

Pregledni rad | Review paper

## Zamke i dobrobiti serološke dijagnostike lajmske borelioze iz laboratorijske perspektive

### Pitfalls and Benefits of Serological Diagnosis of Lyme Borreliosis From a Laboratory Perspective

Eva Ružić-Sabljić<sup>1</sup>, Oktavija Đaković Rode<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb; Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu; Zagreb, Hrvatska

#### Ključne riječi:

Lajmska borelioza  
serološka dijagnostika  
*Borrelia burgdorferi*

#### Keywords:

Lyme borreliosis  
serological diagnosis  
*Borrelia burgdorferi*

Primljeno: 17-05-2021

Received: 17-05-2021

Prihvaćeno: 18-06-2021

Accepted: 18-06-2021

#### ✉ Adresa za korespondenciju:

Doc.prim.dr.sc. Oktavija Đaković Rode, dr. med. specijalist  
medicinske mikrobiologije i parazitologije  
Klinika za infektivne bolesti „Dr Fran Mihaljević“,  
Mirogojska 8, 10000 Zagreb  
e-mail: orode@bfm.hr

#### Sažetak

Lajmska borelioza (LB) je bolest koju u Europi najčešće uzrokuju borelije kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato, dok je u Sjevernoj Americi jedino patogena *B. burgdorferi* sensu stricto. Kliničke manifestacije LB su polimorfne. Postavljanje dijagnoze temelji se na kliničkoj slici i epidemiološkim podacima o vjerojatnosti kontakta s krpeljima uz primjenu mikrobiološke dijagnostike. Najčešća je rutinska dijagnostika serologija za određivanje i praćenje dinamike specifičnih protutijela IgM i IgG. Nakon primarnog testiranja, rezultate je potrebno potvrditi dodatnim testom visoke specifičnosti. U područjima visoke prevalencije, specifičnost rezultata visoko osjetljivog i specifičnog testa nije obvezno dodatno potvrđivati. I pozitivni i negativni nalazi moraju se interpretirati klinički. Serološka dijagnostika predstavlja dobrobit za prepoznavanje i liječenje bolesnika samo ako se rezultati interpretiraju temeljem poznavanja patogeneze, kliničke slike i imunogenog odgovora kao i karakteristika korištenog testa. Karakteristike samih borelija i prezentacije antigena, izbjegavanje imunogenog odgovora, dostupnost različitih testova kao i Interneta predstavljaju zamke, posebno ako se slijede neproverjene informacije.

#### Summary

Lyme borreliosis (LB) in Europe is most commonly caused by different borrelia of *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, while in North America the only pathogen is *B. burgdorferi* sensu stricto. Clinical manifestations of LB are polymorphic. Diagnosis is based on the clinical presentation and epidemiological data on the likelihood of contact with ticks and with the application of microbiological diagnostics. The most common routine diagnosis is serology to determine and monitor the dynamics of specific IgM and IgG antibodies. After primary testing, the results need to be confirmed by an additional high-specificity test. In regions with a high prevalence, the specificity of the results of a highly sensitive and specific test does not need to be further confirmed. Both positive and negative findings must be interpreted clinically. Serological diagnosis is beneficial for the recognition and treatment of patients only if the results are interpreted on the basis of knowledge of the pathogenesis, clinical presentation and immune response as well as the characteristics of the test used. The characteristics of borrelia itself and the presentation of the antigen, the avoidance of the immune response, the availability of various tests as well as the Internet are pitfalls, especially if unverified information is followed.

### Borelije i lajmska borelioza - uvod

Borelije su veoma pokretne spirohete koje se mogu promatrati mikroskopiranjem u tamnom polju. Njihov rezervoar predstavljaju razne vrste životinja, među kojima su posebno značajni glodavci, zatim ptice i domaće životinje. S jednog domaćina na drugog prenose ih tvrdi štitasti krpelji vrste *Ixodes* koji se zaraze sišući krv domaćina u vrijeme spirohetemije<sup>[1]</sup>. Čovjek je sasvim slučajni domaćin kojemu borelije prenese zaraženi krpelj<sup>[1, 2]</sup>.

Danas poznajemo više od dvadeset vrsta borelija iz kompleksa lajmske borelioze, a možemo ih grubo podi-

jeliti na one koje su patogene za čovjeka i one čija patogenost nije sigurno dokazana. U Europi su u ljudi izolirane *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. spielmanii* i *B. bavariensis*, dok je u Sjevernoj Americi za čovjeka jedina patogena borelija *B. burgdorferi* sensu stricto<sup>[3, 4]</sup>. Patogenost borelija *B. valaisiana*, *B. lusitanae* i *B. bissetii* u Europi nije jasno potvrđena - u ljudi su dokazane uglavnom molekularnim metodama, dok je izolacija u kulturi bila veoma rijetko uspješna<sup>[5, 6]</sup>.

Lajmska borelioza najčešće se prezentira kao kožna manifestacija *erythema migrans* (EM; >80%). Diseminacija borelija iz EM češća je nakon infekcije koju

uzrokuje *B. burgdorferi* sensu stricto nego *B. afzelii* i češće se prezentira sistemskim znacima i simptomima. Kožne manifestacije borelijski limfocitom i *acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA) nisu opisane kao autohtone bolesti u Sjevernoj Americi, tako da su te kliničke slike karakteristične za Europu i infekcije s *B. afzelii*<sup>[3, 4]</sup>.

Nakon diseminacije borelija iz kože, može se razviti neuroborelioza (NB) koja se prezentira kao serozni meningitis i u Europi kao tipičan Banwarthov sindrom. Najčešći uzročnik NB u Europi je *B. garinii* iako su i sve druge vrste borelija bile izolirane iz likvora bolesnika s NB<sup>[7, 8]</sup>. Artritis velikih zglobova povezuje se s *B. burgdorferi* sensu stricto i rijedak je u Europi, a čest u Sjevernoj Americi<sup>[4]</sup>. Borelijska infekcija dokazana je sporadično i vrlo rijetko kod drugih kožnih te očnih, neuroloških i kardijalnih manifestacija (specifičan je AV blok II stupnja). U sklopu lajmske borelioze opisani su i različiti prateći simptomi kao što su artralgijska, mialgijska, glavobolja, slabost, umor, poremećaj koncentracije, kognitivno propadanje i mnogi drugi. Koliko je istinski za navedene pojave i simptome odgovorna borelija, veoma je upitno. Ako postoji sumnja u povezanost borelija s netipičnim simptomima, tu je mogućnost u svakom slučaju potrebno mikrobiološki dokazati<sup>[4]</sup>.

