



УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



Татјана Рогановић

**ЗНАЧАЈ *ELISA*, *IMMUNOBLOT* ТЕСТА,
ХЕМОКИНА *CXCL13* И *REAL-TIME PCR* У
ДИЈАГНОСТИЦИ ЛАЈМСКЕ НЕУРОБОРЕЛИОЗЕ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

БАЊА ЛУКА, 2022.



UNIVERSITY OF BANJA LUKA
FACULTY OF MEDICINE



Tatjana Roganović

**DIAGNOTIC VALUE OF ELISA, IMMUNOBLOT
TEST, CHEMOKINE LIGAND (CXCL13) AND
REAL-TIME PCR IN LYME NEUROBORRELIOSIS**

DOCTORAL DISSERTATION

BANJA LUKA, 2022.

Ментор: др Милош Кораћ, професор, ужа научна област Инфектологија, Медицински факултет Универзитета у Београду

Наслов докторске дисертације: Значај *ELISA*, *Immunoblot* теста, хемокина *CXCL13* и *Real-time PCR* у дијагностици лајмске неуроборелиозе

Резиме: Лајмска борелиоза је мултисистемска инфективна болест коју убодом преносе *Ixodes* крпељи а узрокује је спирохета комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Манифестује се кроз три преклапајућа стадијума: 1. стадијум ране локализоване инфекције (*erythema migrans*), 2. стадијум ране дисеминоване инфекције (неколико седмица или мјесеци након убода крпеља; доминантно захвата нервни систем, зглобове, срце, кожу) и 3. стадијум касне дисеминоване инфекције (неколико мјесеци или година након убода крпеља; захвата кожу, нервни систем, зглобове). Нервни систем је други најчешће захваћен систем послје коже. Лајмска борелиоза са неуролошким знацима назива се лајмска неуроборелиоза и може се развити у било ком тренутку у дисеминованој раној и касној фази болести. Разлика између ране и касне лајмске неуроборелиозе је одређена на основу трајања неуролошких симптома мање или више од шест мјесеци. Одређени неуролошки симптоми, посебно када су повезани са податком о убоду крпеља, би увијек требало да подстакну детаљну даљу обраду и процјену за лајмску неуроборелиозу. Не постоји златни стандард међу дијагностичким методама лајмске неуроборелиозе. Доступне дијагностичке методе се могу подијелити на индиректне (двостепена серолошка дијагностика: скрининг тест-*ELISA* и потврдни *Immunoblot* тест) и директне (реакција ланчаног умножавања – *PCR* и култура), веома су значајне, али нису увијек поуздане у дефинитивној дијагнози лајмске неуроборелиозе и треба их тумачити са опрезом и у корелацији са клиничком сликом и другим доступним тестовима, укључујући и цито-хемијску анализу цереброспиналне течности. Повећање концентрације хемокина *CXCL13* у цереброспиналној течности је предложено као потенцијални биомаркер за рану лајмску неуроборелиозу. Потребне су и даље проспективне студије за нове поуздане дијагностичке тестове у циљу унапређења дијагностике лајмске неуроборелиозе и разликовања активне од инактивне форме лајмске неуроборелиозе као и од других болести са сличним клиничким манифестацијама.

Кључне ријечи: лајмска неуроборелиоза, двостепена серолошка дијагностика, хемокин *CXCL13*, *Real-time PCR*

Научна област: Инфектологија

Научно поље: Медицина

Класификациона ознака за научну област према CERIF шифрарнику: В 510

Тип одабране лиценце Креативне заједнице (Creative Commons): Ауторство – некомерцијално-дијелити под истим условима

Menthor: Miloš Korać, Professor, Scientific area Infectology, Faculty of Medicine, University of Beograd

Doctoral thesis: Diagnostic value od ELISA, Immunoblot test, chemokine ligand (CXCL13) and Real-time PCR in Lyme neuroborreliosis

Summary: Lyme borreliosis is a multisystem infectious disease caused by spirochete of the *Borrelia burgdorferi sensu lato complex* and it is transmitted by *Ixodes* ticks. It is manifested through three stages: 1. early localized infection (*erythema migrans*), 2. early disseminated infection (a few weeks or months after tick bite, most commonly affects nervous system, joints, heart, skin) and 3. late disseminated infection stage (a few months or years after tick bite, affects skin, nervous system, joints). The nervous system is the second most commonly affected system after the skin. Lyme borreliosis with neurological manifestations is called lyme neuroborreliosis and it can be manifested at any point of early disseminated and late stage. The difference between early and late lyme neuroborreliosis is defined as duration of symptoms for less or more than six months. Certain neurological symptoms, especially connected to previous tick bite, should always prompt additional diagnostic procedures for evaluation of lyme neuroborreliosis. There is no gold standard for the diagnosis of lyme neuroborreliosis. Available methods can be divided into indirect methods (two-tier testing): screening ELISA test followed by Immunoblot test for confirmation) and direct methods (polymerase chain reaction-PCR and culture), they are very important but not always reliable in definite diagnosis of lyme neuroborreliosis and should be interpreted with caution and in correlation with clinical manifestations and other available tests, including cerebrospinal fluid cytochemical evaluation. High concentration of chemokine CXCL13 in cerebrospinal fluid is suggested as potential biomarkerfor the early lyme neuroborreliosis. Additional prospective studies and new reliable diagnostic test are needed in order to improve diagnosis of lyme neuroborreliosis and to dissociate active from inactive lyme neuroborreliosis and from other diseases with similar clinic manifestations.

Keywords: lyme neuroborreliosis, two-tier testing, chemokine CXCL13, Real-time PCR

Scientific area: Infectology

Scientific field: Medicine

Classification code of the scientific area by CERIF codebook: B 510

Creative Commons licence: Attribution-NonCommercial-ShareAlike

Попис скраћеница

<i>AV</i>	атриовентрикуларни
<i>ACA</i>	<i>acrodermatitis chronica atrophicans</i>
<i>BSK</i>	Барбур-Стоенер-Кели подлога (<i>Barbour-Stoenner-Kelly</i>)
<i>VlsE</i>	варијабилни површински липопротеин (<i>Vmp like sequence</i>)
ДНК	дезоксирибонуклеинска киселина
<i>ELISA</i>	имуноензимски тест (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ЕМ	<i>erythema migrans</i>
<i>IL-6</i>	интерлеукин 6
<i>IgM</i>	имуноглобулин М
<i>IgG</i>	имуноглобулин Г
КТ	компјутеризована томографија
ЛНБ	лајмска неуроборелиоза
МР	магнетна резонанца
<i>NMDAR</i>	<i>N-methyl D-aspartat receptor</i>
<i>Osp</i>	вањски површински протеин (<i>Outer surface protein</i>)
<i>OspA</i>	спољашњи протеин А
<i>OspC</i>	спољашњи протеин Ц
<i>PCR</i>	реакција ланчаног умножавања (<i>polymerase chain reaction</i>)
<i>PET</i>	позитронска емисиона томографија (<i>positron emission tomography</i>)
ХИВ	вирус хумане имунодефицијенције
<i>CDC</i>	Центри за контролу и превенцију болести (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
ЦНС	централни нервни систем
ЦСТ	цереброспинална течност
<i>CXCL13</i>	хемокин лиганд 13 (<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 13</i>)

