

*Opšti pregled/
General review*

MIKROBIOLOŠKA DETEKCIJA BORRELIA
BURGDORFERI I SAVREMENA
DIJAGNOSTIKA LAJM BORELIOZE*
MICROBIOLOGICAL DETECTION OF
BORRELIA BURGDORFERI AND
CONTEMPORARY DIAGNOSIS OF LYME
BORELLOSIS

Correspondence to:

Prof. dr **Elizabeta Ristanović**
Vojnomedicinska akademija Beograd,
Crnotravska 17,
e-mail: elizabet@eunet.rs

Elizabeta Ristanović¹, Sonja Atanasievska¹,
Vesna Protić-Đokić¹, Nataša Hinić² i Dušan Lalošević²

¹ Vojno medicinska akademija, Odeljenje za mikrobsku genetiku i
imunologiju Instituta za mikrobiologiju

² Medicinski fakultet u Novom Sadu, Pasterov zavod Novi Sad

*Rad je prezentovan na Okruglom stolu o lajmskoj bolesti u Pasterovom zavodu u
Novom Sadu, 30. jula 2017.

Ključne reči

Lajmska boreliozna, *Borrelia burgdorferi*,
PCR metoda, Serološki testovi

Key words

Lyme borreliosis, *Borrelia burgdorferi*,
PCR method, Serological tests

Sažetak

Lajmska boreliozna predstavlja multisistemsku bolest izazvanu *Borrelia burgdorferi*, čiji su glavni prenosioci krpelji *Ixodes spp.* Najčešća klinička manifestacija je u vidu kožne lezije (*erythema migrans*), međutim patogen se može širiti i prouzrokovati oštećenja zglobova, nervnog i kardiovaskularnog sistema. Dijagnoza lajmske bolesti postavlja se na osnovu kliničke slike, epidemiološko-anamnestičkih podataka i rezultata laboratorijskih dijagnostičkih testova. Primena savremene real-time PCR metode omogućava nam testiranje dela kože sa mesta uboda krpelja na prisustvo *B. burgdorferi*. Takođe, u dijagnostici lajmske bolesti često se koriste i indirektno metode za određivanje specifičnih IgM i IgG antitela na *B. burgdorferi* prisutnih u serumu, likvoru i sinovijalnoj tečnosti (TIIF, ELISA, Western blot). Za potvrdu dijagnoze trebalo bi dokazati prisustvo IgG antitela, jer samo prisustvo IgM antitela nije siguran pokazatelj nedavne infekcije. Prilikom interpretacije imunodijagnostičkih testova treba uzeti u obzir fenotipske karakteristike borelija, njihove različite antigenske strukture, različite geografske rasprostranjenosti, fazu i dužinu trajanja bolesti, karakteristike individualnog imunskog odgovora, eventualno prisustvo drugih oboljenja kao i primenjeni antibiotski tretman. Zbog visokog prisustva zaraženih krpelja na našem geografskom području, neophodna je kontinuirana prevencija, epidemiološko praćenje, kao i unapređenje dijagnostičkog i terapijskog pristupa u lečenju lajm-boreliozne.

UVOD

Lajm boreliozna je multisistemsko oboljenje koje najčešće zahvata kožu, zglobove, nervni i kardiovaskularni sistem, a njegov izazivač je spiroheta *B. burgdorferi*. Njeni najčešći vektori su krpelji roda *Ixodes* (vrsta *I. ricinus*) a rezervoari uglavnom mišoliki glodari. Od svih do sada okarakterisanih predstavnika ovog roda kao humani patogeni okarakterisane su vrste *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelli*, *B. garinii*, *B. spielmannii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. bisetti*, ali se zahvaljujući napretku molekularne biologije stalno otkrivaju nove patogene vrste.⁽¹⁾ Ipak, smatra se da najveći značaj kao humani patogen u Evropi ima *B. afzelli* koja se predominantno vezuje za kožne, inače najčešće manifestacije bolesti,

zatim *B. burgdorferi sensu stricto* odgovorna za reumatoške manifestacije koja predstavlja najrasprostranjeniju vrstu na američkom kontinentu i *B. garinii* za koju se smatra da je najčešće povezana sa neurološkim formama bolesti, mada je naučno verifikovano da sve navedene vrste borelija mogu dovesti do pojave različitih kliničkih manifestacija.⁽²⁾ Rane manifestacije bolesti u prvom stadijumu karakteriše pojava karakterističnog prstenastog crvenila - eritema migrans (EM), a zatim i multiplih lezija EM, kao i artritisa, radikulomeningitisa, karditisa, dok su kasne manifestacije vezane za treći stadijum bolesti i pojavu hroničnog atrofičnog akrodermatitisa, artritisa, progresivnog encefalomijelitisa i drugih manifestacija bolesti.⁽³⁾