Kako bi se razumjela klinička slika lajmske borelioze i njen nastanak, potrebno je poznavati neke od osobitosti borelija. Patogenezi sigurno pridonosi borelijska pokretljivost. Zahvaljujući svojoj gibljivosti borelija se odmiče od mjesta ulaska u organizam, prodire duboko u tkiva i izmiče imunom odgovoru, prije svega fagocitozi<sup>[9, 10]</sup>.

Među površinskim borelijskim lipoproteinima nalaze se adhezini koji su odgovorni kako za lokaliziranu (borelija se usidri u koži) tako i za sistemsku infekciju (borelija diseminira iz primarnog mjesta parazitiranja). Borelija ima sposobnost uključivanja i isključivanja površinskih antigena što joj pomaže u diseminaciji. Ovisno o izraženim površinskim antigenima, borelija ostaje ili lokalizirana u koži ili se proširi po organizmu<sup>[9, 10]</sup>. Osim toga borelija može eksprimirati na površini antigene koji nemaju dovoljan potencijal za poticanje imunog odgovora. Slaba borelijska imunogenost odgovorna je za odgodu ili izostanak imunog odgovora<sup>[9, 12]</sup>. Nasuprot tome, neki od važnih borelijskih proteina kao što je primjerice VlsE koji gotovo uvijek prati infekciju domaćina, podliježu konstantnoj promjeni čime se mijenja antigenska struktura proteina što boreliji dodatno omogućava izbjegavanje imunog odgovora<sup>[12]</sup>. Sve navedeno utječe na preživljavanje i održavanje borelija u prirodnim domaćinima kao i na patogenezu i humanu patologiju. S obzirom na specifičnost imunog poticaja,

potrebno je istaknuti i mogućnost istovremene (simultane) infekcije s različitim borelijama, kao i ponovne infekcije (reinfekcije) s borelijama, usprkos antibioticom liječenju prijašnje infekcije odnosno prisutnosti protutijela u domaćinu<sup>[4, 13, 14]</sup>.

Općenito, klinička slika borelijske infekcije može biti asimptomatska, odnosno bez kliničkih znakova bolesti, ali uz pozitivnu serologiju - pretpostavlja se oko 40% slučajeva u Europi, a 10% u Sjevernoj Americi; kod bolesnika kod kojih je klinička slika vidljiva, može proteći kao lokalizirana i/ili sustavna infekcija. Važno je znati da kliničke slike mogu imati različiti tijek i mogu različito dugo trajati<sup>[4, 14]</sup>.

### Mikrobiološka dijagnostika lajmske borelioze (LB)

Dijagnoza LB u najvećem broju slučajeva je klinička. EM je za borelijsku infekciju specifična kožna manifestacija koju ne treba laboratorijski dokazivati<sup>[15-17]</sup>. Ipak, dobro je poznavati bazični imunski odgovor stečen tijekom EM za slučaj da se kod bolesnika nakon nekog vremena pojave teškoće zbog kojih je potrebno isključiti akutnu borelijsku infekciju, a što će olakšati interpretaciju rezultata testiranja novih seruma. Druge kliničke slike koje s manjom ili većom vjerojatnosti ukazuju na LB, kao što su meningitis, pareza facijalnog ili drugog kranijalnog živca, artritis, AV-blok, oftalmološke bolesti, zahtijevaju mikrobiološku potvrdu moguće borelijske infekcije. Dijagnozu LB podupire podatak o ubodu krpelja kao i boravak bolesnika na endemskom području<sup>[15-17]</sup>.

Mikrobiološke metode za dokaz borelijske infekcije dijelimo na izravne - kultivacija i molekularna dijagnostika i neizravne - serološka dijagnostika. Svaka metoda ima određenu osjetljivost i specifičnost i različite testove često treba kombinirati ovisno o kliničkoj slici bolesnika.

**Kultivacija** je zahtjevna metoda - potrebne su posebne podloge za izolaciju, dugo traje (6-9 tjedana) i vezana je za referentne laboratorije<sup>[15, 16]</sup>. Borelije se mogu izolirati iz različitih kliničkih uzoraka, iz rezervoara (sisavaca, ptica) i iz krpelja. Važno je da je uzorak što veći (npr. 2 mL likvora) jer su borelije u uzorcima rijetke, pa kultivacija često nije uspješna<sup>[18]</sup>.

Unatoč ograničenoj osjetljivosti kultivacije borelija, izolacija i identifikacija borelija veoma je važna za epidemiološke studije - omogućava praćenje geografske rasprostranjenosti vrsta borelija, preferencije pojedine vrste za biološkog domaćina te njihov suživot kao i preživljavanje u borelijskom vektoru<sup>[1, 19]</sup>. Analiza izoliranih borelijskih sojeva objasnila je mehanizme patogenosti, identificirala faktore virulencije, povezala pojedine vrste borelija s kliničkom slikom, objasnila tijek infekcije, imunski odgovor, preživljavanje borelije u domaćinu

(ponekad usprkos prisutnom imunom odgovoru i antibiotskoj terapiji)<sup>[4]</sup>. Temeljem istraživanja izoliranih sojeva i prikupljenog znanja, pokušava se napraviti primjereno cjepivo, ali još uvijek bez uspjeha.

**Dokazivanje molekule DNK molekularnim metodama lančane reakcije polimerazom (PCR)** unijelo je veliku revoluciju u dijagnosticiranje mikroorganizama. Metoda je postala relativno jednostavna i potpuno automatizirana. Prednost metode PCR je brzina dobivanja rezultata (dostupni su u istom danu za razliku od kultivacije koja traje tjednima). Današnje poznavanje genoma mnogih uzročnika infekcija, pa tako i borelija, omogućava dizajniranje molekularnih testova velike specifičnosti<sup>[16, 17]</sup>. Molekularno testiranje izvodi se iz istih uzoraka kao i kultivacija. Budući da je za LB patognomoničan relativno mali broj borelija u tkivu i metoda PCR može biti češće lažno negativna nego što bismo očekivali. Stoga se nije široko implementirala u rutinsku dijagnostiku LB<sup>[4, 15, 16, 20]</sup>.