Садржај

1. УВОД.....	1
1.1 Епидемиологија и патогенеза лајмске борелиозе.....	1
1.2 Клиничке манифестације лајмске борелиозе.....	5
1.2.1 Рана локализована инфекција	6
1.2.2 Рана дисеминована инфекција	7
1.2.3 Касна дисеминована инфекција.....	8
1.3 Лајмска неуроборелиоза.....	9
1.3.1 Ране неуролошке манифестације.....	9
1.3.2 Касне неуролошке манифестације.....	11
1.4 Дијагностичке методе.....	11
1.4.1 Индиректне дијагностичке методе	12
1.4.2 Директне дијагностичке методе	16
1.5 Дијагностички критеријуми за лајмску неуроборелиозу	18
1.6 Неурорадиолошки налази код обољелих од лајмске неуроборелиозе	19
2. РАДНА ХИПОТЕЗА	20
3. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	21
4. ИСПИТАНИЦИ И МЕТОДЕ РАДА.....	22
4.1 Одабир испитаника.....	22
4.2 Анализирани подаци.....	23
4.3 Серолошка анализа крви и цито-хемијска, серолошка и молекуларна анализа цереброспиналне течности.....	25
4.3.1 Цито-хемијска анализа цереброспиналне течности.....	26
4.3.2 Серолошка анализа крви и цереброспиналне течности.....	27
4.3.3 Молекуларна анализа цереброспиналне течности.....	28
4.4 Статистичка анализа.....	32
5. РЕЗУЛТАТИ.....	33
5.1 Резултати епидемиолошког истраживања	33
5.2 Клинички резултати.....	37
5.3 Резултати добијени дијагностичким поступцима	40

5.3.1 Резултати хематолошко-биохемијске анализе крви.....	40
5.3.2 Резултати цито-хемијске анализе цереброспиналне течности	41
5.3.3 Резултати директних дијагностичких метода (серолошка дијагностика).....	44
5.3.4 Резултати индиректних дијагностичких метода (молекуларна дијагностика) ...	54
5.3.5 Резултати неурорадиолошких налаза	55
6. ДИСКУСИЈА.....	56
7. ЗАКЉУЧЦИ	72
8. ЛИТЕРАТУРА.....	74

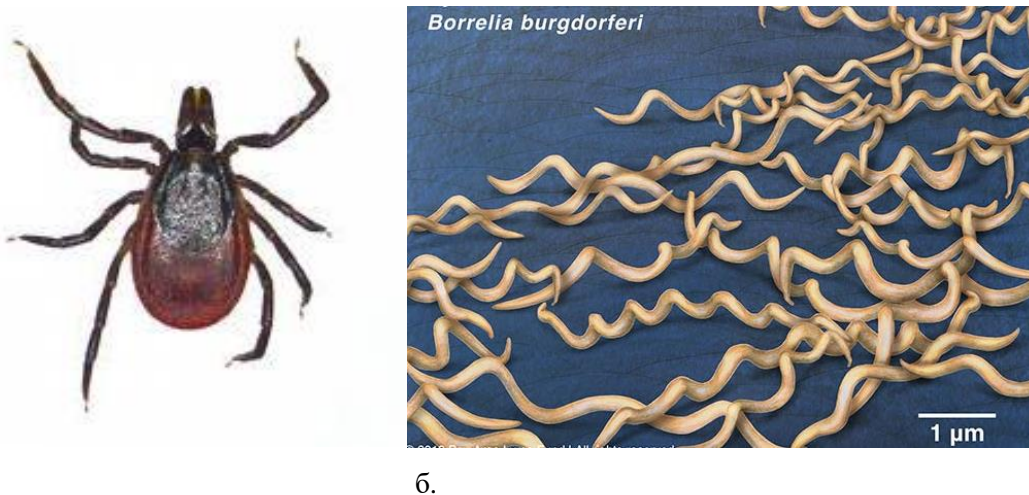
1. УВОД

Лајмска борелиоза је мултисистемска инфективна болест коју убодом преносе *Ixodes* крпељи, а узрокује је спирохета комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* ^[1,2,3,4,5,6]. У Европи, Сјеверној Америци и дијеловима Азије је најчешћа векторска болест, ендемски распрострањена ^[2,5-9].

У сјеверноамеричкој држави Конектикат (*Connecticut*), у мјесту Лајм (*Lyme*) је 1976.године код дјете препознат артритис који је добио назив лајмски артритис ^[4,6]. Након овог извјештаја откривено је да је лајмски артритис дио компликоване мултисистемске болести која је укључивала *erythema migrans*, Банвартов (*Bannwarth*) синдром (лимфоцитни менингитис, кранијална неуропатија или пареза и болни радикулонеуритис) и хронични акродерматитис (АСА) који је описан у Европи. Етиолошки агенс је установљен 1981.године када је Вили Бургдорфер (*Willy Burgdorfer*) изоловао спирохету *Borrelia burgdorferi* из крпеља *Ixodes scapularis* ^[6,10].

1.1 Епидемиологија и патогенеза лајмске борелиозе

Главни преносиоци лајмске борелиозе су крпељи, у Европи се преклапају *Ixodes ricinus* (слика 1а.) и *Ixodes persulcatus*. У Сјеверној Америци главни преносиоци су крпељи *Ixodes scapularis*, а у западној Америци *Ixodes pacificus*. Крпељ *Ixodes persulcatus* се налази у западној Русији, балтичким земљама, дијеловима Финске, централним регионима источне Русије, сјеверне Монголије, Кине и Јапана. Унутар ових широких подручја бројност крпеља и преваленца инфекције увелико варира и на њих утичу микроклима, вегетација и присуство резервоара инфекције. Преваленца *Borrelia burgdorferi sensu lato* (слика 1б.) инфекције међу крпељима на сјевероистоку Америке и у централној Европи може бити и 40% до 50%. Насупрот томе, преваленца у јужној Америци је мања од 1% ^[6].



Слика 1. *Ixodes ricinus* (а) и *Borrelia burgdorferi* (б)

Borrelia burgdorferi sensu lato обухвата 20 различитих генотипова. За лајмску борелиозу код људи првенствено су одговорни *Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii* у Европи те *Borrelia burgdorferi sensu stricto* у Сјеверној Америци. Хетерогеност *Borrelia burgdorferi sensu lato* чини да су генотипови главни фактор који узрокује регионалне разлике у клиничкој слици код људи обољелих од лајмске борелиозе. На примјер, *Borrelia burgdorferi* првенствено изазива артритис, *Borrelia afzelii* инфекције коже, а *Borrelia garinii* је неуротропна [6,11].