Agens

Mikrobiološke karakteristike *B. burgdorferi* koje se odnose na genetičku (prisustvo linearnog hromozoma i velikog broja plazmida) i sledstveno tome antigensku varijabilnost (posebno u domenu proteina spoljašne membrane - *outer surface proteins - Osp's*), dug replikacioni period kao i mogućnost sekvestracije u imunoprivilegovana tkiva i intracelularna lokalizacija bakterije ključni su za razumevanje patogeneze, komplikovane kliničke slike i problema u dijagnostici koji iz toga proizilaze. Takođe, mogućnost multiple infekcije krpelja sa različitim vrstama borelije, kao i koinfekcija sa drugim mikroorganizmima (bakterije - *B. myamotoi* - izazivač povratne groznice, *Francisella tularensis* - izazivač tularemije, *Coxiella burnetti* - izazivač Q groznice, *Ehrlichia chafensis*, *Anaplasma phagocytophylum*, *Rickettsia spp.*, virusi-krpeljskog meningoencefalitisa-TBE, Kongo-Krimске hemoragijske groznice; paraziti - *Babesia spp.*) može zakomplikovati kliničku sliku i napraviti probleme u dijagnostici i lečenju lajm borelioze, ali i iznalaženju efikasne vakcine protiv lajm borelioze, jer su se dosadašnje pokazale neefikasnim.⁽⁴⁾ Imajući sve to u vidu, izmenjen je pristup u istraživanjima i trenutno se zapravo radi na iznalaženju anti-krpeljske vakcine koja bi praktično delovala na ubod krpelja (slika 1). Primenom multiplex PCR metode moguće je testirati krpelje na prisustvo različitih patogena što može biti od velike pomoći kako epidemiolozima ukoliko se sprovode istraživanja na određenoj teritoriji, tako i lekarima kliničarima jer se mogu testirati uzorci krpelja skinuti sa kože nakon uboda kako na prisustvo *B. burgdorferi*, tako i ostalih patogena.⁽⁵⁾ Ovakav postupak sprovodi se u Odeljenju za mikrosku genetiku i imunologiju Instituta za mikrobiologiju VMA.

Postekspoziciona profilaksa

Kada je u pitanju ubod krpelja postoje različiti pristupi da li treba sprovoditi profilaktički antibiotski tretman nakon samog uboda ili čekati da se pojave simptomi, ali ova dile-