**Serološka dijagnostika** LB izvodi se rutinski i dostupna je gotovo svim mikrobiološkim laboratorijima. Iako moderna tehnologija omogućuje potpunu automatizaciju seroloških metoda i brzo generiranje rezultata, interpretacija značenja nalaza zahtijeva dobro poznavanje tijeka bolesti i nastanka protutijela. U suprotnom, dobroti serološke dijagnostike može postati velika zamka<sup>[4, 15, 16]</sup>.

### Borelijska infekcija i nastanak protutijela

Imunosni odgovor je potreban za izlječenje svake infekcije, pa tako i borelijske. Prvi korak u poticanju aktiviranja imunostanog sustava je prepoznavanje borelijskih antigena kao domaćinu stranih molekula. Ulažak borelije u kožu potakne fagocitozu, procesuiranje u fagocitu i prikaz borelijskih antigena na površini fagocitne stanice što je neophodno potrebno za daljnji imunostan odgovor<sup>[21, 22]</sup>. Već na ovom mjestu nailazimo na neke posebnosti: prvo, u tkivu je mali broj borelija, a one koje i jesu tu, na svojoj površini ne ekspimiraju dovoljno antigena da se potakne i nastavi imunostan proces. Uz to, dokazano je da ako do procesuiranja antigena i dođe, borelija inhibira prikaz svojih antigena na površini antigen-predstavljajuće stanice<sup>[23]</sup>. Rezultat toga je 1.) deficitarni imunostan odgovor zbog kojeg se infekcija produžuje, borelije perzistiraju i diseminiraju, a sama klinička slika je blaga, ili 2.) pretjerani imunostan odgovor uz teže kliničke slike produženog trajanja. U svakom slučaju rezultat primarnog kontakta borelije i imunostanog sustava domaćina odgovoran je za različiti tijek i ishod infekcije<sup>[4, 22, 23]</sup>.

Pogleda li se proteinski profil, vidi se da borelija ima jako puno različitih proteina (više od stotine) i mnogi su imunopotentni i sposobni izazvati imunostan

odgovor. Budući da su proteini velike molekule, nose na sebi mnogobrojne peptide, antigene i antigenske determinante što omogućava veliku borelijsku heterogenost. To je razlog da se sintetiziraju brojna specifična protutijela usmjerena prema različitim borelijskim antigenima. Vrstu i količinu specifičnih protutijela možemo određivati u krvi, likvoru i sinovijskoj tekućini bolesnika<sup>[15, 16, 24, 25]</sup>. Važno je razlikovati dvije „kategorije” antigena. **Prvu kategoriju** čine antigeni kao što su adhezini, flagelin, stresni proteini, membranski proteini i drugi, koji su filogenetski više ili manje srodni, tj. koji su zajednički borelijama i brojnim drugim bakterijama. Ranije preboljene različite bakterijske infekcije (npr. s hemofilusom, enterobakterijama, drugim spirohetama) mogu ostaviti protutijela koja križno reagiraju i s borelijskim antigenima, što dovodi do pojave križnih reakcija. Pozitivna serološka reakcija na ove antigene nema veliku važnost u potvrđivanju LB. **Drugu kategoriju** čine antigeni, npr. OspA, OspB, OspC, p100, p39, p18, VlsE i drugi, koji su specifični za borelije uzročnike LB i ne nalazimo ih kod drugih bakterija. Ovi antigeni imaju veće dijagnostičko značenje. Tvorbu protutijela protiv njih smatramo specifičnima za borelijsku infekciju<sup>[4, 15, 20]</sup>.

### Dinamika nastanka specifičnih protutijela

Poznato je da specifična protutijela nastaju sporo - IgM za tri do šest tjedana, a IgG za jedan do tri mjeseca [26]. Kao razlozi sporog imunostanog odgovora na borelijsku infekciju navode se mali broj borelija u tkivu bolesnika kao i slaba ekspresija površinskih antigena koja bi trebala izazvati imunostan odgovor<sup>[26]</sup>. Često je imunostan odgovor slab (niska količina protutijela) ili čak izostaje (odsutnost protutijela); brza i adekvatna antibiotska terapija može ga primjerice zaustaviti. Imunosni odgovor može ostati samo na razini protutijela IgM što upućuje da stimulans nije bio dovoljan za preklapanje na sintezu protutijela IgG. Izostanak imunostanog odgovora ne znači nužno odsutnost borelijske infekcije i može biti zamka ako se dijagnosticira ne LB temelji samo na prisutnosti protutijela<sup>[4, 16, 19]</sup>.

Ako borelijska infekcija nije prepoznata i/ili nije bila dobro liječena, borelije se u organizmu umnožavaju i stimuliraju nastanak protutijela. Tako se s duljinom trajanja infekcije povećava udio serološki pozitivnih bolesnika. Među bolesnicima sa svježom lokalnom infekcijom, kao što je EM, udio serološki pozitivnih bolesnika je 20-50 %, dok pozitivnost u kroničnim infekcijama, kao što je ACA, iznosi 90-100%<sup>[26]</sup>. U svježim infekcijama češće su prisutna protutijela IgM, dok su u dugotrajnim kliničkim slikama uglavnom prisutna protutijela IgG. U imunostanog odgovoru razlikuje se i količina protutijela - velike količine protutijela (viši

titrovi, više jedinica po mL uzorka) nalaze se u infekcijama duljeg trajanja. Sve navedeno potvrđuje ranije opisani odnos borelije i njenog domaćina. Borelijska infekcija duljeg trajanja mora stimulirati nastanak protutijela jer svaki imunski sustav teži tome da ukloni patogena. Izostanak imunskog odgovora kod dugo prisutnih simptoma i znakova bolesti ne govori stoga u prilog borelijskoj infekciji.

Praćenje kretanja imunskog odgovora jedan je od jednostavnih, ali veoma učinkovitih pristupa dijagnostici LB koji može pomoći u postavljanju dijagnoze, posebno kod osoba kod kojih poteškoće nisu specifične samo za LB, a perzistiraju mjesecima ili godinama. Serološke testove kod takvih bolesnika treba ponoviti nakon jednog, 3, 6 i 12 mjeseci. Višemjesečna ili višegodišnja uporna pozitivnost bez dinamike protutijela pomaže u prihvaćanju činjenice da su protutijela drugog izvora ili su rezidualna nakon preboljene infekcije i trenutne bolesnikove poteškoće nisu rezultat aktivne borelijske infekcije<sup>[15, 16, 19, 20]</sup>.