Пренос бактерије *Borrelia burgdorferi* са резервоара путем крпеља на човјека је сложен процес, а дешава се за вријеме храњења крпеља на човјеку [2]. Природни ензоотски циклуси *Borrelia burgdorferi sensu lato* су сложени и варирају у зависности од географске локације. У Европи, *Ixodes ricinus* се храни са више од 300 различитих животињских врста укључујући велике и мале сисаре, птице и гмизавце. Птице су важан резервоар за *Borrelia garinii*, док су глодари важан резервоар за *Borrelia afzelii*. У сјевероисточној Америци, пренос *Borrelia burgdorferi* се дешава са неких глодара, посебно бјелоногих мишева и вјеверица на ларве и нимфе *Ixodes scapularis* [6]. И други мали и средњи сисари и неколико врста птица такође могу послужити као резервоари [2]. Птице селице могу имати улогу у ширењу крпеља на нова подручја, као што је примијећено у централној и источној Канади. У сјевероисточној Америци и у већем дијелу Европе мјесеци врхунца појаве болести су јун и јул, што је последица навика у исхрани нимфалних крпеља који се обично хране у

касно прољеће или рано љето и кључни су извор заразе људи са *Borrelia burgdorferi*. У неким дијеловима Европе, на примјер у Естонији и Шведској, врхунац болести је забиљежен касније, у августу, могуће због сјеверних географских ширина ових земаља. Мање регионалне и годишње варијације повезане су са метеоролошким условима (температура, влажност, падавине) који утичу на храњење крпеља и боравак људи у природи ^[6].

Borrelia показује способност да се лако шири и утиче на различита ткива у организму, користи различите механизме да ефикасно избјегне урођени имуни одговор домаћина, изазивајући мултисистемску инфекцију и различите симптоме болести ^[1,2].

Механички, продирање крпеља у кожу домаћина омогућава испоруку *Borrelia burgdorferi* дубоко у дермис у близини крвних судова. Биохемијски, протеини плувачке крпеља помажу *Borrelia burgdorferi* да успостави инфекцију модулацијом активности домаћина као што су коагулација, фибринолиза и имунолошки одговор. Након што се депонује у кожи *Borrelia burgdorferi* се обично умножава локално прије него што се прошири кроз ткива у крв или лимфни систем, што олакшава миграцију на удаљена мјеста. Покретљивост коју стварају флагеле и пријањање на молекуле домаћина посредовано површинским липопротеинима су кључни за кретање *Borrelia burgdorferi* кроз крв и ткива домаћина и избјегаваче имунолошког одговора ^[6].

Како *Borrelia burgdorferi* не производи токсине или протеазе које разграђују екстрацелуларни матрикс, већина манифестација лајмске борелиозе у сваком стадијуму болести је резултат запаљења изазваног имуним одговорима ^[6].

Спирохете могу преживјети у локализованим нишама код нелијечених пацијената још неколико година, што може изазвати упорне симптоме у неким случајевима ^[6]. Спирохетална инфекција нервног система је додатно компликована, јер експресија гена *Borrelia burgdorferi* може бити различита у крви домаћина у поређењу са цереброспиналном течности. На примјер, познато је да је спољашњи протеин А (*OspA*)

смањен у кожи и крви домаћина, али се нивои *OspA* у цереброспиналној течности у раној фази повећавају ^[2].

Специфичност соја *Borrelia burgdorferi* игра важну улогу у инфективности нервног система. Различите студије су идентификовале методе уласка *Borrelia burgdorferi* у нервни систем. Прво, спирохете улазе у централни нервни систем преко крвотока користећи неколико транспортера и адхезионих молекула, прелазећи крвно-мождану баријеру сложеним трансцелуларним пролазом или ретроградним транспортом са периферних нерава и могу се изоловати из цереброспиналне течности 14-18 дана након убода крпеља ^[2,12].

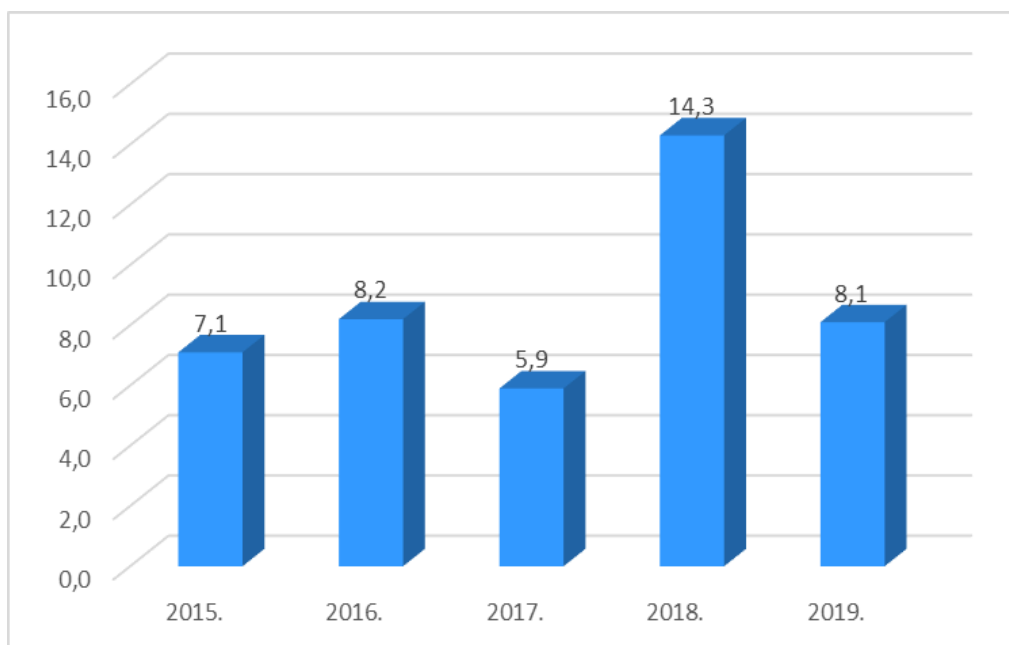
Присуство спирохета у цереброспиналној течности је кључни фактор за развој лајмске неуроборелиозе (ЛНБ). Спирохете су присутне у васкуларним, периваскуларним и екстраваскуларним регионима дура матер. Присуство спирохете је повезано са повећањем Т ћелија и леукоцита унутар можданих овојница. Истраживање улоге *Osp* протеина је неопходно за потпуно разумијевање лајмске неуроборелиозе, посебно *OspA* који може да веже спирохете за менинге ^[2].