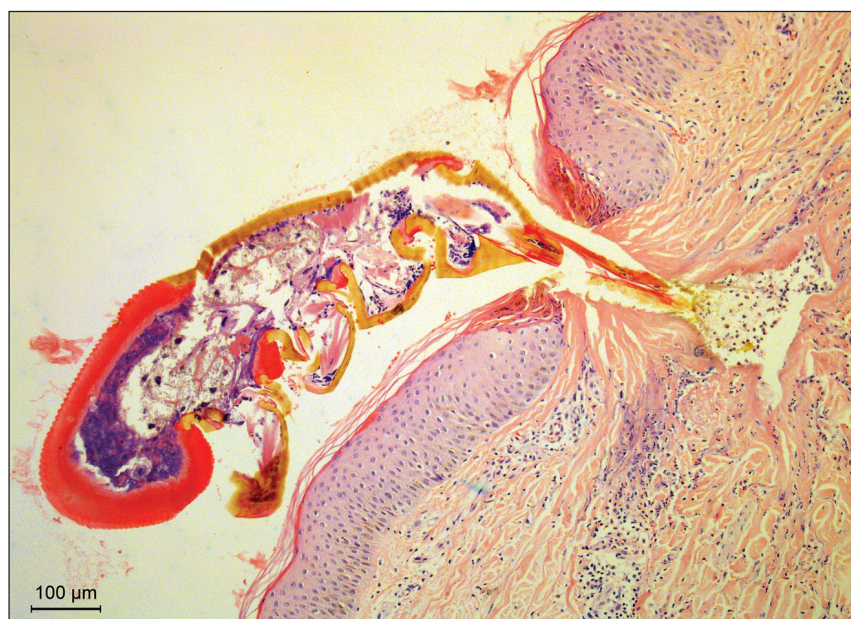
ma se može rešiti pregledom krpelja na prisustvo *B. burgdorferi*, a po mogućnosti i drugih patogena. Ovaj postupak može se sprovoditi direktnom mikroskopijom u tamnom polju crevnog sadržaja krpelja, što je manje specifično (veliki broj artefakata i fibroznih vlakana) i osetljivo (posebno ukoliko je manji broj spiroheta ili ako iste nisu žive) ili PCR postupkom koji je pouzdaniji, osetljiviji i specifičniji.⁽⁶⁾ Obe metode detekcije rutinski se rade za sada u našoj zemlji samo u VMA. Inače, postoje i različiti stavovi o tome nakon koliko vremena boravka na koži krpelj prenosi *B. burgdorferi*. Treba reći i to da nije svako crvenilo, posebno na mestu uboda opasno, jer je reč najčešće o alergijskoj-anafilaktičkoj reakciji na sam ubod, budući da krpelj u svojoj pljuvački sadrži veliki broj hemijski aktivnih supstanci koje deluju i anestetički (zato ubod ne boli), antikoagulantno i anafilaktički. *B. burgdorferi* i veliki broj drugih mikroorganizama se prenose transstadijalno i transovarijalno što praktično znači da su svi razvojni stadijumi krpelja potencijalno infektivni, što je posebno opasno za male lutke i nimfe koje su vrlo često neprimetne, a nakon krvnog obeda same spadaju sa kože, pa oboleli od lajm-borelioze zato često i negiraju ubod krpelja. Ipak, kada se isti primeti, vađenje krpelja je izuzetno zanačajno jer ukoliko se obavi nestručno efekat može da bude potpuno suprotan od željenog, tj. olakšanje unošenja infektivnog agensa.

Upravo zato bilo bi važno obratiti se medicinskoj ustanovi, a ukoliko to ipak nije moguće, onda je važno znati sledeće: krpelja ne treba maltretirati niti provocirati hemijskim agensima kao što se to nekada praktikovalo (alkohol, benzin i slično), jer pod njihovim uticajem može povratiti svoj crevni sadržaj i direktno aplikovati boreliju u kožu domaćina, ali ni fizički zavrtnjem jer može doći do lomljenja i usled čega delovi tkiva krpelja ostanu u koži. Dakle, krpelja treba izvaditi tako što će mu se pincetom prići što bliže glavi, odići zadnji kraj trupa i povući ga ravno. Ukoliko ima mogućnosti, istoga treba istestirati na prisustvo *B. burgdorferi* i/ili drugih patogena, kako bi se izbeglo nepotrebno korišćenje antibiotika. Dok se u SAD svaki ubod leči, u Evropi dominira drugi stav, da treba pratiti da li će doći do razvoja simptoma, mada neki infektolozi zagovaraju i kratkotrajnu profilaksu.⁽⁷⁾

Dijagnostika Lajm-borelioze

Zbog visokog prisustva zaraženosti krpelja na našem geografskom području, samo na teritoriji grada Beograda gde su vršena najintenzivnija istraživanja, u poslednjih 10 godina kreće se u rasponu 20-30%, kao i sve češćeg oboljevanja ljudi, neophodno je stalno raditi na prevenciji i poboljšanju dijagnostike lajm-borelioze.^(4, 6) Zato želimo izneti pregled savremenih metoda i postupaka koji se koriste u mikrobiološkoj dijagnostici lajmske bolesti.