Poznavanje dinamike nastanka protutijela predstavlja dobrobit za dijagnostiku borelijske infekcije (dijagnoza LB se potvrdi ili isključi), ali može biti i zamka ako se u interpretaciji seroloških rezultata ne poštuju zadani kriteriji i postavi se dijagnoza LB koja to nije<sup>[4, 16, 19]</sup>.

### Posebnosti imunskog odgovora u lajmskoj boreliozi

Imunski odgovor na borelijsku infekciju možemo dokazati i kod zdravih osoba, posebno u endemskim područjima. To se objašnjava kao mogući kontakt imunskog sustava pojedinca s borelijom nakon uboda krpelja, pri čemu osoba nije razvila kliničku sliku LB (npr. EM). Nalaze se protutijela IgM ili IgG ili oba, obično u niskim količinama. Često ih definiramo kao lažno pozitivne u kliničkom smislu (posebno perzistiranje IgM) iako i potvrdni testovi mogu pokazati borelijsku specifičnu protutijela<sup>[4, 16, 19, 27]</sup>. S druge strane, lažno negativni rezultati seroloških testova su obično posljedica testiranja u vremenu kada do tvorbe protutijela još nije došlo (npr. kod EM) ili kada se zbog pravovremene antibiotske terapije prekine njihovo nastajanje<sup>[4, 16, 26]</sup>.

Lažno pozitivni rezultati mogu biti posljedica infekcija s drugim bakterijama koje eksprimiraju antigene veoma slične borelijskim, npr. flagelin, „heat stress” proteini, proteini „housekeeping” gena i slični. Najčešće su to infekcije sa srodnim bakterijama, kao što su npr. oralne spirohete ili uzročnik sifilisa, ali mogu biti i filogenetski udaljene bakterije, kao npr. hemofilus, enterobakterije, bacilusi, jersinije. Protutijela protiv ovih antigena pokazuju križnu reaktivnost. Potvrdni testovi koji ne sadrže zajedničke križne antigene obič-

no diferenciraju specifičnost imunskog odgovora<sup>[14, 28-30]</sup>. Lažno pozitivni nalazi mogu biti rezultat intenzivne imunske reakcije na druge uzročnike i visoke nespecifičnosti protutijela, što se često vidi na razini protutijela IgM kod akutnih infekcija EBV, CMV, *Mycoplasma pneumoniae* ili drugih virusnih infekcija. Što borelijska infekcija dulje traje, povećava se specifičnost protutijela i izgubi se nespecifična reaktivnost protutijela na borelijske antigene<sup>[4, 16, 30, 31]</sup>. I proliferativna stimulacija limfocita B (npr. kod EBV infekcije ili limfoma) može uzrokovati lažno pozitivne rezultate IgM, koji se mogu vidjeti i kod autoimunih bolesti (reumatoidni artritis, lupus, sklerodermija), neoplazmi (limfomi), kroničnih bolesti (multipla skleroza). Stoga je uvijek potrebno detaljno pregledati bolesnika i procijeniti kliničku vjerojatnost za borelijsku infekciju<sup>[32]</sup>. Posebnost imunskog odgovora vidi se i u činjenici da je usprkos postojećem imunskom odgovoru moguća ponovna borelijska infekcija nakon uboda krpelja (npr. ACA na jednom ekstremitetu uz jaki imunski odgovor, a nakon novog uboda krpelja razvije se EM na drugom ekstremitetu). Očito je da su specifična protutijela značajna dijagnostički, ali nisu sposobna spriječiti novu borelijsku infekciju što je vjerojatno i razlog zašto se tako dugo razvija i čeka cjepivo protiv LB<sup>[4, 16]</sup>. Da protutijela nisu zaštitna i nisu sposobna eliminirati borelije iz organizma bolesnika, potvrđuje i diseminirana infekcija u kojoj se dokazuju velike količine specifičnih protutijela, ali se još uvijek mogu izolirati borelije iz kliničkih uzoraka<sup>[4, 16]</sup>.

Ako se poznaju karakteristike nastanka kliničke slike i imunskog odgovora, serološka dijagnostika može biti dobrobit za prepoznavanje i liječenje bolesnika, ali i potencijalna zamka ako se zaplete u nepotrebnim ponavljajućim testiranjima i liječenju bolesnika koji zapravo nemaju LB. Zato se preporuča da se serološka dijagnostika izvodi u dobro opremljenim laboratorijima koji imaju stalan kontakt s kliničarima i neprekidno izmjenjuju iskustva u interpretaciji rezultata.

### Serološka dijagnostika lajmske borelioze

Dva su glavna pitanja o kojima ovisi interpretacija serološke dijagnostike: 1. Koji su antigeni uključeni u serološki test? i 2. Koliko različitih antigena je uključeno u serološki test? Postoje serološki testovi koji istovremeno određuju protutijela protiv brojnih nedefiniranih borelijskih antigena. To su testovi u kojima antigene predstavljaju cijele borelije, pročišćeni borelijski proteini ili sonificirane borelijske stanice, a najčešće su metodološki izvedeni kao imunofluorescentni (IFT), imunoenzimski (IET) ili klasični western blot (WB) testovi<sup>[33]</sup>. To su bili i prvi serološki testovi kojima se dokazivala LB. Nedefinirani antigeni u ovim

testovima vežu na sebe različita protutijela od kojih velika većina može biti nespecifična, tj. razvila se tijekom infekcije s nekim drugim uzročnikom, ali se ipak veže i na borelijski antigen zbog sličnosti s antigenom uzročnika koji je izazvao prijašnju infekciju. Obično su ta križna protutijela slabijeg intenziteta vezanja, no dovoljna su da u serološkom testu stvore pozitivnu reakciju. Stoga se preporuča da se pozitivni rezultati ovih testova obavezno provjere dodatnim tzv. potvrđnim testom<sup>[4, 15, 16, 20, 33]</sup>. Zbog nespecifične reaktivnosti opisani testovi predstavljaju jednu od zamki pri interpretaciji serološke dijagnostike.

