

POSEBNOST DIJAGNOSTIKE LAJMSKE NEUROBORELIOZE

EVA RUŽIĆ-SABLJIĆ¹, OKTAVIJA ĐAKOVIĆ RODE^{2,3}

¹Institut za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani, Ljubljana, Slovenija;

²Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb, Hrvatska; ³Stomatološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Lajmska neuroborelijoza (LNB) nastaje hematogenim rasapom borelija u središnji živčani sustav (SŽS), a opisan je i prodor putem perifernog živca. Razvija se serozni meningitis sa ili bez pareze kranijalnog živca što je prevladavajuća klinička slika. Najčešće je zahvaćen *n. facialis*. Za razliku od Sjeverne Amerike, u Europi mogu biti zahvaćeni i drugi kranijalni živci, što se povezuje s prevaliranjem različitih vrsta borelija - u Europi najčešće *B. garinii*, *B. bavariensis* i *B. afzelii*, a u Sjevernoj Americi samo *B. burgdorferi* sensu stricto. Meningoradikulitis ili Bannwarthov sindrom tipična je slika LNB samo u Europi. Simptomi LNB većinom nisu tipični i mogu sličiti različitim neurološkim bolestima, pa dijagnozu često nije jednostavno definirati. Dijagnostika LNB mora uključivati analizu likvora u kojem je značajan nalaz pleocitoze, što upućuje na serozni meningitis kojem je potrebno dokazati povezanost s borelijama. Mikrobiološka dijagnostika LNB obuhvaća kultivaciju, zahtjevu i dugotrajnu metodu (9-12 tjedana) koja se radi isključivo u referentnim centrima, te molekularnu (PCR) i serološku dijagnostiku. Zbog malog broja borelija u likvoru kao i relativno male količine likvora koja se šalje za analizu, molekularna je dijagnostika često lažno negativna. Stoga je serološka dijagnostika ključna za dokazivanje LNB. Serologija se radi iz istovremeno uzetih uzoraka seruma i likvora u kojima se određuju specifična protutijela IgM i IgG te ukupni imunoglobulini i/ili albumini. Serum i likvor moraju se analizirati istom metodom u istim uvjetima kako bi se mogla odrediti intratekalna sinteza specifičnih protutijela, tj. izračunati indeks protutijela (*antibody index*, AI). Specifična protutijela u lajmskoj borelijozi nastaju relativno sporo, a s duljinom trajanja infekcije njihova količina se povećava. U ranoj LNB protutijela u likvoru ne može se uvijek otkriti, iako je prisutna pleocitoza. Kasnu LNB u pravilu prati jaki imunوسي odgovor i uz pleocitozu često se nalazi pozitivan AI. Nakon infekcije, vremenom se likvor normalizira i pleocitoza se više ne nalazi, iako specifična protutijela u likvoru mogu ostati dugo prisutna, čak i uz pozitivan AI. Stoga je potrebno pratiti imunوسي odgovor u krvi i likvoru od dana kada se bolesnik javi zbog simptoma i zatim nakon npr. jednog, tri, šest i dvanaest mjeseci, radi procjene korelacije nalaza i bolesti. Dijagnoza LNB mora biti u skladu s kliničkim, epidemiološkim i anamnestičkim podacima te laboratorijskim nalazima, posebno u likvoru. LNB je 1) potvrđena ako uz kliničku sliku postoji pleocitoza i intratekalna sinteza specifičnih protutijela; 2) vjerojatna ako intratekalna sinteza nije potvrđena, a specifična protutijela su prisutna u krvi bolesnika; 3) LNB nije vjerojatna ako nema pleocitoze ili nema analize likvora, iako su prisutna specifična protutijela u krvi bolesnika, ali klinička slika i epidemiološka anamneza nisu karakteristični. CXCL13 je biljeg koji može biti koristan kao dodatni test premda nije specifičan za LNB - u likvoru je povišen i prati akutnu upalu. Ako postoji mogućnost, LNB bi trebalo potvrditi kultivacijom i molekularnom dijagnostikom. Interpretacija laboratorijskih i kliničkih nalaza zahtijeva znanje i iskustvo. Informacije se trebaju sagledati u skladu s okolnostima i specifičnosti bolesnika, tako da je svaki bolesnik poseban dijagnostički izazov.

Ključne riječi: lajmska neuroborelijoza, *Borrelia burgdorferi*, mikrobiološka dijagnostika, serološka dijagnostika, likvor, likvorski indeks protutijela

Adresa za dopisivanje: Doc. prim. dr. sc. Oktavija Đaković Rode, dr. med.
Odjel za virusologiju
Zavod za kliničku mikrobiologiju
Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“
Mirogojska 8
10000 Zagreb, Hrvatska
E-pošta: oktavija.rode@bfm.hr

UVOD

Borelije i lajmska borelioza

Borelije su tanke, duge i vrlo pokretne spirohete. Vrste koje nalazimo u ljudi razvrstane su prema kliničkim entitetima koje uzrokuju u dvije skupine: borelije kompleksa *Borrelia burgdorferi sensu lato* (BBSL) koje uzrokuju lajmsku boreliozu (LB) i borelije koje se povezuju s povratnom groznicom. Kompleks BBSL obuhvaća više od dvadeset vrsta borelija od kojih su neke uobičajeni humani patogeni, kao što *Borrelia (B.) afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. burgdorferi sensu stricto* i *B. spielmanii*, a za neke, kao što su *B. valaisiana*, *B. lusitanae* i *B. bissettiae*, patogenost nije sigurno dokazana. Borelije kompleksa BBSL prenose tvrdi štitasti krpelji, a borelije povratnih groznica (*B. recurrentis*, *B. duttonii*) prenose meki krpelji i tjelesne uši. Među borelije povratnih groznica filogenetski spada i *B. miyamotoi* koju prenose iste vrste tvrdih krpelja koji prenose BBSL, a dokazana je u nekoliko imunokompromitiranih bolesnika s infekcijom središnjeg živčanog sustava (SŽS) (1-4).