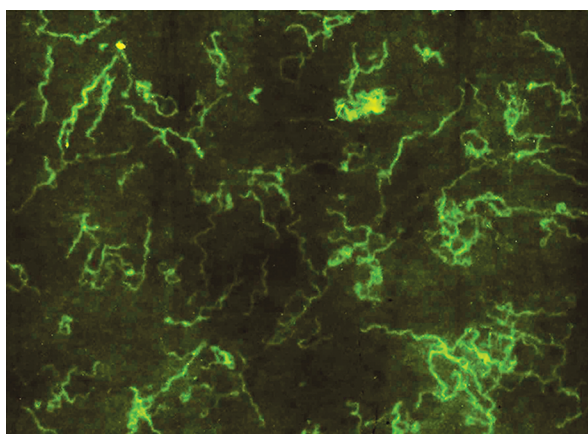
Dijagnoza lajmske bolesti postavlja se na osnovu kliničke slike, epidemiološko-anamnestičkih podataka i rezultata laboratorijskih dijagnostičkih testova koji se mogu podeliti na direktne i indirektne.



Slika 1. *Ixodes ricinus* ženka u koži čoveka uklonjen hirurški (dr Darko Uzelac, DZ „Dr Cvjetković“ Novi Sad), histološki preparat, orig.

Iako direktne metode u mikrobiološkoj dijagnostici imaju najveći značaj, ipak postoje određena ograničenja kada je u pitanju lajm boreliozu. Tako postupci mikroskopije i imunohistohemije nisu od dijagnostičke važnosti, dok je metoda kultivacije *B. burgdorferi* na specifičnim - BSK podlogama dugotrajna, traje 6-8 nedelja i veoma zahtevna metoda, a njena osetljivost iznosi 40-70% iz bioptata kože, oko 10% iz likvora, a samo 1% iz krvi.⁽⁸⁾ Stoga ovaj postupak ima značaj pre svega za karakterizaciju izolata *B. burgdorferi* i određivanje njihove genotipske i fenotipske varijabilnosti što je izuzetno značajno sa epidemiološkog i ekološkog stanovišta ali i za utvrđivanje puteva prenosa, razumevanje imunopatogeneze i unapređenje dijagnostike. Metode molekularne genetike poput PCR koriste se sve više u dijagnostici iako i tu postoje određene specifičnosti, a one se odnose na nemogućnost potpune standardizacije vezano za izolaciju DNK i odabir odgovarajućih prajmera i uslova reakcije, kao i interlaboratorijsku komparabilnost i nisku osetljivost posebno ukoliko se kao uzorak koristi krv (serum ili plazma) što je logično s obzirom na činjenicu da je bakterijemija kratkotrajna, svega oko 24-48 sati, kao i iz uzoraka cerebrospinalne tečnosti-likvora. Znatno bolji rezultati postignuti su kada je u pitanju bioptat kože u slučaju pojave EM, kada se uzorak uzima sa granice obolelog i zdravog tkiva, gde se očekuje najviše spiroheta i tu osetljivost iznosi 70-80%.⁽³⁾ Ipak, PCR predstavlja metod izbora pri sumnji na lajmski artritis u uzorcima sinovijalne tečnosti, kao i za detekciju *B. burgdorferi* u uzorcima krpelja što je napred navedeno. Od direktnih metoda primenjuje se i detekcija antigena *B. burgdorferi* pomoću monoklonskih antitela koja su nekada takođe pripremana u VMA.

U dijagnostikovanju lajmske bolesti najčešće se koriste indirektno metode za određivanje specifičnih IgM i IgG antitela na *B. burgdorferi* u serumu, likvoru i sinovijalnoj tečnosti. Stvaranje specifičnih antitela zavisi i od fenotipskih karakteristika borelija, njihove različite antigenske strukture, različite geografske rasprostranjenosti i sposobnosti bolesnika da reaguje na infekciju. Primenjuje se *dvostepeni (two-step) protokol* koji podrazumeva izvođenje

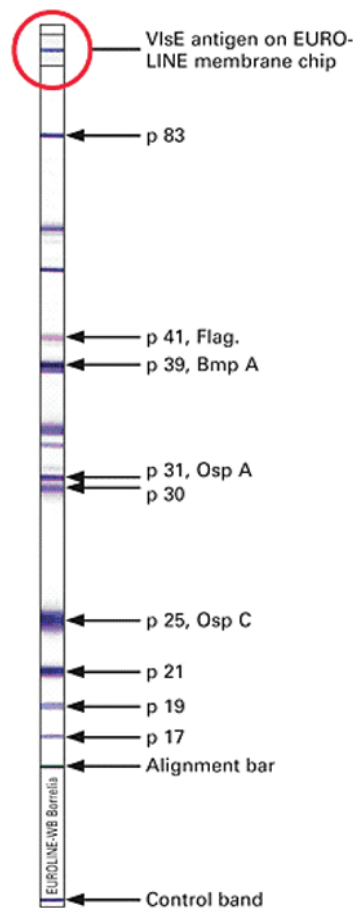


Slika 2. Indirektni imunofluorescentni test na lajmsku bolest, orig.

