; AI) odnosno odnos količina protutijela između istovremeno oduzetog likvora i seruma [10]. Iz likvora i seruma treba istovremeno odrediti specifična protutijela i ukupne imunoglobuline ili tzv. »surogat« protutijela (ubikvitarno prisutna protutijela u zdravih). Uspoređuje se omjer determiniranih specifičnih protutijela u likvoru i serumu i omjer ukupnih imunoglobulina ili protutijela za ubikvitarnog uzročnika nađenih u istim uzorcima likvora i seruma. Zdrave osobe imaju indeks protutijela od 0,5–1,5. Značajan nalaz za potvrdu intratekalne sinteze protutijela je vrijednost indeksa veća od 2. Za definiranje likvorskih protutijela za borelije koja su determinirana klasičnim serološkim postupcima, komercijalno je dostupan test koji uključuje istovremeno testiranje likvora i seruma i omogućuje procjenu značajnosti intratekalne proizvodnje preračunanjem AI prema napatku proizvođača (IDEIA Lyme Neuroborreliosis, Dako, Denmark). Osnovno je ipak da se svaki nalaz interpretira u skladu s kliničkom slikom.

Cilj ovog istraživanja bio je prikazati različitosti serološkog odgovora u bolesnika s kliničkom dijagnozom neuroborelioze te ukazati na moguće poteškoće u interpretaciji rezultata seroloških testova.

Materijali metode

Istraživanje je provedeno u Odsjeku za serološku dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti »Dr. Fran Mihailević« u Zagrebu. U istraživanje je uključeno 28 pacije-

nata s kliničkom dijagnozom neuroborelioze (10 žena i 18 muškaraca).

Specifična protutijela IgM i IgG za *B. burgdorferi* određena su u istovremeno oduzetim uzorcima seruma i likvora rekombinantnim indirektnim imunoenzimskim testom (rELISA, Biomedica, Wien, Austria). Svi pozitivni rezultati rELISA potvrđeni su metodom Western blot (WB; Mikrogen, Germany ili DPC Biermann GmbH, Germany). Likvori s reaktivnim protutijelima dodatno su testirani zajedno sa istovremeno oduzetim serumima ELISA metodom »hvatanja« specifičnih protutijela (engl. *capture*; cELISA; IDEIA Lyme Neuroborreliosis, Dako, Denmark). Specifični indeks protutijela (AI) definiran je prema preporuci proizvođača cELISA kao omjer izmje-

renih optičkih gustoća vezanih protutijela iz likvora i seruma (OD; engl. *optical density*):

$$AI = OD(CSF) / OD(serum) \times [OD(CSF) - OD(serum)]$$

Vrijednosti AI 0,3 i veće smatrane su potvrđnima za intratekalnu proizvodnju protutijela za borelije.

Rezultati

Rezultati serološke obrade pacijenata distribuiranih prema kliničkim uputnim dijagnozama u kojim se diferencijalno-dijagnostički radilo o neuroboreliozii prikazani su u tablici 1. Detektabilna protutijela u likvoru metodom rELISA nađena su u 21 od 28 (75%) pacijenata. Intrate-

Tablica 1. Rezultati serološke obrade 28 bolesnika s kliničkom dijagnozom neuroborelioze

Table 1. Serological results in 28 patients with neuroborreliosis clinical diagnosis