S druge strane, postoje serološki testovi koji dokazuju protutijela protiv određenih za boreliju specifičnih antigena. Zahvaljujući tehnologiji i intenzivnom istraživačkom radu na području borelija i LB, u proteklih tridesetak godina značajno se proširilo znanje o patogenezi, faktorima virulencije i borelijskim antigenima. Tako danas među mnogim borelijskim antigenima možemo izdvojiti one koji su specifični za borelije LB i sudjeluju u patogenezi infekcije te prate tijek borelijske infekcije<sup>[15, 16, 20]</sup>. Uključivanje ovih antigena, koji su većinom proizvedeni rekombinantnom tehnologijom, predstavlja veliki napredak u serološkoj dijagnostici. Zbog visoke specifičnosti rekombinantnih testova, kod tipičnih kliničkih manifestacija u područjima s visokom prevalencijom borelioze, potvrđivanje pozitivnih rezultata nije uvijek potrebno što smanjuje troškove dijagnostike<sup>[4, 19, 34]</sup>.

S obzirom na sve navedeno, jako je važno poznavanje karakteristika serološkog testa kojim se bolesnik testira jer vrsta testa, prije svega zbog izbora antigena, sigurno utječe na pouzdanost mikrobiološke dijagnostike za LB, ali i na interpretaciju rezultata.

### Potvrđivanje specifičnosti imunskog odgovora

Potvrđivanje specifičnosti imunskog odgovora ima najveću vrijednost kod bolesnika kod kojih postoji nesklad između kliničke slike i imunskog odgovora. Kod potvrđivanja specifičnosti imunskog odgovora prvo se treba upitati kakva je klinička slika bolesnika – je li tipična za LB ili ne? Pridodati treba i epidemiološki podatak o vjerojatnosti kontakta s krpeljima. Serološki testovi potvrđuju kliničku sliku, ali njihova pozitivnost bez kliničke slike nije dovoljna za dijagnozu LB<sup>[4, 15, 16, 17, 19, 20]</sup>.

Specifičnost pozitivnog serološkog rezultata obično se potvrđuje testom imunoblot (IB). Test IB se razlikuje od ranije spomenutog klasičnog testa WB jer se u njemu koriste rekombinantni borelijski specifični antigeni, za razliku od testa WB koji sadrži sve ili većinu različitih borelijskih antigena razdvojenih elektroforezom. Oba testa, WB i IB, daju točnu informaciju na koje borelijske antigene se razvio imunski odgovor bole-

snika, tj. prikaže se imunski „otisak” bolesnika<sup>[15, 19, 20]</sup>. Reakcija protutijela na specifične borelijske antigene u testu IB potvrđuje specifičnost imunskog odgovora.

### Smjernice za serološku dijagnostiku lajmske borelioze

Ako je potrebno provjeriti specifičnost serološkog rezultata, izvodi se potvrdno dijagnostičko testiranje koje će omogućiti interpretaciju nalaza i može se provesti na nekoliko načina. Standardni najčešće preporučeni način testiranja je **dvostupanjna dijagnostika** u kojoj se koriste dva testa: prvi test je probirni („screening“) koji ima specifičnost najmanje 90%, nakon kojeg slijedi testiranje drugim potvrđnim testom, koji pak treba imati specifičnost veću od 95%<sup>[19, 33]</sup>. U endemskim područjima, moguće je koristiti **jednostupanjnu dijagnostiku** koja se temelji na upotrebi jednog testa (primarni test) s jako visokom specifičnošću i osjetljivošću (>98%)<sup>[15, 20]</sup>. Obično su to testovi s rekombinantnim antigenima kojima dokazujemo za boreliju specifična protutijela. Ako je klinička prezentacija LB jasna, potreba za potvrđnim testom minimalna je, u skladu s pozitivnom prediktivnom vrijednošću testa. Za bolesnike, čija klinička slika nije u skladu s pozitivnim serološkim nalazom, potreban je dodatni potvrđni test<sup>[4, 16, 19, 33, 34]</sup>.

Za definiranje dijagnoze LB treba koristiti mogućnost **praćenje serološkog odgovora, tj. kinetike protutijela**. Kao i sve druge infekcije, i borelijsku infekciju prati dinamika nastanka protutijela – postupni razvoj specifičnih protutijela na pojedine antigene i promjena količine tijekom vremena<sup>[4, 16]</sup>. Kod kliničkih slika koje su posljedica druge patologije, a mogu se povezati i s LB (npr. artralgijske, mialgijske, glavobolje, vrtoglavice, slabost, drugo) posebno se preporuča da se bolesnik testira više puta u određenim vremenskim razmacima (na početku bolesti te nakon 1, 3, 6, 12 mjeseci). Ako se uzastopnim testiranjem nađe da specifična protutijela perzistiraju i ne pokazuju dinamiku (povećanje ili smanjenje titra) smatra se da se radi o rezidualnim protutijelima koja su vjerojatno posljedica ranije preboljene infekcije (simptomatske ili asimptomatske), a tegobe koje bolesnik navodi nisu uzrokovane borelijskom infekcijom<sup>[4, 16, 19, 33-35]</sup>. Ovisno o poznavanju karakteristika i mogućnosti seroloških testova, uz pravilnu interpretaciju rezultata, serologija može za bolesnika biti dobrobit, ako se infekcija dokaže ili isključiti, ili zamka, ako se rezultati ne interpretiraju korektno i usmjere na LB koja to, u stvari, nije.

### Serološka dijagnostika neuroborelioze

Veliku vrijednost u dijagnostici neuroborelioze ima procjena i izračunavanje indeksa intratekalne sinteze specifičnih protutijela („*Antibody index*“; AI) koji se

temelji na konstantnom odnosu količina albumina i/ili ukupnih protutijela IgM, IgG ili IgA u krvi i likvoru zdravog čovjeka)<sup>[36, 37]</sup>. Upalni proces središnjeg živčanog sustava (SŽS) poremeti krvno-moždanu membranu, uzrokuje njenu disfunkciju čime se poremeti normalan odnos navedenih parametara. S obzirom da borelijska specifična protutijela predstavljaju samo dio ukupnih protutijela tijekom NB, u SŽS dolazi do njihove povećane sinteze što je ujedno potvrda borelijske infekcije SŽS<sup>[37]</sup>. Definiranje intratekalne sinteze protutijela važno je za postavljanje dijagnoze neuroborrelioze jer može raščlaniti jesu li protutijela u SŽS posljedica pasivnog prijelaza iz krvi u likvor ili su posljedica njihove lokalne sinteze<sup>[37]</sup>. Ipak, treba biti kritičan prema pozitivnim nalazima AI koje ne prati meningitis jer u podlozi takvih rezultata mogu biti različite autoimune bolesti<sup>[37]</sup>. Stoga prije testiranja specifičnih borelijskih protutijela u likvoru, potrebno je u likvoru utvrditi upalne biokemijske i citološke parametre (pleocitoza, proteinorahija). Ako su upalni parametri u likvoru negativni, upitna je potreba određivanja specifičnih protutijela u likvoru i značenje nalaza borelijskih protutijela treba oprezno interpretirati jer se može raditi o dugotrajnom perzistiranju rezidualnih protutijela ili o lažno pozitivnom nalazu<sup>[36, 37]</sup>.