inicijalnog-skrining testa (test indirektno imunofluorescencije - TIIIF (Slika 2) čiji je nedostatak određena subjektivnost prilikom interpretacije ili imunoenzimski - ELISA test) i *potvrđnog* Western-blot (WB) metoda kojim se

utvrđuje prisustvo antitela na pojedinačne antigenske frakcije *B. burgdorferi* (Slika 3) i koji se sprovodi ukoliko je rezultat skrining testa graničan ili pozitivan. WB test je osetljiviji, specifičniji i informativniji metod u odnosu na ELISA test. S druge strane, ELISA test je izuzetno značajan jer omogućuje monitoring titra antitela.⁽⁹⁾

Osetljivost i specifičnost imunodijagnostičkih testova zavise od tipa i vrste korišćenih antigena *B. burgdorferi* s obzirom na geografsku distribuciju *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* i *B. afzelii*, antigensku specifičnost, mogućnost multiple infekcije i koinfekcije i samim tim prisustvo unakrsne reaktivnosti između vrsta borelija, ali i sa ostalim spirohetama (treponeme, leptospire) i drugim mikroorganizmima (*Helicobacter pylori*, *Epstein-Barr virus*) kao i od načina pripreme antigena (*cele bakterije*: lizat ili sonikat; *imunodominantni proteini*: purifikovani ili rekombinantni - *Osp C*, p41, p39, p58, *OspA*, p17, VlsE). Upravo zato je za interpretaciju ovih testova, pre svega Western blota, značajno poznavanje antigenskih karakteristika pojedinih proteina: npr. p41- unutrašnji deo flagelinskog molekula, izuzetno imunogen ali ima realtivno mali dijagnostički značaj zbog ukrštene reakcije sa flagelinom drugih bakterijskih vrsta, *proteini spoljašnje membrane - Osp C* - p 25 kDa marker rane faze imunosti, *Osp A*-p31kDa, *OspB*, protein protoplazmatskog cilindra p39, p 83/100 - indikator kasne faze lajmske boreliozu, p17, p21, p43, p58, VIS E - varijabilni površinski lipoprotein koji se eksprimira samo *in vivo*, zajednički je za različite vrste borelija, imunogen u ranoj i kasnoj fazi



Slika 3. Mikrobiološka dijagnostika lajmske boreliozu - Western blot, Euroimmun, Nemačka

bolesti, ispoljava se u više od 1030 varijanti što je strategija *B. burgdorferi* za izbegavanje imunskog odgovora domaćina. Inače, važna karakteristika *B. burgdorferi* je različito ekspimiranje antigena u različitim fazama i domaćinima (*OspA* - srednje crevo krpelja i tkiva inficiranog domaćina, *OspC*-pljuvačne žlezde krpelja, VIS-tkiva i krv inficiranog domaćina).^(10, 4) Interpretacija imunoblota sprovodi se na osnovu odgovarajućih definisanih kriterijuma, a za procenu intenziteta imunoreaktivnosti pojedinačnih antigenskih frakcija preporučljivo je koristiti sken denzitometrijske metode.

Prilikom interpretacije imunodijagnostičkih testova treba uzeti u obzir fazu i dužinu trajanja bolesti, karakteristike individualnog imunskog odgovora, eventualno prisustvo drugih oboljenja kao i primenjeni antibiotski tretman.⁽¹¹⁾