Inicijali pacijenta/dob (godine)/spol	Klinička dijagnoza	Titar protutijela u serumu*		Titar protutijela u likvoru*		WB (serum)		Neuroborreliosis L/S indeks (AI)**	
		IgM razrjeđenje 1:101	IgG razrjeđenje 1:101	IgM razrjeđenje 1:3	IgG razrjeđenje 1:5	IgM	IgG	IgM	IgG
BR/47/M	Borreliosis	4,24	2,73	5,92	7,26	negativno	negativno	0	0
AS/7/M	Neuroborreliosis	14,56	8,53	0,40	0,72	pozitivno	negativno	0,7	7,9
SH/10/M	Neuroborreliosis	26,42	33,61	63,23	49,30	pozitivno	negativno	0,3	19,8
RR/68/M	Neuroborreliosis	6,42	5,48	2,17	33,08	negativno	pozitivno	1,2	2,3
SK/57/M	Neuroborreliosis	1,76	24,25	0,01	36,20	negativno	pozitivno	0	44,6
AS/52/Ž	Neuroborreliosis	2,86	40,70	0,26	23,96	pozitivno	pozitivno	0	0
LC/8/M	Neuroborreliosis	15,14	5,78	0,72	0,27	negativno	negativno	0	0
DZ/60/Ž	Neuroborreliosis	5,40	25,92	0,23	2,54	negativno	pozitivno	0	0
KD/52/Ž	Lyme borreliosis	6,91	4,43	5,45	3,42	pozitivno	negativno	0	0
JD/57/M	ECM, Paresis n. facialis	14,57	20,03	3,02	22,39	pozitivno	pozitivno	2,1	14,6
BM/25/M	Paresis n. facialis	33,63	17,29	37,79	13,98	pozitivno	pozitivno	0	2,4
MS/74/Ž	Paresis n. facialis	69,68	49,49	2,16	45,89	pozitivno	pozitivno	0	1,1
BS/8/M	Paresis n. facialis	38,27	19,44	38,17	17,23	pozitivno	pozitivno	0,1	11,0
SV/61/M	Laesio radialis L2–L4	88,12	48,03	52,96	49,95	pozitivno	pozitivno	0	2,9
MP/41/Ž	Meningoencephalitis	42,16	9,03	70,79	43,91	pozitivno	pozitivno	0,9	15,7
JM/76/M	Meningoencephalitis	27,07	63,67	11,69	57,00	pozitivno	pozitivno	0	0
MD/65/Ž	Meningoencephalitis	13,50	31,49	0,06	1,64	pozitivno	pozitivno	0	0
DS/41/M	Meningoencephalitis	4,96	28,58	0,61	13,57	negativno	negativno	0	0
DZ/33/M	Meningoencephalitis	3,32	29,41	0,23	7,45	negativno	negativno	0	0
BSD/45/Ž	Meningoencephalitis	1,74	11,63	1,06	4,77	negativno	pozitivno	0	0
SB/37/Ž	Meningoencephalitis	1,79	24,50	2,20	2,26	negativno	negativno	0	0
GG/71/M	Meningitis	5,28	47,88	0,23	41,91	negativno	pozitivno	0	0
IO/54/M	Meningitis	7,28	40,93	0,13	6,62	pozitivno	pozitivno	0	0
DH/59/Ž	Meningitis	5,15	42,87	0,18	13,00	negativno	negativno	0	0
SP/59/M	Meningitis	2,69	21,09	0,05	4,88	negativno	negativno	0	0
ZS/66/M	Meningomyelitis	2,69	46,99	0,32	45,24	negativno	negativno	0	0
SP/6/M	Cerebellitis	48,43	16,54	10,22	14,42	negativno	negativno	0,2	8,4
MP/30/Ž	Neuroretinitis	17,50	47,19	0,19	17,74	pozitivno	pozitivno	0	0

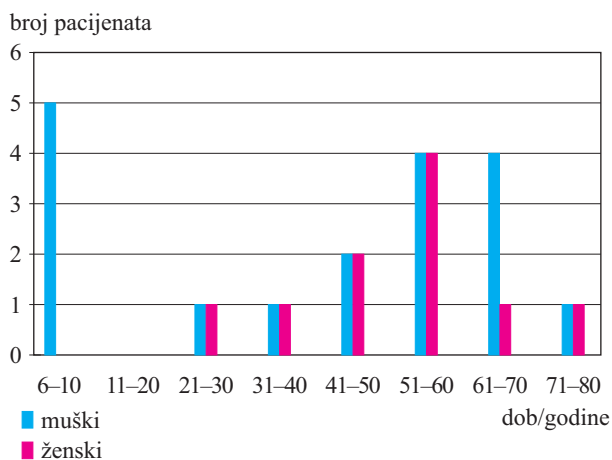
* Titar protutijela određen rELISA i izražen u jedinicama BBU: 1,0–9,0 BBU=negativno; 9,1–10,9 BBU=granično; >=11,0 BBU=pozitivno
Reaktivna protutijela u likvoru = 5,0 BBU