Borelije kompleksa BBSL prirodno se nalaze u različitim divljim, ali i domaćim životinjama. Posebno važni domaćini su glodavci i ptice. S jednog na drugog domaćina BBSL prenose krpelji vrste *Ixodes* spp. U razvojnem ciklusu iksodesi za prijelaz iz jednog stadija u drugi, od jajašca preko ličinke do nimfe i odrasle jedinke trebaju krvni obrok. Žrtvu ne traže aktivno već čekaju na vlatima trave i niskom raslinju kako bi se nožicama zakvačili za potencijalnog domaćina u prolazu, nakon čega hodaju po njemu tržeći idealno mjesto za prihvaćanje klijestima i ubadanje rilca sa zubićima. Ubod krpelja ne boli ni ne svrbi jer se u slini nalazi specifičan protein koji djeluje kao anestetik i omogućava pričvršćivanje nakon čega započinje sisanje krvi. Ako je krpelj zaražen, borelije iz intestinalnog trakta slinom prelaze u novog domaćina. Jako je važno što prije krpelja otkriti i skinuti s kože polaganim povlačenjem pincetom kojom ga se uhvati ispod tijela kako bi se otpustile nožice i izvuklo rilce, jer vrijeme pričvršćivanja krpelja odnosno vrijeme do infekcije traje od nekoliko sati do nekoliko dana. Nakon izvlačenja ubodno mjesto treba dezinficirati. Rano uklanjanje krpelja najbolji je način prevencije lajmske borelioze. Pretpostavlja se da je za prijenos borelija iz krpelja potrebno najmanje 10 do 24 sata. Čovjek je slučajni domaćin u životnom ciklusu krpelja u kojem mu zaraženi krpelj može prenijeti borelije, ali istovremeno i prekinuti prirodno održavanje borelija, jer nije vjerojatno da će se novi krpelj borelijama inficirati na čovjeku (1).

Rasprostranjenost borelija i bolesti koje mogu uzrokovati povezani su s geografskom rasprostranjenosti vektora. Iksodesi, a time i LB, rašireni su samo u po-

dručjima sjeverne polutke (5). Prevalencija LB značajno se razlikuje između pojedinih europskih područja, a dodatno velike razlike postoje u odnosu na Sjevernu Ameriku. U Europi su u ljudi izolirane *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. burgdorferi sensu stricto* i *B. spielmanii*. Za razliku od Europe gdje su značajne sve vrste BBSL, u Sjevernoj Americi dominantno je za čovjeka patogena *B. burgdorferi sensu stricto*. *B. mayonii* pripada među BBSL, jako rijetko je dokazana kao humani patogen u Sjevernoj Americi, ali ne i u Europi (3). Raširenost različitih vrsta borelija povezana je uz učestalost i različitost kliničkih slika. Literaturni podatci o LB trebaju se stoga oprezno primjenjivati ovisno o regionalnim specifičnostima (6).

Općenito, u kliničkoj slici LB dominantna je kožna promjena *erythema migrans* (EM) (1). Primjerice, u Sloveniji koja je endemska za LB, više od 95 % borelijskih infekcija prođe kao EM. EM kao i druge kožne promjene [multipli EM, borelijski limfocitom, *acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA)] u Europi najčešće uzrokuje *B. afzelii* (>90 %), za razliku od Sjeverne Amerike gdje se kožne promjene uglavnom prezentiraju kao pojedinačni ili multipli EM koje uzrokuje isključivo *B. burgdorferi sensu stricto*. EM najčešće prolazi bez posljedica spontano ili uz antibiotsku terapiju. Ako dođe do diseminacije borelija iz kože, najčešće će se razviti lajmska neuroborelioza (LNB) s kliničkom slikom seroznog meningitisa koji često prati pareza jednog od kranijalnih živaca, najčešće facijalnog. Najčešći uzročnik LNB u Europi je *B. garinii* (oko 65 % slučajeva), a u Sjevernoj Americi *B. burgdorferi sensu stricto* (1,5).

Širenje borelija iz kože može biti usmjereno na velike zglobove (npr. koljeno) i uzrokovati artritis. Lajmski artritis u Europi su rijetki (< 4 %) dok se često opisuju u Sjevernoj Americi (oko 40 % slučajeva) što se povezuje s organotropizmom dominantne *B. burgdorferi sensu stricto*. Iz zglobova borelije su u Europi izolirane vrlo rijetko, a prema vrsti identificirane su različite vrste europskih borelija (1,5).

Osim navedenih najčešćih kliničkih manifestacija, borelijsku infekciju može pratiti niz netipičnih simptoma kao što su glavobolja, mialgije, artralgije, opća slabost, umor, smetnje koncentracije i drugo. Budući da se slične tegobe mogu javljati i u zdravoj populaciji te u drugim bolestima, postavljanje dijagnoze LB nije jednostavno posebno u endemskim područjima (1,5).

Lajmska neuroborelioza (LNB)

Kod sumnje na LNB dijagnostički postupak treba započeti prikupljanjem kliničkih i epidemioloških podataka uz procjenu vjerojatnosti borelijske infekcije. Važni su podatci o ugrizu krpelja i boravku u priro-

di posebno u endemskim područjima tijekom sezone krpelja od travnja do rujna kao i podatak o ranijoj tipičnoj kožnoj promjeni EM. Borelije mogu ući u SŽS hematogeno, a opisano je putovanje borelija do SŽS i uzduž perifernog živca. LNB se razvije u oko 10-15 % borelijskih infekcija (1,5,7).

Unutar šest mjeseci od borelijske infekcije kao odgovor na prodor borelija u SŽS može se razviti serozni meningitis s parezom kranijalnog živca ili bez pareze, što se opisuje kao rana LNB. Kliničke slike i učestalost rane LNB razlikuju se u Europi i Sjevernoj Americi. U Europi se u sklopu borelijskog meningitisa mogu razviti pareze različitih kranijalnih živaca - najčešće je zahvaćen *n. facialis* (u 80 %), zatim *n. abducens*, *n. vestibularis*, *n. opticus*, *n. oculomotorius* i drugi, dok u Americi serozni meningitis prati isključivo pareza vezana za *n. facialis* (5,8-10). Jednostrana ili obostrana pareza kranijalnog živca razvije se u manje od polovine europskih bolesnika sa seroznim meningitisom, a češće se razvije tzv. Bannwarthov sindrom. Garin-Bujadoux-Bannwarthov sindrom ili meningoradikulitis je tipična klinička slika za LNB. Opisuje se samo u Europi, a povezuje se s infekcijom i organotropizmom vrste *B. garinii*. Bannwarthov sindrom nije poznat u Sjevernoj Americi (5,7,9). Rijetko se u sklopu LNB opisuje kranijalni vaskulitis koji se najčešće manifestira kao akutni ishemički izult (8-10).