U ranoj fazi klinička slika ne mora biti specifična za ovo oboljenje. S obzirom na to da se imunski odgovor razvija relativno kasno, rezultati testova za određivanje antitela mogu biti negativni. Zato je obavezno testiranje drugog, parnog uzorka koji treba uzeti u razmaku od 4-6 nedelja nakon prvog. Dve do četiri nedelje nakon infekcije koncentracija imunoglobulina IgM klase raste, dostižući najveću koncentraciju u šestoj nedelji, a njihov titar opada nakon 4-6 meseci. IgG antitela se javljaju 6 do 8 nedelja nakon infekcije i perzistiraju mnogo godina posle infekcije, pokazujući nizak pad u titru koji se detektuje uz pomoć ELISA testa. Kod nekih bolesnika može se sresti postojanje samo IgM antitela u dužem periodu, pa ih je zato potrebno klinički pratiti. Za potvrdu dijagnoze trebalo bi dokazati prisustvo IgG antitela, jer samo prisustvo IgM antitela nije siguran pokazatelj nedavne infekcije. Kod manjeg broja pacijenata i u kasnoj fazi borelioze humoralni imunski odgovor može izostati, a može biti i prekinut ranim uvođenjem antibiotske terapije. Postoje bolesnici koji su slabi reaktori i kod kojih se antitela ne mogu detektovati.⁽¹²⁾

Lažno pozitivni rezultati u serološkoj dijagnostici lajmske bolesti su pronađeni kod 5-8% zdrave populacije. Lažno pozitivni rezultati su povezani sa: skriningom bez

potvrđnog testa; ukrštenom reakcijom sa izazivačem sifilisa *Treponema pallidum*, *Ehrlichia spp.*, *Helicobacter pylori*, EBV antigenima; ukrštenu reakciju daju uglavnom IgM antitela i prouzrokovana je nekim antigenima borelije, koji se javljaju u velikom broju i kod drugih organizama; hipergamaglobulinemijom, prisustvom autoimunskih i reumatskih oboljenja, hipotireozom. Lažno negativni rezultati u serološkoj dijagnostici mogu biti prouzrokovani pre-ranim serološkim ispitivanjem; imunodeficijencijom kod pacijenata; prisustvom imunskih kompleksa - u slučaju masovne infekcije *B. burgdorferi*, bakterijski antigeni mogu vezati cirkulišuća antitela i takve komplekse nije moguće detektovati serološkom metodama; lokalnom produkcijom antitela isključivo u cerebrospinalnoj ili sinovijalnoj tečnosti; uticajem antibiotika ili intracelularnom rezistencijom na *B. burgdorferi*.⁽⁴⁾

Kod pacijenata sa neuroboreliozom antitela se mogu stvarati intratekalno ali ista, predominantno IgG antitela nekada mogu preći hematoencefalnu barijeru. Zato kod tih bolesnika uvek treba istovremeno uzimati serum i likvor i odrediti indeks antitela koji se izračunava prema sledećoj formuli: $IgG \text{ indeks} = \frac{\text{(anti Bb IgG u likvoru/ukupni IgG u likvoru)}}{\text{(anti Bb IgG u serumu/ukupni IgG u serumu)}}$. Za potvrdu intratekalnih antitela IgG indeks mora biti veći od 1. Za dijagnostiku pre svega akutne neuroborelioze danas se primenjuje i detekcija CXCL13 hemokina u likvoru. Ovaj hemokin je atraktant B limfocita, a njegova koncentracija značajno opada nakon uspešne terapije.⁽¹³⁾

Zaključak

Na osnovu svega napred navedenog jasno je da je rad na unapređenju mikrobiološke dijagnostike lajm borelioze, ali i na utvrđivanju epidemioloških, ekoloških karakteristika, puteva prenosa, imunopatogeneze, prevenciji i profilaksi lajm-borelioze i ostalih krpeljski prenosivih bolesti značajan, kompleksan i permanentan zadatak koji se mora sprovesti multidisciplinarno i timski.

Abstract

Lyme borreliosis is a multi-system disease caused by *Borrelia burgdorferi*, which is transmitted by hard ticks *Ixodes spp.* The most common clinical manifestation is the skin lesion (erythema migrans), however there is a tendency of the pathogen to spread and cause damages to the joints, nervous and cardiovascular system. The diagnosis of Lyme disease is based primarily on clinical findings, epidemiological and anamnestic data and laboratory test results. The application of the modern real-time PCR method allows us to test the skin in tick bite area for a presence of *B. burgdorferi*.