### Kronična i „kronična“ lajmska borelioza

Kroničnu borelijsku infekciju definiramo kao višestruku kliničku bolest s prisutnom velikom količinom protutijela<sup>[4]</sup>. Kliničku sliku prati jaki imunوسي odgovor, a imunوسي odgovor potvrđuje kliničku sliku - jedno bez drugoga nije moguće. Stoga, definicija, kako akutne LB, tako i kronične LB, itekako je jasna. Ipak, u svakodnevnom radu nailazimo na pojavu dijagnoze tzv. „kronične“ LB kod koje odstupa jedan ili oba navedena kriterija (jaki imunوسي odgovor i/ili jasna klinička slika) koji bi je trebali odrediti.

Dijagnoza tzv. „kronične“ LB posebno u endemskom području je česta i najčešće je postavljaju sami pacijenti, iako ponekad i liječnici. Može obuhvaćati čitav niz subjektivnih i objektivnih tegoba i simptoma koji nemaju jasnu etiologiju. Tu spadaju: artralgijska, mialgijska, glavobolja, anksioznost, tjeskoba, umor, kognitivno propadanje, opće slabo osjećanje, vrtoglavica, depresija, astenija i mnogi drugi<sup>[38-41]</sup>. Općim kliničkim simptomima može se priključiti i niz kožnih promjena (granuloma annulare, pemfigus, sklerodermija), neuroloških bolesti (multipla skleroza, bolest motornog neurona), psihičkih, kardioloških bolesti, neoplastični sindromi, vaskulitisi, autoimune bolesti i drugo<sup>[38-40]</sup>. Ovi bolesnici često imaju prisutna borelijska protutijela IgM i/ili IgG, ali obično u niskim količinama ili uopće nemaju prisutna protutijela, ali svoje teškoće

povezuju s borelijskom infekcijom i sami postavljaju dijagnozu „serološki negativna kronična LB“. Mnogi bolesnici nisu spremni prihvatiti činjenicu da borelijska infekcija nije uzrok njihovih poteškoća i na sve moguće načine žele potvrditi dijagnozu, nakon čega očekuju da će uslijediti višetjedno liječenje antibioticima. Dugotrajno uzimanje antibiotika u liječenju tzv. „kronične“ LB nije medicinski opravdano i može dovesti do brojnih neželjenih posljedica, kao što su razvoj antimikrobnih rezistencija, utjecaj na mikrobiotu pojedinca, klostridijski proljev i drugo, ali i do progresije nedijagnosticirane i neliječene osnovne bolesti. Potrebno je osvijestiti činjenicu da treba liječiti bolesnika, a ne ispisani nalaz<sup>[38-41]</sup>. Velika zamka serološke dijagnostike je serološka pozitivnost (premda slaba) kod bolesnika sa znakovima i simptomima koji se ne mogu povezati s borelijskom infekcijom.

### Komplementarna dijagnostika – odstupanje od dijagnostičkih smjernica

Mnogi bolesnici, u cilju dokazivanja borelijske infekcije, posežu i za alternativnim dijagnostičkim postupcima. Jedan od testova od kojih se puno očekivalo je određivanje CXCL13. Od svih analiziranih citokina i kemokina, CXCL13 je dosegao najviše mjesto u dijagnostici LB. Pokazao je najbolju korelaciju s borelijskom infekcijom, ali, zbog svoje nespecificnosti, nije zaživio u rutinskoj dijagnostici<sup>[42-44]</sup>.

Na drugom je mjestu test blastne transformacije limfocita T koji, za razliku od dokazivanja protutijela, dokazuje aktivnost (klonsku proliferaciju) bolesnikovih limfocita T nakon laboratorijske stimulacije s borelijskim antigenima. Zbog različitih faktora koji mogu utjecati na proliferaciju limfocita T, test se ne smatra specifičnim za dokazivanje borelijske infekcije<sup>[44-46]</sup>. Za ovaj se test odlučuje ipak i dio zdravstvenih radnika, posebno kod serološki negativnih ili nisko pozitivnih bolesnika, kao i sami bolesnici. Pozitivnost testa blastne transformacije limfocita T kod bolesnika s nespecificnim simptomima dodatno povećava pritisak za liječenje i daljnju obradu, iako se nikakvi drugi parametri, osim perzistirajućih poteškoća, ne mogu povezati s borelijskom infekcijom.

Neposredni pregled krvi mikroskopiranjem u tamnom polju jedna je od najčešćih dijagnostika koje se mogu pronaći na Internetu. Atraktivni filmovi prikazuju strukture slične borelijama, prema kojima bi trebalo postaviti dijagnozu LB. U stvarnosti, iz prikazanih krvnih struktura nikad se nisu uspjele izolirati borelije ili dokazati borelijska DNK i kod tih se osoba nikada nisu uspjele razviti specifična protutijela u velikim količinama koja bi morala pratiti pretpostavljenu masivnu infekciju u krvi. Smatra se da prikazane

strukture predstavljaju agregate linearno raspoređenih kolagenih vlakana iz krvi<sup>[44, 47]</sup>. Teško je bolesniku s brojnim nespecifičnim poteškoćama i simptomima, koji luta po zdravstvenim ustanovama s filmom u ruci, objasniti da te strukture nisu borelije i da nema LB.

Neposredno dokazivanje površinske molekule CD57 još je jedan od alternativnih testova. Molekula CD57 izražena je na NK-stanicama i limfocitima T i predstavlja imunsko „ostarjele“ stanice koje možemo pronaći u krvi u različitim patološkim stanjima. Prisutnost CD57 povezuje se s tzv. »kroničnom« LB upravo kod onih bolesnika sa slabim serološkim odgovorom na borelijsku infekciju. Smanjeni broj CD57 stanica opisuje se kao rezultat supresije imunskog sustava te se navodi kao tipičan pokazatelj kronične LB koja zapravo to nije<sup>[44, 48]</sup>. Pozitivnost ovog testa, uz sve druge testove koji ne potvrđuju LB, povećava pritisak bolesnika za zdravstvenu obradu.