Kronična periferna polineuropatija obično je povezana s kroničnom kožnom promjenom ACA i u Europi se opisuje kao kasna manifestacija LB koju najčešće uzrokuje vrsta *B. afzelii* (11). Kasna periferna polineuropatija iznimno rijetko je opisana u Sjevernoj Ameri-

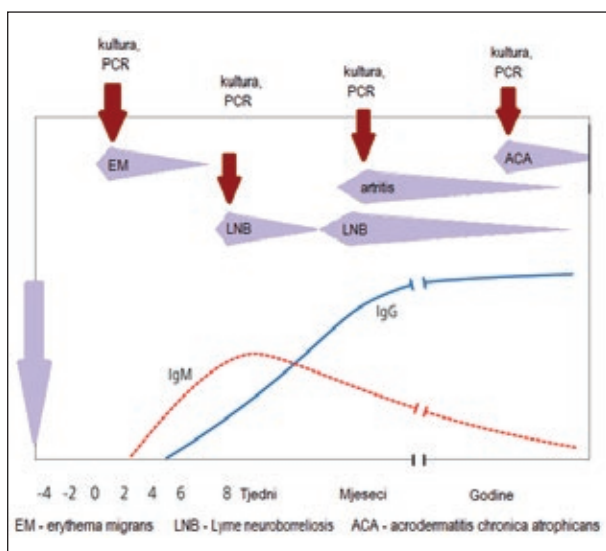
ci, gdje se povezuje s kroničnim lajmskim artritismom i vrstom *B. burgdorferi sensu stricto* (5,9-11).

Nespecifični simptomi koji se pojavljuju u raznim neurološkim bolestima kao što su npr. multipla skleroza, miastenija gravis, kognitivno propadanje, sindrom Guillian-Barre, spastična pareza, optički neuritis, pareza facijalnog živca nepoznate etiologije, a koje se pokušava povezati s borelijskom infekcijom, dodatno su opterećenje u intepretaciji značenja dijagnostičkih testova za LNB (1,8-10). Kod navedenih bolesti potrebno je isključiti LNB što ponekad nije jednostavno, jer osobe koje su ranije imale LB dugo pa i doživotno zadržavaju rezidualna protutijela koja se ne mogu jednoznačno povezati s akutnom bolesti. Stoga pozitivan nalaz, posebno u endemskim područjima gdje postoji velika učestalost LB, može zavesti na krivi zaključak o dijagnozi.

MIKROBIOLOŠKA DIJAGNOSTIKA LAJMSKE NEUROBORELIOZE

Za dijagnozu LNB potrebno je definirati strategiju testiranja, isplanirati mikrobiološku dijagnostiku i uzeti uzorke. Općenito, za borelijsku infekciju karakteristična je dugotrajna prisutnost borelija u domaćinu. Stoga žive borelije možemo očekivati u SŽS-u bolesnika s LNB. Glavni mikrobiološki dijagnostički postupci općenito su usmjereni prema izdvajanju i izravnom dokazivanju uzročnika. Borelije se mogu uzgojiti na posebnim podlogama za kultivaciju i/ili dokazati metodama molekularne dijagnostike kao što je lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR). No, rutinska dijagnostika LB, pa tako i LNB najčešće se radi dokazivanjem specifičnih protutijela serološkim testovima. U bolesnika s LNB protutijela se očekuju u krvi i likvoru. Budući da je stvaranje protutijela dinamički proces, potrebno je određeno vrijeme pratiti imunosni odgovor. Pojavnost, količina i kretanje protutijela u krvi i likvoru te usporedba rezultata testiranja sukcesivnih seruma mogu dati jasniji uvid u tijek infekcije SŽS-a (1,5,8-10). Slika 1 prikazuje vremenski tijek razvoja kliničkih slika i optimalnu mikrobiološku dijagnostiku za definiranje LB i LNB.

Dijagnostika infekcije SŽS-a rutinski započinje analizom upalnih parametara u krvi i likvoru. Analiza likvora ključna je za LNB. Budući da je lumbalna punkcija invazivni postupak koji nije jednostavan za bolesnika, potrebno je dobro klinički procijeniti je li likvor nužno potreban za dijagnostiku, odrediti kada ga treba uzeti, koje analize treba napraviti i koliko je likvora za to potrebno. Likvor se analizira biokemijski, citološki i mikrobiološki, a ostatak se mora sačuvati za daljnje dodatne pretrage. Biokemijskom analizom de-



Slika 1. Razvoj kliničkih slika od ugriza krpelja do pojave simptoma i moguće mikrobiološke metode za dijagnostiku lajmske borelioze.



Slika 2. Dijagnostički algoritam za lajmsku neuroboreliozu (LNB) (8).

Bb, *Borrelia burgdorferi* s.l.; AI, antibody index (indeks likvorskih protutijela)

finiraju se osnovni parametri upalnog procesa, a citološkom količina i vrsta upalnih stanica. LNB je prije svega serozni meningitis koji prati pleocitoza. Obično se nađe 10-1000 leukocita/mm³, uglavnom limfocita i plazma stanica. U perifernoj krvi pak rijetko se nađu povišene vrijednosti leukocita. Kod LNB povišena je razina albumina u likvoru što je znak oštećenja krvno-moždane membrane. Ako biokemijski i citološki nalazi upućuju na serozni meningitis, treba provesti mikrobiološku analizu za dokazivanje pretpostavljenog uzročnika. Među uzročnike seroznog meningitisa treba uključiti i borelije LB, posebno ako borelijsku infekciju podupiru epidemiološki i anamnestički podatci kao i osobitost kliničke slike. Razmotriti treba dostupnost različitih mikrobioloških postupaka i uzeti uzorke za kultivaciju, PCR i serologiju (8, 12). Dijagnostički algoritam za dokaz rane LNB prikazuje slika 2.