** L/S indeks (AI) *antibody index* odnos likvorskih i serumskih protutijela; pozitivno >=0,3

Tablica 2. Različitost u serološkim nalazima u pacijenata s klinički vjerojatnom neuroboreliozom**Table 2.** Variability of serological findings in patients with clinically probable neuroborreliosis

Protutijela za <i>B. burgdorferi</i> s.l. (metoda)	Serološki nalazi									
	pozitivno	pozitivno	pozitivno	pozitivno	pozitivno	pozitivno	pozitivno	pozitivno	negativno	negativno
IgM/IgG u serumu (rRLISA)	pozitivno	pozitivno	pozitivno	pozitivno	pozitivno	pozitivno	pozitivno	pozitivno	negativno	negativno
IgM/IgG u likvoru (rELISA)	pozitivno	pozitivno	pozitivno	negativno	negativno	pozitivno	negativno	negativno	pozitivno	pozitivno
IgM/IgG WB	pozitivno	pozitivno	negativno	pozitivno	pozitivno	negativno	negativno	negativno	pozitivno	negativno
AI* (cELISA) Neuroborreliosis	pozitivno	negativno	negativno	negativno	pozitivno	pozitivno	negativno	negativno	pozitivno	negativno
Broj pacijenata	8 (28 %)	6 (20 %)	4 (14 %)	3 (11 %)	1 (4 %)	1 (4 %)	3 (11 %)	1 (4 %)	1 (4 %)	1 (4 %)

* AI = indeks protutijela (*antibody index*)



Slika 1. Raspodjela pacijenata prema dobi i spolu
Picture 1. Distribution of patients according to age and gender

kalna specifična protutijela za *B. burgdorferi* potvrđena su u 11 od 28 pacijenata (39,3 %) pomoću cELISA indeksa protutijela (Tablica 1). Među njima 4 je imalo uputnu dijagnozu neuroborelioze, 4 pareze ličnog živca, a po jedan je imao dijagnozu lezije radikularnog živca L2–L4, meningoencefalitisa i cerebelitisa. WB je napravljen za sve reaktivne rezultate iz rELISA seruma. Rezultati rELISA potvrđeni su metodom WB u 19 od 28 (67,9 %) pacijenata. U jednog pacijenta s pozitivnim nalazom likvorskih protutijela u rELISA i cELISA WB je ostao nereaktivan.

Prema rezultatima serološke obrade i pozitivnim nalazima pacijenti su pokazivali 9 različitih kombinacija imunološkog odgovora što je prikazano u tablici 2. Neuroboreliozu je potvrđena u 8 pacijenata u kojih su svi testovi

bili pozitivni, te u 3 s dokazom intratekalne produkcije protutijela za borelije. U 6 se nije moglo dokazati intratekalnu sintezu iako su borelijska protutijela bila u likvoru reaktivna metodom rELISA.

Između 28 ispitanika 64 % su bili muškarci. Intratekalna sinteza potvrđena je u 2 žene i 9 muškaraca. Iako se radi o malom uzorku zanimljivo je da je u dječjoj dobi (6–10 godina) bilo 6 dječaka i ni jedna djevojčica. Ostale dobne skupine su bile jednakomjerno zastupljene prema dobi (Slika 1).

Diskusija

Dijagnoza neuroborelioze temelji se na kliničkim i epidemiološkim podacima, ali treba biti potvrđena valjanim dijagnostičkim testovima. Metode za dokazivanje borelija mogu se podijeliti na izravne i neizravne. Izravne dijagnostičke metode uključuju uzgoj bakterije u hranilištu, dokazivanje genoma bakterije kao i imunohistokemijsko dokazivanje borelija u tkivu. U neizravne metode dokazivanja borelijske infekcije ubrajamo određivanje specifičnih protutijela kao i dokazivanje aktiviranih T-limfocita [4, 8–12].