Неки рани инфламаторни одговори настају из глијалних ћелија у мозгу и мјере се као повећање маркера цитокина и хемокина. Поред ове ране упале, може се повећати производња проинфламаторног цитокина астроцитног интерлеукина 6 (*IL-6*). Док је акутна лајмска неуроборелиоза обиљежена имунолошким одговором домаћина, дуготрајна лајмска неуроборелиоза може пореметити додатне молекуларне путеве у нервном систему ^[2].

Тренутно нема поузданих епидемиолошких података о учесталости лајмске борелиозе у појединим европским земљама. Непријављивање је значајан проблем, а не може се искључити ни потцјењивање или прецјењивање броја случајева због погрешне дијагнозе или шифрирања^[8]. Процијењена преваленца је 100-130 обољелих на 100 000 становника у Европи, а 20-100 на 100 000 становника у Америци ^[5]. Пријављена инциденца креће се од ниске до занемарљиве у Енглеској и Турској, до више од 80

случајева на 100 000 становника у Холандији, Белгији, Аустрији, Словенији, Литванији и Естонији ^[6].

У 2019.години је пријављено 93 случаја обољелих од лајмске борелиозе у Републици Српској са стопом оболијевања од 8.1⁰/0000 (слика 2.). Анализом кретања стопе морбидитета лајмске борелиозе у петогодишњем периоду од 2015. до 2019. године, највећа стопа оболијевања је била у 2018.години (14.3⁰/0000) са 165 обољелих, у 2017.години је била 5.9⁰/0000, у 2016.години 8.2⁰/0000, у 2015.години 7.1⁰/0000 ^[13].



Слика 2. Стопа инциденце лајмске борелиозе у Републици Српској у периоду од 2015. до 2019. године (Извор: ЈЗУ Институт за јавно здравство, Република Српска)

Осим лајмске борелиозе крпељима се могу пренијети и друге заразне болести као што су крпељски менингоенцефалитис, хумана гранулоцитна анаплазмоза, рикециоза, ерлихиоза и тако даље ^[8].

1.2 Клиничке манифестације лајмске борелиозе

Лајмска борелиоза се, без антибиотске терапије, манифестује кроз три преклапајућа стадијума (табела 1):

1. стадијум ране локализоване инфекције
2. стадијум ране дисеминоване инфекције и
3. стадијум касне дисеминоване инфекције [3,6,9].

Клинички консензус тренутно дијели лајмску борелиозу у акутну локализовану (*erythema migrans*) и рану и касну дисеминовану инфекцију [4].

Табела 1. Стадијуми лајмске борелиозе

Систем	Рана локализована инфекција	Рана дисеминована инфекција	Касна дисеминована инфекција
Кожа	<i>Erythema migrans</i>	мултипли еритеми, макулозни осип, уртикарија, лимфоцитом	АСА
Мишићно коштани систем		миграторне артралгије, бол у мишићима, тетивама, бурзама, костима, краткотрајни артритис	дужи напади артритиса, хронични артритис, периферне ентезопатије, упала периоста или луксације везане за АСА
Нервни систем		менингитис, кранијални неуритис, <i>Bell</i> -ова парализа, моторни и сензорни радикулонеуритис, благи енцефалитис, <i>mononeuritis multiplex</i> , ријетко: мијелитис, кореја, церебеларна атаксија	хронични енцефаломијелитис, спастичка парепареза, атактички ход, благи ментални поремећаји, хронична аксонална полирадикулонеуропатија
Лимфни систем	регионална лимфаденопатија	регионална и генерализована лимфаденопатија, спленомегалија	
Срце		АВ блок I, II и III степена	

1.2.1 Рана локализована инфекција

Рана локализована инфекција се уочава код 80-90% пацијената неколико дана или недјеља након убода крпеља, на месту убода, у виду локализоване промјене на кожи (*erythema migrans*) [1,4,6,8,9]. У року од 3 до 32 дана, борелија може да мигрира по кожи око подручја убода, да се шири лимфним или крвним путем до различитих органа [14]. У Европи *erythema migrans* обично није праћена другим симптомима, за разлику од Америке гдје је често праћена општим симптомима као што су артралгије, миалгије, малаксалост,

умор, главобоља, грозница, регионална лимфаденопатија, субфебрилне температуре или ноћно знојење ^[6,8]. Чак и без антибиотске терапије *erythema migrans* се побољшава или нестаје у року од неколико недјеља ^[6]. Како се спирохете шире кроз крвоток или ткива развијају се различите клиничке манифестације лајмске борелиозе ^[1]. Кожа, зглобови, нервни систем и срце су погођени инфекцијом ^[1,2,9].

1.2.2 Рана дисеминована инфекција

Рана дисеминована инфекција се може јавити неколико седмица или мјесеци након убода крпеља, доминантно захвата нервни систем, зглобове, срце, кожу ^[8].

Код око 25-50% случајева акутне лајмске неуроборелиозе је описана претходна *erythema migrans* ^[8]. *Borrelia burgdorferi* се може проширити на друга мјеста на кожи, изазивајући вишеструке *erythema migrans*. Борелијски лимфоцитом је ријетка кожна манифестација ране лајмске борелиозе у Европи, манифестује се као субакутна лезија коже која се обично јавља на брадавици код одраслих или на ушној ресици код дјецe и најчешће је узрокован инфекцијом *Borrelia afzelii*. *Borrelia afzelii* се не шири тако често као *Borrelia burgdorferi* али може да опстане на кожи мјесецима или годинама, било на месту претходног убода крпеља или на другим мјестима, док је *Borrelia garinii* посебно неуротропна и може изазвати и једно и друго ^[6].

Рана дисеминована инфекција може имати различите неуролошке манифестације. Класична тријада ране дисеминоване лајмске неуроборелиозе се назива менингорадикулонеуритис, укључује лимфоцитни менингитис, кранијалну неуропатију или парезу, често без главобоље, и болан радикулонеуритис који се појављује изоловано или у комбинацији ^[3]. Гаран (*Garin*) и Бужаду (*Bujadoux*) су у Француској 1922.године описали пацијента са менингорадикулонеуритисом након убода крпеља и *erythema migrans* ^[2,4]. Ово је био први извјештај о лајмској неуроборелиози. Неколико година касније Банварт је у Њемачкој описао серију пацијената са сличним поремећајем, што је Европи препознато као Гаран-Бужаду-Банварт или Банвартов синдром ^[4,6]. *Borrelia afzelii*

такође може да изазове неуролошку захваћеност, али клиничке манифестације нису тако јасне као код *Borrelia garinii* ^[6].