In the diagnosis of Lyme disease, we often use indirect methods (TIIF, ELISA, Western blot) for detecting specific IgM and IgG antibodies against *B. burgdorferi* in serum, liquor and synovial fluid. To confirm the diagnosis, the presence of IgG antibodies should be demonstrated, since the presence of IgM is not a reliable indicator of a recent infection. When interpreting immunodiagnostic test results it has to be considered that there are a lot of variability as the phenotype characteristics of borrelia, different antigenic structures, different geographical distribution, phase varies in duration of the disease, characteristics of individual immune responses, presence of other diseases as well as the applied antibiotic treatment, which all can affect the outcome. Due to the high presence of infected ticks in our geographical area, it is necessary to provide continuous preventive measures, epidemiological monitoring and improvement of the diagnostic and therapeutic approach in the treatment of Lyme borreliosis.

LITERATURA

- Pritt, B. S., Mead, P. S., Johnson, D. K. H., Neitzel, D. F., Respicio-Kingry, L. B., Davis, J. P., ... & Paskewitz, S. M. (2016). Identification of a novel pathogenic *Borrelia* species causing Lyme borreliosis with unusually high spirochaetaemia: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(5), 556-564.
- Ristanovic, E. S., Kitamura, K., Masuzawa, T., Milutinovic, M. J., Cekanac, R. M., Stajkovic, N. T., & Zivanovic, D. M. (2007). Molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated in the area of Belgrade, Serbia. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(1), 14-16.
- Naktin, J. P. (2017). Diagnostic Utility of Erythema Migrans. *Clinical Infectious Diseases*.doi.org/10.1093/cid/cix544
- Jovanovic, D., Atanasievska, S., Protic-Djokic, V., Rakic, U., Lukac-Radoncic, E., & Ristanovic, E. (2015). Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in occupationally exposed persons in the Belgrade area, Serbia. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(3), 807-814.
- Schlachter, S., Chan, K., Marras, S. A., & Parveen, N. (2017). Detection and Differentiation of Lyme Spirochetes and Other Tick-Borne Pathogens from Blood Using Real-Time PCR with Molecular Beacons. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*, 1616, 155.
- Cekanac, R., Pavlovic, N., Gledovic, Z., Grgurevic, A., Stajkovic, N., Lepsanovic, Z., & Ristanovic, E. (2010). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in Belgrade area. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(5), 447-452.
- Moore, A., Nelson, C., Molins, C., Mead, P., & Schriefer, M. (2016). Current guidelines, common clinical pitfalls, and future directions for laboratory diagnosis of Lyme disease, United States. *Emerging infectious diseases*, 22(7), 1169.
- Golightly, M. G., Thomas, J. A., & Viciano, A. L. (2016). The laboratory diagnosis of Lyme borreliosis. *Laboratory Medicine*, 21(5), 299-304.
- Leeflang, M. M. G., Ang, C. W., Berkhout, J., Bijlmer, H. A., Van Bortel, W., Brandenburg, A. H., ... & Hovius, J. W. R. (2016). The diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis in Europe: a systematic review and meta-analysis. *BMC infectious diseases*, 16(1), 140. doi: 10.1186/s12879-016-1468-4.
- Molins, C. R., Delorey, M. J., Sexton, C., & Schriefer, M. E. (2016). Lyme borreliosis serology: performance of several commonly used laboratory diagnostic tests and a large resource panel of well-characterized patient samples. *Journal of clinical microbiology*, 54(11), 2726-2734.
- Tseng, Y. J., DeMaria Jr, A., Goldmann, D. A., & Mandl, K. D. (2017). Claims-Based Diagnostic Patterns of Patients Evaluated for Lyme Disease and Given Extended Antibiotic Therapy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(2), 116-122.
- Waddell, L. A., Greig, J., Mascarenhas, M., Harding, S., Lindsay, R., & Ogden, N. (2016). The Accuracy of Diagnostic Tests for Lyme Disease in Humans, A Systematic Review and Meta-Analysis of North American Research. *PloS one*, 11(12), e0168613.
- Henningsson, A. J., Gyllemark, P., Lager, M., Skogman, B. H., & Tjernberg, I. (2016). Evaluation of two assays for CXCL13 analysis in cerebrospinal fluid for laboratory diagnosis of Lyme neuroborreliosis. *Apmis*, 124(11), 985-990.