Biorezonancija je još jedna od tehnika koja se pokušava povezati s LB. Biorezonancija se temelji na činjenici da se sve oko nas niže svojom frekvencijom - svemir, zemlja, priroda, čovjek, organi, svaka stanica, svaka materija. Rezonancija nastane kada se dva vala usklade, a metoda se izvodi tako da: »Terapeut uzme informaciju o boreliji i provjerava jeste li u rezonanciji s njom«. Većini bolesnika kojima je LB potvrđena biorezonancijom LB nije moguće potvrditi akreditiranim dijagnostičkim testovima<sup>[44, 49]</sup>. Tako se i biorezonancija svrstava u komplementarne testove koji predstavljaju zamku u dijagnosticiranju LB.

### Zaključak

Lajmska boreliosa dugo je poznati entitet s dobro definiranim kliničkim prezentacijama, prema kojima je dijagnozu moguće postaviti i bez specifičnog dijagnostičkog postupka. Postavljanje dijagnoze LB započinje kliničkim pregledom i evaluacijom anamnestičkih i epidemioloških podataka o vjerojatnosti kontakta s krpeljima, o čemu ovisi interpretacija nalaza. Rutinska dijagnostika LB temelji se na serologiji i praćenju dinamike specifičnih protutijela. Stvaranje specifičnih protutijela složeni je proces koji ovisi o interakciji borelija i imuniteta domaćina. Serološki testovi nisu standardizirani, što dodatno otežava dijagnostički postupak, no postoje dobro definirani postupnici europskih stručnih društava koja se bave istraživanjem borelija (npr. ESGBOR; ESCMID Study Group for Lyme Borreliosis) smjernice kojih treba slijediti<sup>[17]</sup>. Isključiva primjena znanstveno utemeljenih činjenica o LB jamči pravilno liječenje bolesnika. Moguće preklapanje simptoma LB s različitim drugim uzrocima, uz diferentnost testova i tumačenje rezultata pretraga, omogućava manipuliranje s nalazima, sugeriranje testova koji ne daju relevantne rezultate

i zavođenja u pogrešnom smjeru od strane nedovoljno educiranih osoba i samozvanih stručnih društava<sup>[15]</sup>. Fiksiranje bolesnika na LB koja nije potvrđena prema važećim znanstvenim kriterijima, već je vođena neprovjerenim podacima s Interneta te nepostavljanje ispravne dijagnoze odgađa pravovremeno i ciljano liječenje, što može uzrokovati progresiju osnovne bolesti i rezultirati neželjenim posljedicama. S druge strane, inzistiranje na dugotrajnom antibiotskom liječenju bez potrebe ostavlja višestruke i dugotrajne posljedice. Stoga, postavljanje dijagnoze LB i odluka o liječenju moraju biti stručno utemeljeni u skladu s kliničkom slikom, mikrobiološkom dijagnostikom i ispravnim interpretiranjem rezultata testiranja kako bi se iskoristile prednosti i izbjegle zamke dijagnostike LB.

### LITERATURA

- [1] Mannelli A, Bertolotti L, Gern L, Gray J. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe: transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(4):837-61.
- [2] Kilpatrick AM, Dobson ADM, Levi T, et al. Lyme disease ecology in a changing world: consensus, uncertainty and critical gaps for improving control. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2017;372(1722):20160117.
- [3] Stanek G, Reiter M. The expanding Lyme *Borrelia* complex-clinical significance of genomic species? *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(4):487-93.
- [4] Stanek G, Strle F. Lyme borreliosis-from tick bite to diagnosis and treatment. *FEMS Microbiol Rev.* 2018;42(3):233-58.
- [5] Margos G, Vollmer SA, Ogden NH, Fish D. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infect Genet Evol.* 2011;11(7):1545-63.
- [6] Margos G, Notter I, Fingerle V. Species Identification and Phylogenetic Analysis of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Using Molecular Biological Methods. *Methods Mol Biol.* 2018;1690: 13-33.
- [7] Maretić T, Benić B, Đaković Rode O, Beritić D, Ružić Sabljić E. First isolation of *Borrelia* sp. (*Borrelia afzeli*) from cerebrospinal fluid in a patient with neuroborreliosis in Croatia. *Infektol Glasn* 2009;29(2):65-70.
- [8] Maretić T, Ružić Sabljić E, Vince A, Đaković Rode O. Prva izolacija *Borreliae garinii* u Hrvatskoj. *Infektol Glasn* 2002;22(2): 65-9.
- [9] Hyde JA. *Borrelia burgdorferi* Keeps Moving and Carries on: A Review of Borrelial Dissemination and Invasion. *Front Immunol.* 2017;8:114.
- [10] Aslam B, Nisar MA, Khurshid M, Farooq Salamat MK. Immune escape strategies of *Borrelia burgdorferi*. *Future Microbiol.* 2017;12:1219-37.
- [11] Antonara S, Ristow L, Coburn J. Adhesion Mechanisms of *Borrelia burgdorferi*. *Bacterial Adhesion: Chemistry, Biology and Physics.* *Adv Exp Med Biol.* 2011;715:35-49.
- [12] Chaconas G, Castellanos M, Verhey TB. Changing of the guard: How the Lyme disease spirochete subverts the host immune response. *J Biol Chem.* 2020;295(2):301-13.
- [13] Ruzic-Sabljić E, Arnez M, Logar M, et al. Comparison of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from specimens obtained simultaneously from two different sites of infection in individual patients. *J Clin Microbiol.* 2005;43(5):2194-200.