Акутна захваћеност срца се такође може јавити током ране дисеминоване инфекције и углавном се манифестује као флукутирајући степен атриовентрикуларног (AV) нодалног блока у коме се електрични импулси из преткомора прекидају прије спровођења у коморе. Друге, мање уобичајене, манифестације укључују акутни миоперикардитис или благу дисфункцију лијеве коморе и ријетко кардиомегалију или панкардитис. Акутни кардитис се обично рјешава у року од неколико недјеља, чак и без терапије антибиотицима, међутим, пријављени су и смртни случајеви ^[6].

1.2.3 Касна дисеминована инфекција

Касна дисеминована инфекција се може јавити неколико мјесеци или година од убода крпеља, захвата кожу, нервни систем, зглобове ^[8,9]. Хронични неуролошки симптоми обично укључују енцефалопатију са когнитивним поремећајима и периферну неуропатију која се манифестује првенствено као спинални радикуларни бол или дисталне парестезије или хипоестезија ^[9].

Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) је најчешћа касна манифестација лајмске борелиозе у Европи. Ове лезије имају инфламаторну фазу са црвенкастом или плавом бојом, праћену атрофичном фазом у којој се кожа знатно истањи, понекад са фиброзним обиљежјима. Обично је на екстензорним (акралним) површинама екстремитета и чешћа је код старијих жена. Око 20% даје податак о претходној *erythema migrans*. Бактерије су изоловане из лезија коже и више од 20 година након првог појављивања ^[6].

У Европи, лајмска борелиоза може да изазове артритис, обично у једном или неколико великих зглобова, посебно у кољену, али се то дешава рјеђе и раније у току болести него у Америци ^[6].

1.3 Лајмска неуроборелиоза

Лајмска борелиоза са невролошким знацима назива се лајмска неуроборелиоза и може се развити у било ком тренутку у дисеминованој раној и касној фази болести [9]. Јавља се у 10%–15% свих случајева лајмске борелиозе и може захватити било који дио нервног система [4,5,9,15]. Симптоми се разликују у европској и америчкој популацији вјероватно као резултат различитих генотипова борелија [1,2]. Разлика између ране и касне лајмске неуроборелиозе је направљена на основу трајања невролошких симптома мање или више од шест мјесеци (табела 2.) [5].

Табела 2. Разлике у презентацији ране и касне лајмске неуроборелиозе

Параметар	Рана лајмска неуроборелиоза	Касна лајмска неуроборелиоза
Појава невролошких симптома	недјеље до мјесеци	мјесеци до године
Типичне манифестације	Банвартов синдром: болни менингоррадикулитис са једностраном или обостраном парезом <i>n.facialis</i>	енцефаломијелитис са спастичким атактичким поремећајем хода заједно са дисфункцијом мокраћне бешике
Бол	радикуларни бол	ријетко било какав бол

1.3.1 Ране невролошке манифестације

Гаран-Бужаду-Банварт синдром (менингоррадикулонеуритис) је најчешћа манифестација акутне лајмске борелиозе код одраслих у Европи након *erythema migrans*, а изоловани менингитис се углавном јавља код дјеце [8,16]. Пацијенти са Банвартовим синдромом обично имају јаке, миграторне радикуларне болове који могу бити повезани са парезом периферних нерава, често у комбинацији са унилатераном или билатералном парезом *n.facialis*, плеоцитозом у цереброспиналној течности (ЦСТ) [4]. Симптоми

радикулитиса се развијају просјечно четири до шест седмица након убода крпеља или након *erythema migrans*. Прво се јавља јак сегментни бол који личи на бол код херпес зостера, који се појачава ноћу и чија локализација може да се мијења. Бол је често локализован на екстремитету гдје се прво уочило мјесто убода крпеља или *erythema migrans* [8]. Пацијент осјети бол у виду осјећаја печења, убода, тргања који слабо реагује на аналгетике [8,16]. Парезе су чешће од сензорних поремећаја [8]. Дистрибуција оштећења периферних нерава је варијабилна и у форми појединачног или мултиплог радикулитиса. Бол нестаје након антибиотске терапије, а спонтано се повуче унутар пет до шест мјесеци без терапије [4]. Око 60% пацијената са Банвартовим синдромом има дефицит кранијалних нерава, сви кранијални нерви могу бити захваћени изузев *n.olphactorius*. *N.facialis* је захваћен код више од 80% случајева у којима су захваћени кранијални нерви, билатерално у једној трећини случајева [8,16]. У случају једностраних промјена, може бити тешко разликовати од идиопатске парезе *n.facialis* [8]. Лимфоцитни менингитис је најчешћа рана манифестација у Сјеверној Америци, главобоља је главна тегоба уз благу укоченост врата [4,6]. Анализа цереброспиналне течности обично показује лимфоцитно-моноклеарну ћелијску плеоцитозу, борелија специфичне олигоклоналне траке се могу појавити, обично након четири седмице болести, као и интратекална синтеза антителија [4].

Енцефалитис, церебеларна атаксија и енцефаломијелитис су ријетки, иако повремено конфузија и знакови захваћености централног нервног система, као што је Бабински знак, могу бити присутни [1,2,4,6,17]. Мање честе манифестације укључују и централни и периферни нервни систем и могу личити на друге поремећаје (дискус хернија, неоплазма) [4].

Захваћеност оптичког нерва је, чини се, занемарен аспект лајмске неуроборелиозе, а може бити значајан. Оптичка неуропатија је ријетка али може да се јави [4,5]. Пријављено је неколико случајева ретробулбарног неуритиса, папилитиса, неуроретинитиса и исхемијска оптичка неуропатија. Едем папиле усљед повишеног интракранијалог притиска код лајмског менингитиса се јавља код дјеце, а описано је и неколико случајева код одраслих [4,5].

1.3.2 Касне неуролошке манифестације

Периферна неуропатија у Европи је повезана са АСА код 48–64% случајева, претежно сензорна и дистална, парестезије и хипоестезије су водећи симптоми [4,8]. Изолована полинеуропатија или полинеуритис без других јасних симптома лајмске борелиозе се виде код 39-52% пацијената у Америци [8].

Захваћеност централног нервног система је ријетка и јавља се код око 4% обољелих од лајмске неуроборелиозе. Почетак је постепен и тегобе су често хроничне. Најчешћа манифестација је мијелитис са спастично-атакским поремећајем хода и дисфункцијом мокраћног мјехура. Симптоми се могу развити током неколико дана или мјесеци. Неки пацијенти пате од тешке тетра- и парепарезе. Приближно 60% пацијената са мијелитисом има и знакове енцефалитиса, а око 40% захваћеност кранијалних нерава [8,16].

Енцефалитис нема клиничких карактеристика специфичних за патоген. Енцефалитис може довести до психијатријске болести или можданог органског синдрома. Пријављени су случајеви акутне психозе или Туретовог (*Tourette*) синдрома [8,16].

У веома ријетким случајевима церебрални симптоми (мождани удар) могу бити узроковани борелија васкулитисом [8,16].