Kultivacija borelija

U LNB borelije su mogu pokušati izolirati iz likvora. U likvoru kao i u drugima tjelesnim tekućinama borelije su rijetke zbog čega količina uzorka mora biti što veća (npr. 2 mL likvora). Osim toga borelije su osjetljive bakterije i mogu brzo propasti zbog čega se preporuča uzeti likvor izravno u tekuću podlogu za rast borelija već za vrijeme lumbalne punkcije kako bi se povećala osjetljivost metode. Uspješnost izolacije bo-

relija iz likvora ne prelazi 10vb% (1,5,7-10,13). Prema literaturnim podacima o vrstama izoliranih borelija, LNB u europskih bolesnika najčešće uzrokuje *B. garinii*, a slijedi *B. afzelii* i rijetko *B. burgdorferi sensu stricto*. U Sjevernoj Americi jedini uzročnik LNB *B. burgdorferi sensu stricto* (1,5,7,9,13-17).

Borelije imaju dugo generacijsko vrijeme tako da rezultat kultivacije treba čekati tjednima. Za vrijeme višetjedne kultivacije uzorci se moraju presađivati na svježe podloge, centrifugirati i mikroskopirati, za što je potreban dobro izučeni kadar u opremljenom specijaliziranom laboratoriju. Borelije se najčešće dokazuju između drugog i trećeg tjedna kultivacije, ali treba čekati 9-12 tjedana prije nego li se zaključi da je kultura negativna. Za kliničare i bolesnike to je predugo vrijeme čekanja na nalaz. Stoga u današnje vrijeme suvremenih tehnologija i automatizacije, kultivacija kao dijagnostički postupak ostaje samo u referentnim laboratorijima (8,10,14).

Bez obzira na slabu osjetljivost, dugo čekanje rezultata i kompleksnu proceduru, kultivacija je neophodna za istraživanje borelija i LB. Jedino uzgojem spoznalo se da različite vrste borelija imaju različiti potencijal virulencije koji se povezuje s težinom kliničke slike i imunosnim odgovorom. Sposobnost prerastanja pojedine borelijske vrste u mješovitoj kulturi u tekućim podlogama (*B. burgdorferi sensu stricto* preraste *B. garinii*, a ova *B. afzelii*) ekvivalentna je s njenim potencijalom za nastanak i manifestacije infekcije (7,11,13,16,18-20).

Zahvaljujući kultivaciji dokazalo se da borelije nakon infekcije mogu vrlo brzo ući u SŽS (rana diseminacija) i potom se u njemu dugo zadržati. Osim toga borelije mogu preživjeti antibiotsku terapiju, a mogu opstati u organizmu (i u SŽS-u) unatoč snažnom imunosnom odgovoru. Uzastopnom izolacijom borelija iz likvora potvrđeno je da je moguće više puta u životu oboljeti od LNB (1,5).

Analizom izoliranih borelijskih sojeva pokušava se spoznati mehanizme patogenosti, faktore virulencije, organotropizam borelija te objasniti kliničke prezentacije infekcija, npr. različiti tijek LNB odnosno LB u europskih i američkih bolesnika (1,5,16,18,19). Temeljem stečenog znanja više centara u svijetu pokušava napraviti primjereno cjepivo, ali još uvijek bez uspjeha (21).

Molekularna dijagnostika (PCR) za lajmsku neuroboreliozu

Molekularna dijagnostika se već tridesetak godina pokušava implementirati u dijagnostiku LNB. Izvodi se iz istih uzoraka kao i kultivacija koja je preduvjet za

dizajniranje molekularnih testova temeljem istraženih karakteristika izoliranih borelija. Amplifikacijom specifičnih dijelova borelijskog genoma postiže se visoka specifičnost (93–100 %) (1,5,8-10,14,22). Za dokazivanje LNB likvor je najbolji uzorak, iako se PCR može raditi i iz krvi ili bioptata kože uz *erythema migrans*. Kao i kod kultivacije, bolji rezultati dobit će se analizom što većega uzorka, pa se preporuča analiza najmanje 1-2 mL likvora (22,23). Uspješnost dokazivanja borelija PCR-om u likvoru uspješnija je u američkih (25-96 %) nego u europskih (9-32 %) bolesnika, ponovno zbog različitosti uzročnika - *B. burgdorferi sensu stricto* u Sjevernoj Americi, a *B. garinii* ili neka druga borelija u Europi (1,5,15,16).

Velika prednost metode PCR je u brzini dobivanja rezultata koji su gotovi u istom danu. Automatizacija postupka omogućila je bolju standardizaciju i dostupnost metode, a premostila je ranije probleme, kao što su kontaminacija uzorka (lažno pozitivni rezultati), vrijeme čekanja nalaza ili inhibicija reakcije. Zbog malog broja borelija u tkivu, što je posebno značajno u Europi, PCR može biti češće lažno negativan nego što se očekuje. Za interpretaciju značenja rezultata PCR-a osim poznavanja potencijala metode i validacije rezultata, potrebno je znanje i iskustvo, jer za definiranje dijagnoze LNB treba sagledati sve kliničke, ostale laboratorijske te anamnestičke i epidemiološke podatke. Stoga PCR još uvijek nije uobičajena metoda za LB u laboratorijskoj praksi (23).

Serološka dijagnostika lajmske neuroborelioze

Određivanje specifičnih protutijela najčešći je način dokazivanja LNB kao i LB općenito. Provodi se u mnogim mikrobiološkim laboratorijima iako se radi o dijagnostici kod koje rezultati nisu jednoznačni i interpretacija rezultata je izazov. Borelije posjeduju brojne proteine koji sadrže različite antigenske determinante koje mogu potaknuti imunosni odgovor. Antigenska heterogenost borelija potiče stvaranje specifičnih protutijela koja možemo dokazati u krvi, likvoru i sinovijalnoj tekućini (1,5,7-10,13,14). Neki borelijski antigeni kao što su npr. adhezini, flagelin, stresni proteini, membranski proteini, slični su ili jednaki, tj. zajednički s antigenima drugih bakterija, pa protutijela prema njima često križno reagiraju i nisu pouzdana za dijagnostiku LB. S druge strane, postoje specifični antigeni za borelije LB, kao što su OspA, OspB, OspC, p100, p39, p18 ili VlsE koje ne nalazimo kod drugih bakterija, pa je njihovo dijagnostičko značenje drugačije. Dokaz protutijela protiv ovih antigena puno sigurnije potvrđuje LB, iako i tu postoji mogućnost nespecifične reaktivnosti zbog mimikrije borelijskog proteina s proteinima domaćina (1,14). Važno je stoga poznavati karakteristike serološkog testa i antigene koje koriste. Smatra se da

su najpouzdaniji serološki testovi koji sadrže rekombinantne specifične borelijske antigene i izražavaju rezultate kvantitativno što omogućava praćenje dinamike protutijela i izračunavanje indeksa intratekalne sinteze potrebnog za dijagnozu LNB.