- [14] Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. *Lancet*. 2012;379(9814):461-73.
- [15] Eldin C, Raffetin A, Bouiller K, et al. Review of European and American guidelines for the diagnosis of Lyme borreliosis. *Med Mal Infect*. 2019;49(2):121-32.
- [16] Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(3):484-509.
- [17] 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(2):118-24.
- [18] Wormser GP, Nowakowski J, Nadelman RB, Bittker S, Cooper D, Pavia C. Improving the yield of blood cultures for patients with early Lyme disease. *J Clin Microbiol*. 1998;36(1):296-8.
- [19] Waddell LA, Greig J, Mascarenhas M, Harding S, Lindsay R, Ogden N. The Accuracy of Diagnostic Tests for Lyme Disease in Humans, A Systematic Review and Meta-Analysis of North American Research. *PLoS One*. 2016;11(12):e0168613.
- [20] Eldin C, Parola P, Raoult D. Limitations of diagnostic tests for bacterial infections. *Med Mal Infect*. 2019;49(2):98-101.
- [21] Hartiala P, Hytönen J, Suhonen J, Leppäranta O, Tuominen-Gustafsson H, Viljanen MK. *Borrelia burgdorferi* inhibits human neutrophil functions. *Microbes Infect*. 2008;10(1):60-8.
- [22] Carreras-González A, Barriales D, Palacios A, et al. Regulation of macrophage activity by surface receptors contained within *Borrelia burgdorferi*-enriched phagosomal fractions. *PLoS Pathog*. 2019;15(11):e1008163.
- [23] Petnicki-Ocwieja T, Kern A. Mechanisms of *Borrelia burgdorferi* internalization and intracellular innate immune signaling. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:175.
- [24] Glinsek U, Udovic T, Cerar T, Strle F, Ruzic-Sabljić E. Protein profile determination of *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii* isolated from skin and cerebrospinal fluid. *World J Microbiol Biotechnol*. 2009;25:1287-96.
- [25] Ruzic-Sabljić E, Arnez M, Logar M, et al. Comparison of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from specimens obtained simultaneously from two different sites of infection in individual patients. *J Clin Microbiol*. 2005;43(5):2194-200.
- [26] Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007;49(1):13-21.
- [27] Steere AC, Sikand VK, Schoen RT, Nowakowski J. Asymptomatic infection with *Borrelia burgdorferi*. *Clin Infect Dis*. 2003;37(4):528-32.
- [28] Bruckbauer HR, Preac-Mursic V, Fuchs R, Wilske B. Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1992;11(3):224-32.
- [29] Naesens R, Vermeiren S, Van Schaeren J, Jeurissen A. False positive Lyme serology due to syphilis: report of 6 cases and review of the literature. *Acta Clin Belg*. 2011;66(1):58-9.
- [30] Golkocheva-Markova E, Christova I, Stoilov R, Najdenski H. Cross-reaction between *Yersinia* outer membrane proteins and anti-*Borrelia* antibodies in sera of patients with Lyme disease. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(9):873-5.
- [31] Tuuminen T, Hedman K, Söderlund-Venermo M, Seppälä I. Acute parvovirus B19 infection causes nonspecificity frequently in *Borrelia* and less often in *Salmonella* and *Campylobacter* serology, posing a problem in diagnosis of infectious arthropathy. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(1):167-72.
- [32] Hsieh YF, Liu HW, Hsu TC, Wei JC, Shih CM, Krause PJ, Tsay GJ. Serum reactivity against *Borrelia burgdorferi* OspA in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14(11):1437-41.
- [33] Theel ES. The Past, Present, and (Possible) Future of Serologic Testing for Lyme Disease. *J Clin Microbiol*. 2016;54(5):1191-6.
- [34] Dessau RB, Møller JK, Kolmos B, Henningsson AJ. Multiplex assay (Mikrogen recomBead) for detection of serum IgG and IgM antibodies to 13 recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in patients with neuroborreliosis: the more the better? *J Med Microbiol*. 2015;64(Pt 3):224-31.
- [35] Webber BJ, Burganowski RP, Colton L, Escobar JD, Pathak SR, Gambino-Shirley KJ. Lyme disease overdiagnosis in a large healthcare system: a population-based, retrospective study. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(10):1233-8.
- [36] Rauer S, Kastenbauer S, Fingerle V, Hunfeld KP, Huppertz HI, Dersch R. Lyme Neuroborreliosis. *Dtsch Arztebl Int*. 2018;115(45):751-6.
- [37] Rauer S, Kastenbauer S, Hofmann H, et al. Guidelines for diagnosis and treatment in neurology - Lyme neuroborreliosis. *Ger Med Sci*. 2020;18:Doc03.
- [38] Halperin JJ. Nervous system Lyme disease, chronic Lyme disease, and none of the above. *Acta Neurol Belg*. 2016;116(1):1-6.
- [39] Stupica D, Lusa L, Cerar T, Ružić-Sabljić E, Strle F. Comparison of post-Lyme Borreliosis symptoms in erythema migrans patients with positive and negative *Borrelia burgdorferi* sensu lato skin culture. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011;11(7):883-9.
- [40] Lantos PM. Chronic Lyme disease. *Infect Dis Clin North Am*. 2015;29(2):325-40.
- [41] Kortela E, Kanerva M, Kurkela S, Oksi J, Järvinen A. Suspicion of Lyme borreliosis in patients referred to an infectious diseases clinic: what did the patients really have? *Clin Microbiol Infect*. 2021;27(7):1022-8.
- [42] Cerar T, Ogrinc K, Lotric-Furlan S, et al. Diagnostic value of cytokines and chemokines in Lyme neuroborreliosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2013;20(10):1578-84.
- [43] Rupprecht TA, Manz KM, Fingerle V, et al. Diagnostic value of cerebrospinal fluid CXCL13 for acute Lyme neuroborreliosis. A systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(12):1234-40.
- [44] Raffetin A, Saunier A, Bouiller K, et al. Unconventional diagnostic tests for Lyme borreliosis: a systematic review. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(1):51-9.
- [45] van Gorkom T, Sankatsing SUC, Voet W, et al. An Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay Measuring *Borrelia burgdorferi* B31-Specific Interferon Gamma-Secreting T Cells Cannot Discriminate Active Lyme Neuroborreliosis from Past Lyme Borreliosis: a Prospective Study in the Netherlands. *J Clin Microbiol*. 2018;56(4):e01695-17.
- [46] Jin C, Roen DR, Lehmann PV, Kellermann GH. An Enhanced ELISPOT Assay for Sensitive Detection of Antigen-Specific T Cell Responses to *Borrelia burgdorferi*. *Cells*. 2013;2(3):607-20.
- [47] Lohr B, Fingerle V, Norris DE, Hunfeld KP. Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis: Current state of the art and future perspectives. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2018;55(4):219-45.
- [48] Nielsen CM, White MJ, Goodier MR, Riley EM. Functional Significance of CD57 Expression on Human NK Cells and Relevance to Disease. *Front Immunol*. 2013;4:422.
- [49] Vrijmoeth HD, Ursinus J, Harms MG, et al. Prevalence and determinants of persistent symptoms after treatment for Lyme borreliosis: study protocol for an observational, prospective cohort study (LymeProspect). *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):324.