Дифузна енцефалопатија се, уз проблеме са памћењем и различите когнитивне поремећаје, може јавити код пацијената са јасном лајмском борелиозом уз напомену да је стање неспецифично и да се може јавити код пацијената са другим инфективним или метаболичким поремећајима и не указује на активну инфекцију с обзиром на недостатак плеоцитозе и интратекалне производње антителија [4].

1.4 Дијагностичке методе

Не постоји златни стандард међу дијагностичким методама лајмске неуроборелиозе ни код одраслих ни код дјецe [18]. Дијагностичке методе се могу подијелити на индиректне

(серолошке) и директне (реакција ланчаног умножавања – *polymerase chain reaction (PCR)* и култура) [19].

Осим *erythema migrans*, који се обично дијагностикује клинички, друге манифестације лајмске борелиозе се обично дијагностикују препознавањем карактеристичних клиничких знакова и симптома болести заједно са серолошким тестирањем [6,20,21]. Током ране локализоване манифестације лајмске борелиозе (*erythema migrans*) серологија има слабу осјетљивост (30–40%) [20].

1.4.1 Индиректне дијагностичке методе

Све европске или америчке смјернице засноване на доказима препоручују двостепену серолошку дијагностику лајмске борелиозе која се врши детекцијом антибијела иницијално користећи скрининг тест (*enzyme-linked immunoassay- ELISA*) и уколико је он позитиван или неодређен ради се потврди *Immunoblot* тест [4,8,16,17,20,22,23].

а. *Enzyme-linked immunoassay (ELISA)* тест

У случају ране лајмске борелиозе, борелија специфична *IgM* антибијела се могу детектовати од треће седмице, а *IgG* антибијела од шесте седмице и тада се сматра да је серолошки тест сензитиван и специфичан више од 90% [8,16,20]. Интерпретација серолошких тестова (*IgM* и *IgG*) може бити компликована [24]. Серолошко тестирање треба радити само ако постоји адекватна клиничка сумња на активну борелиозу, у супротном ће предиктивна вредност бити ниска [16,22]. Главни проблем серолошке дијагностике лајмске борелиозе је неопостојање златног стандарда и немогућност поуздане корелације између резултата серолошких тестова и клиничког стања пацијента [22].

Мјерљив одговор антибијела може бити одсутан у раној, локализованој манифестацији болести (*erythema migrans*) [8,21,25]. Такође, мјерљив хуморални имуни одговор може изостати и у случају веома ране антибиотске терапије. Могуће је и да не постоји мјерљив *IgM* одговор на примјер у случају реинфекције. Детекција *IgM* не подржава касну манифестацију лајмске борелиозе [8]. Само постојање *IgM* дуже од шест

недјеља треба сматрати лажно позитивним резултатом, због високог ризика од неспецифичних унакрсних реакција ^[20]. *IgM* антителима може недостајати специфичност и могу бити позитивна у случају укрштене реакције са другим спирохетама, *EBV*, *CMV*, *HIV* и аутоантителима ^[24].

Висока концентрација *IgG* антители се обично налази код касних манифестација^[8,16,20]. Извођење серолошког теста на четири недјеље код пацијената са реинфекцијом може помоћи у откривању повећаних нивоа *IgG* ^[20].

Изостанак детекције антители у великој мјери искључује лајмску борелиозу код пацијената са очуваним имунитетом и продуженом болести ^[8]. Сама серопозитивност није довољна да се постави дијагноза лајмске борелиозе ^[20]. Детекција *IgM* и/или *IgG* антители сама за себе није потврда болести изазване борелијом ^[8]. Антитела као одговор на инфекцију са борелијом могу да остану у цереброспиналној течности неколико недјеља или у серуму неколико година ^[2,25]. Серологија није адекватна за мониторинг резултата антибиотске терапије лајмске борелиозе и не препоручује се у ту сврху ^[8,20]. Успјех лијечења треба процијенити на основу клиничких знакова и симптома ^[20]. Висок ниво антители може да буде код лијечених пацијената и неколико година након опоравка ^[6,16,20]. Позитиван серолошки резултат не разликује активну инфекцију од серолошког ожиљка ^[16,20]. Позитиван серолошки резултат без икаквих клиничких знакова и симптома или указује на серолошки ожиљак или на асимптоматску сероконверзију која указује на контаминацију, али не и на активну лајмску борелиозу ^[20].

Хетерогеност антигена борелије може компликовати ситуацију а чак и географско поријекло антигена може узроковати лажно негативне резултате у неким случајевима. Неадекватна интерпретација води непотребној антибиотској терапији али и изостанку лијечења у случају лажно негативних резултата ^[22]. Дуготрајно перзистирање антители након инфекције са борелијом и висока серопреваленца у здравој популацији у ендемском подручју може такође утицати на клиничку дијагнозу јер може бити компликовано разликовати активну од претходне инфекције ^[21]. Поузданост серодијагнозе лајмске борелиозе зависи од различитих фактора, укључујући манифестације и трајање болести,

природни ток болести, антибиотску терапију, карактеристике теста. Антибиотска терапија може зауставити имуни одговор, али скрининг борелија-специфична антителијела могу перзистирати неколико година након тога [23]. Преваљенца борелија специфичних антителијела у популацији може бити изнад 20% у неким подручјима, позитивни резултати не значе увијек и активну болест [24].

б. *Immunoblot* тест

Immunoblot тест се у Америци тумачи према критеријумима Центара за контролу и превенцију болести (*Centers for Disease Control and Prevention - CDC*) и захтијева најмање двије од три значајне траке за позитиван *IgM*, и пет од 10 значајних трака за позитиван *IgG* [4,6]. Међутим, ови критеријуми се не могу користити у Европи, јер ниједан скуп интерпретативних критеријума не даје резултате високе сензитивности и специфичности у свим земљама, због присуства различитих генотипова борелије. У мултицентричној студији за развој критеријума за Европу, свака лабораторија је идентификовала осам трака за употребу у дијагнози, али ниједан сет критеријума није могао да се формулише [6]. Двостепена серолошка дијагностика није осјетљива за рану лајмску борелиозу, тако да негативан резултат не искључује инфекцију са борелијом. Осјетљивост се повећава са развојем дисеминоване инфекције. Док је већина пацијената са *erythema migrans* серонегативна, већина пацијената са неуроборелиозом би требало да буде серопозитивна [4]. Налази на *Immunoblot* тесту, који није квантитативни тест, не мијењају се значајно у пост-антибиотском периоду. Серолошко тестирање се не може користити за одређивање активне инфекције или адекватности антибиотске терапије. Ако пацијенти са прошлом или асимптоматском инфекцијом борелијом развију неку другу болест, посебно ону са неуролошким или зглобним симптомима, симптоми се могу погрешно приписати лајмској борелиози. Из тог разлога, серолошко тестирање постаје мање корисно у дијагностици тренутних симптома код пацијената са податком о претходној инфекцији са борелијом [6].