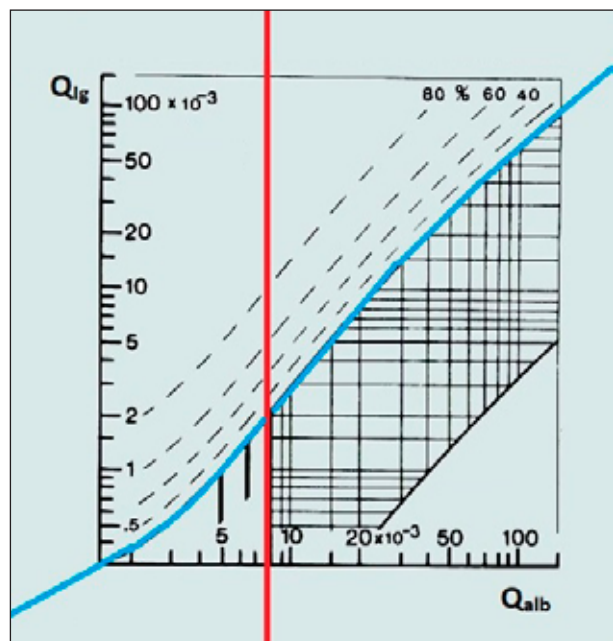
LNB nastaje nakon prodora borelija u SŽS. U SŽS se umnožavaju i potiču lokalni imunosni odgovor i u likvoru sintezu specifičnih protutijela. Iako bi se moglo zaključiti da nalaz pozitivnih protutijela u likvoru automatski potvrđuje LNB, to ipak nije jednoznačno. SŽS funkcionalno je odvojen krvno-moždanom membranom čija je fiziološka uloga održavati ravnotežu albumina i imunoglobulina između krvi i likvora. U upalnim bolestima fiziologija krvno-moždane membrane se poremeti. Najbolji biljeg funkcije krvno-moždane membrane je albumin (65 kD) koji se stvara izvan SŽS i difuzijom ulazi u likvor. Omjer količine albumina između likvora i krvi (likvorski albumin / serumski albumin, Q_{alb}) ima kod zdravih ljudi konstantnu vrijednost, iako se razlikuje prema dobi, i potvrđuje intaktnost krvno-moždane membrane. Kroz krvno-moždanu membranu u likvor osim albumina prolaze i serumski imunoglobulini (Ig). Difuzija imunoglobulina ovisi o razredu imunoglobulina zbog različite molekularne mase (IgM 970 kD, IgG 150 kD i IgA 160 kD) i koncentracije u krvi. Omjeri koncentracija pojedinog razreda imunoglobulina između likvora i krvi (ukupni imunoglobulini razreda M, G ili A u likvoru / ukupni imunoglobulini M, G ili A u krvi; Q_{Ig}) kod intaktne krvno-moždane membrane zdravog čovjeka su konstantni (12,24,25).

Borelijska protutijela mogu se zbog propusnosti krvno-moždane membrane prenijeti pasivno difuzijom iz krvi u SŽS. Osim toga pri uzorkovanju i lumbalnoj punkciji moguć je arteficialni unos protutijela zbog oštećenja krvne žile i miješanja likvora i krvi. Stoga sama prisutnost borelijskih protutijela u likvoru nije nužno znak LNB-a. Borelije koje su prodrle u SŽS potiču lokalnu sintezu protutijela, dok upalni proces općenito povećava propusnost krvno-moždane membrane što zajednički utječe na lokalno povećanu količinu protutijela. Zato je za potvrdu LNB-a nakon procjene funkcionalnosti krvno-moždane membrane potrebno dokazati intratekalnu sintezu protutijela određivanjem indeksa protutijela, *antibody index* (AI). Za određivanje AI nužno je da se uzorci krvi i likvora uzmu u razmaku od najviše tri sata, da bolesnik u međuvremenu nije dobio infuziju ni transfuziju te da se uzorci krvi i likvora obrade istovremeno u istim serijama testiranja (8-10,12-14,24-27). Najprije se odredi količina ukupnih (total-IgM/IgG) i specifičnih borelijskih (Bb-IgM/IgG) protutijela u likvoru i serumu; nakon toga se izračuna omjer između likvorskih i serumskih ukupnih ($Q_{Ig} = \text{total-Ig-likvor} / \text{total-Ig-serum}$) i specifičnih protutijela ($Q_{spec} = \text{Bb-Ig-likvor} / \text{Bb-Ig-serum}$). Da

bi se definirao AI potrebno je izračunati odnos između omjera specifičnih i omjera ukupnih protutijela ($Q_{\text{spec}}/Q_{\text{Ig}}$) što se prikazuje kao numerička vrijednost AI. Zbog fiziološke difuzije specifičnih Bb-Ig u SŽS kroz intaktnu krvno-moždanu membranu njihov AI morao bi biti 1,0 (uz SD 1,3 - 1,5). Sve vrijednosti AI veće od 1,0 ukazuju na intratekalnu sintezu. Što je veća vrijednost AI, intenzivnija je intratekalna sinteza specifičnih Bb-Ig u SŽS (8,10,26,28,29).

Ako je krvno moždana membrana oštećena zbog neke druge bolesti kao što su autoimune bolesti, multipla skleroza, sindrom Guillian-Barre ili drugo, procjenu funkcionalnosti krvno-moždane membrane (Q_{lim}) potrebno je provesti pomoću složenog matematičkog modela i Reiberove hiperbolične formule koja se temelji na koncentraciji albumina Q_{alb} i korelaciji albumina i imunoglobulina (slika 3). Nakon definiranja Q_{lim} pomoću Reiberove formule, AI se izračunava na standardni način usporedbom s vrijednostima za specifična borelijska protutijela (12,25,26).