Uzgoj borelija na hranilištu (tzv. kultivacija) najbolji je dokaz infekcije, posebice u bolesnika s netipičnom kliničkom prezentacijom i u bolesnika kod kojih ne nastaje specifična humoralna imunoreakcija. Međutim, kultivacija je tehnički zahtjevna i dugotrajna metoda te se primjenjuje samo u posebno opremljenim laboratorijima [12].

Stoga se danas u rutinskoj dijagnostici kao potvrda kliničke dijagnoze neuroborelioze koristi detekcija speci-

fičnih protutijela razreda IgM i IgG na različite borelijske antigene. U pacijenata s kliničkom dijagnozom neuroborelioze potrebno je istovremeno detektirati protutijela specifična za *B. burgdorferi* s.l. u serumu i likvoru te procijeniti značenje nalaza likvorskih protutijela [10]. Određivanje specifičnih protutijela u likvoru je ključno za one bolesnike kod kojih se sintetiziraju samo intratekalna ali ne i serumska protutijela. Različite antigenske komponente borelija povezane s borelijskim fenotipom i raširenošću u prirodi ovisno o geografskom području uvjetuju nastanak specifičnog imunogenog odgovora. Stvaranje protutijela ovisi i o sposobnosti domaćina za učinkovitu imunoreakciju. Heterogenost humoralne specifične imunoreakcije u serumu i likvoru kao i rezultata različitih seroloških testova pokazana je i u naših ispitanika [6].

Dijagnostička vrijednost serologije ovisi o individualnoj sintezi protutijela u zaraženom domaćinu tijekom infekcije i bolesti, ali i o kvaliteti primijenjenih seroloških testova [13]. Serološki testovi za detekciju protutijela specifičnih za *B. burgdorferi* još nisu standardizirani i potrebno ih je interpretirati u kontekstu dostupnih epidemioloških i kliničkih podataka. Primjerice, Kaiser i suradnici [14] su analizirali lažno negativne rezultate serološkog testiranja seruma i likvora u 79 bolesnika s kliničkom dijagnozom neuroborelioze primjenom testova s antigenima iz samo jednog soja *B. burgdorferi* s.l. (*B. burgdorferi* s.s. BbZ160, *B. garinii* Bbii50 i *B. afzelii* PKO). Rezultati tog istraživanja jasno su pokazali da primjenom testova koji se temelje na antigenima samo jednog soja borelija postoji veća mogućnost pojave lažno negativnih rezultata u početnoj fazi kliničke prezentacije neuroborelioze. Protutijela se mogu stvarati sporo što također može biti razlog lažno negativnog rezultata. Stoga je neophodno za potvrdu dijagnoze uzeti i testirati parne uzorke seruma i likvora u razmaku od oko 4–6 tjedana.

Molekularne metode, posebice PCR u realnom vremenu mogu se primijeniti za detekciju, direktnu genotipizaciju i taksonomsku klasifikaciju *B. burgdorferi* s.l. ali nisu dio rutinske dijagnostike neuroborelioze. Primjerice, Gooskens i sur. (15) su razvili PCR u realnom vremenu koji se temelji na detekciji ospA gena *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii* i *B. valaisiana* vrlo visoke osjetljivosti (1–10 fg *Borrelia* DNK odnosno 1–5 spiroheta). Međutim, primjenom PCR-a u realnom vremenu detektirali su *B. burgdorferi* s.l. samo u 50% bolesnika s neuroboreliozom. Jedan od najvažnijih preduvjeta za moguću primjenu molekularnih metoda u rutinskoj dijagnostici neuroborelioze bit će usaglašavanje oko ciljane sekvence genoma koja će biti odabrana za amplifikaciju.

U liječenju neuroborelioze preporuča se provođenje parenteralne terapije 2 do 4 tjedna antibioticima koji dobro prolaze kroz krvno-moždanu membranu i dostižu visoke koncentracije u središnjem živčanom sustavu. Iznimno se kod pacijenata s parezom ličnog živca kod kojih

nema patološkog nalaza u likvoru liječenje može provoditi peroralnom terapijom. Učinkovitost liječenja se procjenjuje oporavkom neurološkog statusa te normalizacijom pleocitoze u likvoru. Serumska i intratekalna protutijela često dugo perzistiraju u bolesnika te se za praćenje uspjeha liječenja njihovo daljnje određivanje ne preporučuje [16–18].