Borrelia burgdorferi има велики број антигена који се, у зависности од стадијума, могу детектовати са различитим степеном сензитивности и који понекад имају различите

нивое специфичности. Познавање ових протеина је важно када се интерпретирају резултати серолошких тестова ^[8].

Рани имуни одговор (првенствено *IgM*)

- Флагеларни протеин (*Flagellin*, *p41*)
- *OspC* (повезан са спољном мембраном)
- *VlsE*

Касни имуни одговор (првенствено *IgG*)

- *p83/100*, *p58*, *p43*, *p39*, *p30*, *p21*, *DbpA* (*Osp17*) и *p14* (генерално реактивиран са око 80% серума)
- *VlsE* (детектибилан код више од 90% серума)

Неспецифични антигени

- *Flagellin*
- *Heat shock proteins* (*Hsps*) ^[8].

в. Хемокин *CXCL13*

CXCL13 је први пут описан од стране Леглера (*Legler*) и сарадника 1998. године. Хемокин лиганд 13, такође назван и Б-ћелија привлачећи хемокин 1 или Б лимфоцитни хемоатрактант, је члан *CXC* фамилије хемокина кодиран са *CXCL13* геном локализованом на хромозому 4 (*4 q21*). *CXCL13* код људи се углавном ствара од стране дендритичких ћелија, моноцита, зрелих макрофага. Након везивања за *G*-протеин рецептора *CXCR5* на неутрофилима и маст ћелијама, *CXCL13* утиче на хемотаксу и миграцију Б лимфоцита од лимфоидног ткива до мјеста инфламације ^[26]. *CXCL13* се ослобађа од стране моноцита централног нервног система као одговор на борелија спољашњи површински протеин, стимулишући регрутовање Б ћелија у централни нервни систем ^[27]. Б ћелије су извор продукције антитијела и могу мигрирати у централни нервни систем и прије него се покрене продукција интратекалних антитијела ^[28].

Од 2005.године, различите студије су сугерисале да је детекција *CXCL13* у ЦСТ користан маркер у дијагностици ране лајмске неуроборелиозе, чак и прије специфичног одговора антители, иако се повишене вриједности *CXCL13* у ЦСТ налазе и код пацијената са другим бактеријским и вирусним инфекцијама централног нервног система, аутоимуним болестима и малигнитетима везаним за бијеле крвне ћелије [4,8,27,29-35]. Повишене вриједности *CXCL13* у ЦСТ су пронађене и код пацијената са мултиплом склерозом (у активним демиелинизационим лезијама, не у инактивним), ХИВ инфекцијом, неуросифилисом, туберкулозним менингитисом, у раном стадијуму *anti-NMDAR* енцефалитиса и ЦНС лимфомом као и код пацијената са асептичним менингитисом [4,8]. Одређивање *CXCL13* се не ради рутински и тек треба да буде стандардизовано [8,36]. Сматра се да доприноси дијагностици лајмске борелиозе, да може бити од помоћи у нејасним случајевима веома ране лајмске неуроборелиозе али да није довољно специфичан да разликује лајмску неуроборелиозу од других инфекција централног нервног система а ниво може брзо пасти након антибиотске терапије, много прије повлачења плеоцитозе што означава да би овај хемокин могао бити маркер активности болести и ефикасности антибиотика [4,8,28,30,31,34,36]. *CXCL13* се може детектовати и у другим манифестацијама лајмске борелиозе: пацијенти са борелијским лимфоцитомом такође имају у серуму високе нивое *CXCL13*. У неким другим неуролошким манифестацијама лајмске борелиозе *CXCL13* тест је негативан. Лајмску енцефалопатију, коју је тешко детектовати, карактеришу неспецифичне неуробихејвиоралне манифестације али нивои *CXCL13* у ЦСТ нису повишени [4].

1.4.2 Директне дијагностичке методе

а. Реакција ланчаног умножавања (*PCR*)

Детекција ДНК борелије се не ради рутински [36]. У изузетним случајевима (имунокомпромитовани пацијенти) инфекција борелијом може бити поткријепљена откривањем патогена у цереброспиналној течности. За акутну лајмску неуроборелиозу сензитивност детекције патогена у цереброспиналној течности културом или *PCR* тестом је само 10%–30% [8,11,16]. Очекује се да детекција патогена има већу сензитивност када је краће трајање болести (када пацијенти још увијек могу бити серонегативни) него у

пролонгираним случајевима ^[8,11]. Детекција патогена у крви се не препоручује јер је још мање сензитивна. Резултат *PCR* теста се мора тумачити у складу са симптомима и резултатима серологије. Позитиван резултат *PCR* теста за пацијенте са пролонгираном болести и негативном серологијом је веома вјероватно лажно позитиван ^[8]. Директна детекција *Borrelia burgdorferi sensu lato* ДНК *PCR* методом је кориснија у дијагностици лајмске борелиозе из узорака кожных промјена и синовијалне течности ^[11,20]. Сензитивност *PCR* теста на борелију је 65%-90% из узорака биопсије коже код *erythema migrans* и *ACA*, 50%-85% из синовијалне течности зглобова, а 10%-30% из цереброспиналне течности ^[20,36-38]. Специфичност теста треба да буде близу 100%, што није увијек случај у зависности од произвођача, тест није стандардизован ^[20]. Позитиван *PCR* резултат за борелију не утврђује активну инфекцију ^[20], ДНК борелије може да опстане након убијања спирохета ^[6]. Тест је бесмислен код пацијената који имају неуролошке манифестације дуже од шест недеља (слаба осетљивост) ^[20].

б. Култура цереброспиналне течности

Култура је референтна биолошка дијагностичка метода, са 100% специфичности, али са ограниченом сензитивности због малог броја бактерија на мјестима узорковања ^[6,20]. Изолација бактерије указује на активну лајмску борелиозу ^[20]. Култура се изводи у специјализованим лабораторијама ^[6,20], подлога за културу је специфична, под називом Барбур-Стоенер-Кели (*Barbour-Stoenner-Kelly – BSK*), обогаћена и лако може бити контаминирана комензалним бактеријама ^[20]. Култура захтијева вријеме (обично двије до осам недеља) ^[19,20]. Спирохете се не могу открити бојењем по Граму при директном микроскопском прегледу. Потребан је микроскоп тамног поља или фазно-контрастни микроскоп или треба користити директну имунофлуоресценцију (умјерена сензитивност и специфичност). Званична идентификација бактерије се затим врши молекуларном биологијом. Микроскопија се може користити за тумачење резултата културе, али се директна микроскопија на узорцима не препоручује због недостатка специфичности. Хистологија је корисна за дијагнозу *ACA* и за диференцијалну дијагнозу, али резултат не указује на активну лајмску борелиозу ^[20]. Штавише, осим за пацијенте са *ACA*, позитивне културе су добијене само током првих недеља инфекције, првенствено из узорака биопсије коже лезија *erythema migrans* ^[6].