Primarna detekcija likvorskih protutijela ovisi o osjetljivosti i specifičnosti serološkog testa, a značenje nalaza i procjena intratekalne sinteze obavezno se dokazuje izračunavanjem AI (7,13,27). Prema literaturnim podacima, osjetljivost testova za dokaz rane LNB prosječno je za IgM 54 %, a za IgG 60 %, dok je za kasnu LNB osjetljivost za IgM 6 %, a za IgG do 100 %. Specifičnost primarnih testova načelno je visoka bu-



Slika 3. Reiberov dijagram na kojem je prikazan omjer količina albumina (Q_{alb}) i ukupnih imunoglobulina (Q_{Ig}) u likvoru i krvi. Q_{alb} desno od crvene crte predstavlja oštećenu krvno-moždanu membranu, a Q_{Ig} iznad plave crte intratekalnu sintezu ukupnih protutijela pojedinog razreda (12, 25, 26).

dući da se temelje na rekombinantnim specifičnim borelijskim antigenima, a specifičnost nalaz protutijela u primarnom serološkom testu može se potvrditi imunoblotom ili alternativnim rekombinantnim testom (8,10,28,30,31).

POSEBNOSTI SEROLOŠKE DIJAGNOSTIKE LAJMSKE NEUROBORELIOZE

Preporuke europskih i američkih stručnih društava za LB zastupaju potrebu potvrde rezultata primarnog serološkog testa western / imuno blotom ili alternativnim rekombinantnim testom. To je obavezno ako se kao primarni probirni serološki testovi (EIA ili IFA) koriste testovi koji sadrže brojne pročišćene borelijske proteine odnosno cijelu boreliju što je bila karakteristika prve generacije testova (10,14,28,32). Druga generacija primarnih testova sadržavala je pročišćene borelijske proteine s ponekim rekombinantnim proteinom, dok se testovi treće generacije temelje na izabranim rekombinantnim specifičnim borelijskim antigenima (28). U endemskim područjima s visokom prevalencijom, primarni testovi s rekombinantnim specifičnim borelijskim antigenima dovoljno su osjetljivi i specifični, pa je potvrđivanje rezultata rijetko potrebno što smanjuje troškove i skraćuje vrijeme do rezultata. Međutim, neuobičajena klinička slika koja nije sukladna s pozitivnim borelijskim rezultatom mora potaknuti sumnju u pozitivan serološki rezultat i nalaz je potrebno dodatno evaluirati i provjeriti prije odluke o terapiji. Zato je laboratorijska dijagnostika LNB poseban izazov i odgovornost (8,10,14,28,30,31).

Općenito, specifična protutijela nastaju relativno sporo, količina im se povećava s duljinom trajanja infekcije čime raste broj serološki pozitivnih nalaza. Nije neobično da se u ranoj LNB, uz prisutnu pleocitozu, protutijela u likvoru ne nađu. Kasnu fazu LNB u pravilu prati jaki lokalni imunogeni odgovor uz pleocitozu i češće pozitivni AI. Protutijela u likvoru mogu perzistirati mjesecima. S vremenom se likvor normalizira i pleocitoza se više ne nalazi, ali dugo mogu zaostati prisutna likvorska protutijela uz pozitivan AI. Zato je poželjno pratiti serološki odgovor u krvi i likvoru od dana kada se bolesnik javi zbog simptoma, pa zatim nakon jednog, tri, šest i dvanaest mjeseci radi procjene i korelacije nalaza i bolesti (8,10,14,28,30,31).

U dijagnostici LNB nisu rijetka odstupanja od očekivanih rezultata. Primjerice, kod kliničke sumnje na diseminiranu LB i mogući meningitis, zbog vrlo rane diseminacije borelija u SŽS, likvor bolesnika može biti uredan (jer se infekcija tek razvija), no u likvoru se mogu dokazati borelije kultivacijom ili PCR-om. Dugotrajna prisutnost EM ili podatak o nedavno prebo-

ljenom EM kojeg može pratiti (ali ne mora) prisutnost borelijskih protutijela u krvi, zahtijeva praćenje zbog mogućeg razvoja borelijskog meningitisa koji će se tek kasnije moći dokazati prema imunom odgovoru i likvorskoj pleocitozi. Rjeđe, može se dogoditi da borelije iz kože vrlo brzo prodru u SŽS i razvije se lokalna upala i LNB s pleocitozom, pozitivnim likvorskim protutijelima, pozitivnom kultivacijom ili PCR-om iz likvora, a da se u krvi specifična protutijela ne moraju detektirati - kao što ni EM ne mora biti klinički vidljiv. Stoga i negativni serološki nalaz u krvi treba kritički sagledati i pratiti imunom odgovor u krvi i likvoru.

S druge strane, protutijela u krvi nakon LB prisutna su u različitim koncentracijama dugo, pa i doživotno nakon simptomatske ili asimptomatske infekcije. To je posebno važno percipirati u endemskim područjima s visokom seroprevalencijom u zdravoj populaciji. Ako se kod osoba s pozitivnim borelijskim protutijelima razvije neka druga neurološka bolest, pozitivni serološki nalaz može zvesti u dijagnostici. Pozitivni serološki rezultati u krvi i likvoru sami za sebe ne potvrđuju LNB, pa i u bolesnika s ozbiljnim neurološkim simptomima, jer zbog pasivne difuzije kroz oštećenu krvno-moždanu membranu protutijela se mogu naći i u likvoru. Potrebno je sagledati kliničke, anamnestičke i epidemiološke podatke, duljinu trajanja simptoma, sve prethodne nalaze kao i provedenu terapiju. Ako su bolesnici uz to bez kliničkih i laboratorijskih znakova infekcije SŽS-a i ne nalazimo pleocitozu, koja gotovo uvijek ukazuje na akutni proces, LNB se može s velikom vjerojatnošću isključiti.