U zaključku želimo istaknuti da niti jedan pozitivni serološki test nije sam za sebe pokazatelj aktivnosti bolesti, bez obzira na visinu razine protutijela. Prisutnost reaktivnih protutijela u serološkim testovima nije dostatna za postavljanje dijagnoze ako ne postoje jasni klinički simptomi neuroborelioze. Serološka dijagnostika neuroborelioze obvezno uključuje istovremenu detekciju specifičnih protutijela u serumu i likvoru te procjenu intratekalne sinteze određivanjem indeksa protutijela.

Literatura

- [1] Nadelman RB, Wormser GP. Lyme borreliosis. *Lancet* 1998;352:557–565.
- [2] Picken RN, Strle F, Picken MM, Ruzic-Sabljić E, Maraspin V, Lotric-Furlan S, Cimperman J. Identification of three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* and *B. afzelii*) among isolates from acrodermatitis chronica atrophicans lesions. *J Invest Dermatol* 1998;110:211–214.
- [3] Hubalek Z, Halouzka J. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur J Epidemiol* 1997;13:951–957.
- [4] Ružić-Sabljić E. Osobitosti uzročnika Lyme borelioze. *Infektol glasnik* 2002;22(2):41–43.
- [5] Casjens S, Palmer N, van Yugt R, Huang WM, Stevenson B, Rosa P, Lathigra R, Sutton G, Peterson J, Dodson RJ, Haft D, Hickey E, Gwinn M, White O, Fraser CM. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol* 2000;35:490–516.
- [6] Strle F, Ruzic-Sabljić E, Cimperman J, Lotric-Furlan S, Maraspin V. Comparison of findings for patients with *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* isolated from cerebrospinal fluid. *Clin Infect Dis* 2006;43:704–10.
- [7] Kristoferitch W. Neurological manifestations of Lyme borreliosis: Clinical definition and differential diagnosis. *Scand J Infect Dis* 1991;77(suppl):64–73.
- [8] DePietropaolo DL, Powers JH, Gill JM, Foy AJ. Diagnosis of Lyme disease. *Del Med J* 2006;78:11–8.
- [9] Hauser U, Lehnert G, Lobentzner R, Wilske B. Interpretation criteria for standardized Western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *J Clin Microbiol* 1997;35:1433–44.
- [10] Bunikis J, Barbour AG. Laboratory testing for suspected Lyme disease. *Med Clin North Am* 2002;86:311–40.
- [11] Wilske B. Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2003;3:215–27.
- [12] Đaković Rode O, Ružić Sabljić E. Lyme boreliozna – diferencijalno dijagnostičke poteškoće u interpretaciji seroloških rezultata. *Infektol glasnik* 2002;22(2):45–49.

- [13] Smismans A, Goossens VJ, Nulens E, Bruggeman CA. Comparison of five different immunoassays for the detection of *Borrelia burgdorferi* IgM and IgG antibodies. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:648–655.
- [14] Kaiser R. False-negative serology in patients with neuroborreliosis and the value of employing of different borrelial strains in serological assays. *J Med Microbiol* 2000;49:911–45.
- [15] Gooskens J, Templeton KE, Claas EC, van Dam AP. Evaluation of an internally controlled real-time PCR targeting the ospA gene for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in cerebrospinal fluid. *Clin Microbiol Infect* 2006;12:894–900.
- [16] Strle F. Principles of the diagnosis and antibiotic treatment of Lyme borreliosis. *Wien Klin Wochenschr* 1999;111:911–915.
- [17] Ruzic-Sabljić E, Podreka T, Maraspin V, Strle F. Susceptibility of *Borrelia afzelii* strains to antimicrobial agents. *Int J Antimicrob Agents* 2005;25:474–8.
- [18] Pfister HW, Rupprecht TA. Clinical aspects of neuroborreliosis and post-Lyme disease syndrome in adult patients. *Int J Med Microbiol* 2006;296:11–56.