CXCL13 i lajmska neuroborelioza

S obzirom na složenost dijagnostike LNB rađene su brojne studije sa ciljem da se nađe specifičan infektivni biljeg (citokin ili kemokin) kao rani pokazatelj infekcije SŽS-a. Od svih ispitivanih biljega CXCL13 pokazao se najperspektivnijim (33). Nakon ulaza borelija u SŽS, lokalni monociti te dendritične stanice, mikroglija, endotelne stanice i limfociti T počinju izlučivati CXCL13 i brzo se povećava njegova razina u likvoru, prije nego li se potvrdi AI. Razina CXCL13 u likvoru povezuje se s količinom borelija u SŽS-u na koje se vežu lokalni monociti koji proizvode CXCL13. CXCL13 je kemoartaktant, potiče migraciju limfocita B u SŽS i time podupire humoralni imunom odgovor. U ranoj fazi LNB, CXCL13 se nalazi u gotovo svim likvorima (100 %) i robustni je biljeg aktivne infekcije. Nakon liječenja brzo se normalizira (tijekom približno 4 mjeseca), mnogo prije nego što se normalizira AI (8,10,34).

CXCL13 nije specifičan za LNB. Može biti povišen u neurosifilisu, tuberkuloznom meningitisu, limfomima SŽS-a i drugim bolestima. Specifičnost za LNB je oko

63 % zbog čega se u rutinskoj dijagnostici ne primjenjuje široko (35). Ipak, budući da prati akutnu upalu, može biti dobar indikator za ranu LNB, iako ne i jedini. Posebno može biti koristan u diferencijalnoj dijagnozi, jer je npr. u virusnim meningitisima, pneumokoknom meningitisu, multiploj sklerozii negativan ili je prisutan u niskim koncentracijama (10,34,35).

ZAKLJUČAK

Dijagnoza LNB mora biti u skladu s kliničkom slikom i laboratorijskim nalazima. LNB je 1) sigurno potvrđena ako kliničku sliku prati pleocitoza i intratekalna sinteza specifičnih protutijela; 2) vjerojatna ako intratekalnu sintezu ne možemo potvrditi, ali su prisutna specifična protutijela u krvi bolesnika uz pozitivne epidemiološke i anamnestičke podatke; 3) LNB nije vjerojatna ako nema pleocitoze ili nema analize likvora, iako su prisutna specifična protutijela u krvi bolesnika, ali klinička slika i epidemiološka anamneza nisu specifični. Ako postoji mogućnost, potrebno je LNB potvrditi kultivacijom i molekularnom dijagnostikom. U dijagnostici LNB neophodne su biokemijske i citološke pretrage krvi i likvora. Za interpretaciju laboratorijskih i kliničkih nalaza potrebni su znanje i iskustvo, jer se informacije mogu prezentirati različito s obzirom na okolnosti i specifičnost bolesnika, tako da je svaki bolesnik poseban izazov.

LITERATURA

1. Stanek G, Strle F. Lyme borreliosis - from tick bite to diagnosis and treatment. *FEMS Microbiol Rev* 2018; 42(3): 233-58.
2. Cutler S, Vayssier-Taussat M, Estrada-Pena A *et al.* A new *Borrelia* on the block: *Borrelia miyamotoi* - a human health risk? *Euro Surveill* 2019; 24(18): 1800170. doi: 10.2807/1560-7917.
3. Cetinić Balent N, Mikulić R, Đaković Rode O. Jesu li *Borrelia miyamotoi* i *Borrelia mayonii* mogući patogeni u Hrvatskoj? *Acta Med Croatica* 2019; 73(2): 187-193.
4. Margos G, Fingerle V, Cutler S *et al.* Controversies in bacterial taxonomy: The example of the genus *Borrelia*. *Ticks Tick Borne Dis* 2020; 11(2): 101335. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.101335.:101335.
5. Radolf JD, Strle K, Lemieux JE, Strle F. Lyme Disease in Humans. *Curr Issues Mol Biol* 2021; 42: 333-84.
6. Dong Y, Zhou G, Cao W *et al.* Global seroprevalence and sociodemographic characteristics of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in human populations: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Glob Health* 2022; 7: e007744. doi:10.1136/bmjgh-2021-007744

7. Ogrinc K, Kastrin A, Lotric-Furlan S *et al.* Colocalization of radicular pain and erythema migrans in patients with Bannwarth's syndrome suggests a direct spread of borrelia into the central nervous system. *Clin Infect Dis* 2022; 75(1): 81-7.
8. Rauer S, Kastenbauer S, Hofmann H *et al.* Guidelines for diagnosis and treatment in neurology - Lyme neuroborreliosis. *Ger Med Sci* 2020; 18: Doc03. doi: 10.3205/000279.
9. Rauer S, Kastenbauer S, Fingerle V *et al.* Lyme Neuroborreliosis. *Dtsch Arztebl Int* 2018; 115: 751-6.
10. Mygland A, Ljostad U, Fingerle V *et al.* EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *Eur J Neurol* 2010; 17(1): 8-16.
11. Ogrinc K, Maraspin V, Lusa L *et al.* Acrodermatitis chronica atrophicans: clinical and microbiological characteristics of a cohort of 693 Slovenian patients. *J Intern Med* 2021; 290(2): 335-48.
12. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci* 2001; 184(2): 101-22.
13. Ogrinc K, Lusa L, Lotric-Furlan S *et al.* Course and Outcome of Early European Lyme Neuroborreliosis (Bannwarth Syndrome): Clinical and Laboratory Findings. *Clin Infect Dis* 2016; 63(3): 346-53.
14. 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.
15. 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; 15;43(6): 704-10.
16. Cerar T, Strle F, Stupica D *et al.* Differences in Genotype, Clinical Features, and Inflammatory Potential of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto Strains from Europe and the United States. *Emerg Infect Dis* 2016; 22(5): 818-27.
17. Maretić T, Benić B, Đaković Rode O, Beritić D, Ružić Sabljić E. First isolation of *Borrelia* sp. (*Borrelia afzelii*) from cerebrospinal fluid in a patient with neuroborreliosis in Croatia. *Infektološki glasnik* 2009; 29(2): 65-70.
18. Maraspin V, Bogovic P, Ogrinc K *et al.* Are Differences in Presentation of Early Lyme Borreliosis in Europe and North America a Consequence of a More Frequent Spirochetemia in American Patients? *J Clin Med* 2021; 1: 10(7):1448. doi: 10.3390/jcm10071448.
19. Strle F, Ruzic-Sabljić E, Logar M *et al.* Comparison of erythema migrans caused by *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia garinii*. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11(9): 1253-8.
20. Ruzic-Sabljić E, Strle F. Comparison of growth of *Borrelia afzelii*, *B. garinii*, and *B. burgdorferi* sensu stricto in MKP and BSK-II medium. *Int J Med Microbiol* 2004; 294(6): 407-12.
21. Gomes-Solecki M, Arnaboldi PM, Backenson PB *et al.* Protective Immunity and New Vaccines for Lyme Disease. *Clin Infect Dis* 2020; 70(8): 1768-73.
22. Barstad B, Quarsten H, Tveitnes D *et al.* Direct Molecular Detection and Genotyping of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Cerebrospinal Fluid of Children with Lyme Neuroborreliosis. *J Clin Microbiol* 2018; 25;56(5): e01868-17. doi: 10.1128/JCM.01868-17.
23. Lager M, Wilhelmsson P, Matussek A, Lindgren PE, Henningsson AJ. Molecular Detection of *Borrelia* Bacteria in Cerebrospinal Fluid-Optimisation of Pre-Analytical Sample Handling for Increased Analytical Sensitivity. *Diagnostics (Basel)* 2021; 12;11(11):2088. doi: 10.3390/diagnostics11112088.
24. Pardridge WM. CSF, blood-brain barrier, and brain drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2016; 13(7): 963-75.
25. Reiber H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 2001; 310(2): 173-86.
26. Reiber H, Otto M, Trendelenburg C, Wormek A. Reporting cerebrospinal fluid data: a knowledge base and interpretation software. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39(4): 324-32.
27. Cerar T, Ogrinc K, Strle F, Ruzic-Sabljić E. Humoral immune responses in patients with Lyme neuroborreliosis. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17(4): 645-50.
28. Branda JA, Steere AC. Laboratory Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clin Microbiol Rev* 2021; 27; 34(2): e00018-19.
29. Đaković-Rode O, Židovec-Lepej S, Maretić T. Poteškoće u dijagnostici neuroborelioze. *Infektološki glasnik* 2006; 26(2): 55-60.
30. 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. doi: 10.1186/s12879-016-1468-4.
31. Ružić-Sabljić E, Đaković Rode O. Zamke i dobroti serološke dijagnostike lajmske borelioze iz laboratorijske perspektive. *Infektološki glasnik* 2021; 41(3): 79-86.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. van Burgel ND, Bakels F, Kroes AC, van Dam AP. Discriminating Lyme neuroborreliosis from other neuroinflammatory diseases by levels of CXCL13 in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 2011; 49(5): 2027-30.

S U M M A R Y

SPECIFICITY OF LYME NEUROBORRELIOSIS DIAGNOSTICS

E. RUŽIĆ SABLJIĆ¹, O. ĐAKOVIĆ RODE^{2,3}

¹*Institute of Microbiology and Immunology, Medical Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia;*

²*Dr. Fran Mihaljević University Hospital for Infectious Diseases, Zagreb, Croatia;* ³*School of Dental Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia*

Lyme neuroborreliosis (LNB) is caused by hematogenous spread of *Borrelia* into the central nervous system (CNS), but entry through a peripheral nerve has also been described. Aseptic meningitis develops with or without cranial nerve palsy, which is the predominant clinical presentation. Facial nerve is most frequently affected. Unlike North America, other cranial nerves can be affected in Europe, which is related to the prevalence of different types of *Borrelia*. *Borrelia (B.) garinii*, *B. bavariensis*, and less frequently *B. afzelii* are most common in Europe, while *B. burgdorferi sensu stricto* is the only North American strain. Meningo-radiculitis or Bannwarth syndrome is a typical LNB presentation described only in Europe. The symptoms of LNB can resemble various neurological diseases, which makes the diagnosis of LNB difficult. The diagnosis of LNB must include analysis of cerebrospinal fluid (CSF) in which pleocytosis is significant to support aseptic meningitis, and the association with *Borrelia* must be proven. Microbiological diagnosis of LNB includes cultivation, a demanding and long-term method (9-12 weeks), which is performed exclusively in reference centers, and molecular (polymerase chain reaction, PCR) and serological diagnostics. PCR is often false-negative due to the low number of strands in the CSF. Thus, serological diagnosis remains crucial to confirm LNB. Serology is performed on simultaneously collected serum and CSF samples, from which specific IgM and IgG antibodies, total immunoglobulins and/or albumins need to be determined. Serum and CSF samples must be analyzed by the same method under the same conditions in order to assess the intrathecal synthesis of specific antibodies, i.e., to calculate the antibody index in CSF (antibody index, AI). In patients with Lyme borreliosis, specific antibodies are produced relatively slowly, and their quantity increases with the duration of the infection. In early LNB, antibodies in the CSF are not always detectable while pleocytosis is present. In late LNB, a strong immune response is present in the CSF, as well as pleocytosis, and a positive AI can be determined. Over time, CSF normalizes and pleocytosis is no longer detected, but CSF antibodies can remain present for a long period of time. Therefore, the immune response in the blood and CSF has to be monitored from the day the patient presented with symptoms, and then, for example, at one, three, six and twelve months to assess the correlation of laboratory findings with the disease. The diagnosis of LNB must be in accordance with clinical, epidemiological and history data and laboratory findings, especially in CSF. LNB is confirmed if the clinical picture is accompanied by pleocytosis and intrathecal synthesis of specific antibodies; LNB is probable if intrathecal synthesis is not confirmed while specific antibodies are present in the patient's blood; and LNB is unlikely if there is no pleocytosis or no CSF analysis, although specific antibodies are present in the patient's blood but the clinical picture and epidemiological history are not characteristic. If there is a possibility, LNB should be confirmed by culture and molecular diagnostics. CXCL13 is a marker that can be useful as an additional test, even though it is not specific for LNB as it is elevated in CSF and observed during acute inflammation. Interpretation of laboratory and clinical findings in LNB requires knowledge and experience. The findings should be interpreted in accordance with the circumstances and condition of the patient, and therefore each patient represents a special diagnostic challenge.

Key words: Lyme neuroborreliosis, *Borrelia burgdorferi*, microbiological diagnostics, serological diagnostics, cerebrospinal fluid, cerebrospinal fluid antibody index