1.5 Дијагностички критеријуми за лајмску неуроборелиозу

У зависности од констелације клиничких налаза и лабораторијских резултата, дијагноза лајмске неуроборелиозе се може класификовати као могућа, вјероватна и дефинитивна [8,16].

Могућа ЛНБ

- Типична клиничка слика
- *Borrelia*-специфична *IgG* и/или *IgM* антителија у серуму (серологија може бити негативна у веома раној фази болести)
- Анализа ЦСТ није рађена/ није рађена лумбална пункција
- Искључивање других могућих узрока

Вјероватна ЛНБ

- Као за “могућу”, уз инфламаторне промјене у ЦСТ са лимфоцитном плеоцитозом, поремећајем крвно-мождане баријере и интратекална продукција имуноглобулина

Дефинитивна ЛНБ

- Као за “вјероватну ЛНБ”, уз интратекалну синтезу борелија специфичних антителија (позитиван *IgG* и/или *IgM* индекс антителија) у ЦСТ или позитивна култура или *PCR* у ЦСТ [8,16].

За ране дисеминоване манифестације са неуролошким симптомима у року од шест недјеља након убода крпеља (рана лајмска неуроборелиоза) серолошки тест крви може бити негативан и дијагноза треба да се заснива на резултатима анализе ЦСТ [20]. У ЦСТ лимфоцитна плеоцитоза, поремећај крвно-мождане баријере и интратекална синтеза имуноглобулина се може очекивати код сваке лајмске неуроборелиозе. Могући изузеци су веома рани стадијум болести или дистална симетрична полинеуропатија [8,16]. Просјечан број ћелијских елемената је између 170 и 220/ μl до 1100 ћелија/ μl [8].

Код пацијената са типичном амиотрофичном латералном склерозом, релапсно-ремитентном мултиплом склерозом, Паркинсоновом болешћу, деменцијом или когнитивним поремећајима, не препоручује се рутинско тестирање на лајмску борелиозу [39].

1.6 Неурорадиолошки налази код обољелих од лајмске неуроборелиозе

Налаз компјутеризоване томографије (КТ) код пацијената код којих је дошло до захваћености нервног система лајмском борелиозом обично је нормалан ^[9]. Због своје сензитивности и специфичности, магнетна резонанца (МР) се може сматрати бољом у погледу визуализације лезија у току лајмске неуроборелиозе и у првих неколико недјеља могу се видјети хиперинтензне лезије на МР прегледу, а на позитронској емисионој томографији (ПЕТ) може бити идентификован благи до умјерен хипометаболизам ^[2]. Неурорадиолошка дијагностика не може искључити лајмску неуроборелиозу или замијенити лумбалну пункцију ^[40], а ниједна радиолошка лезија не указује са сигурношћу на лајмску борелиозу ^[20]. Нема контролисаних студија за дијагностички значај МР у дијагностици лајмске неуроборелиозе. У већини случајева ране лајмске неуроборелиозе не очекују се значајне промјене због ријетке захваћености мозга и кичмене мождине, а МР се примарно користи у диференцијалној дијагнози ^[8].

2. РАДНА ХИПОТЕЗА

1. Изостанак плеоцитозе у цереброспиналној течности није параметар који искључује лајмску неуроборелиозу.
2. Иако веома значајна, двостепена серолошка дијагностика (*ELISA*, *Immunoblot*) није увијек поуздана у дефинитивној дијагнози лајмске неуроборелиозе.
3. Хемокин *CXCL13* у цереброспиналној течности је значајан маркер ране лајмске неуроборелиозе који такође треба тумачити са опрезом и у корелацији са другим методама у дијагностици лајмске неуроборелиозе.
4. Цереброспинална течност је добар биолошки материјал за детекцију *Borrelia burgdorferi* *Real-time PCR* методом у току ране дисеминоване инфекције, док је у току касне перзистентне инфекције осјетљивост ове методе значајно мања.

3. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

1. Утврдити карактеристике у клиничкој слици и стандардним хематолошким (комплетна крвна слика - еритроцити, хемоглобин, хематокрит, тромбоцити, леукоцити са формулом: неутрофили, еозинофили, базофили, моноцити, лимфоцити) и биохемијским параметрима крви (гликемија, аспартат аминотрансфераза, аланин аминотрансфераза, С-реактивни протеин) као и параметрима цитохемијске анализе цереброспиналне течности (број ћелија уз однос мононуклеара и полиморфонуклеара, протеинорахија, гликорахија) код испитаника са сумњом на лајмску неуроборелиозу.
2. Анализирати резултате тестова двостепене серолошке дијагностике лајмске борелиозе (*ELISA anti-Borrelia IgM* и *IgG* и потврдног *Immunoblot anti-Borrelia* теста *IgM* и *IgG*) код испитаника са сумњом на лајмску неуроборелиозу.
3. Одредити *ELISA* концентрацију хемокина *CXCL13* у цереброспиналној течности код испитаника са сумњом на лајмску неуроборелиозу и његов значај у дијагностици лајмске неуроборелиозе.
4. Испитати осјетљивост *Real-time* реакције ланчаног умножавања (*Polymerase chain reaction-PCR*) у цереброспиналној течности код испитаника са сумњом на лајмску неуроборелиозу и њен значај у дијагностици лајмске неуроборелиозе.

4. ИСПИТАНИЦИ И МЕТОДЕ РАДА

Сprovedено истраживање је урађено као проспективна дијагностичка студија у Универзитетском клиничком центру Републике Српске (УКЦ РС) у периоду од октобра 2017. до октобра 2021. године.

Пристанак на учествовање у истраживању је био на добровољној основи. Етички одбор УКЦ РС је дао сагласност за истраживање.

4.1 Одабир испитаника

Испитивану групу чине пацијенти који су хоспитализовани и лијечени у УКЦ РС због сумње на лајмску неуроборелиозу.

За учествовање у истраживању кориштени су критеријуми за укључивање и критеријуми за искључивање из истраживања.

Критеријуми за укључивање у истраживање:

- присуство неуролошких симптома који би могли одговарати клиничкој слици лајмске неуроборелиозе
- урађена лумбална пункција и цитохемијска анализа цереброспиналне течности (укупан број ћелија уз однос мононуклеара и полиморфонуклеара, протеинорахија, гликорахија)
- урађени потребни дијагностички тестови (стандардни: *ELISA anti-Borrelia IgM* и *IgG* у серуму и цереброспиналној течности, потврдни *Immunoblot* тест *anti-Borrelia IgM* и *IgG* у серуму као и додатни: одређивање концентрације хемокина *CXCL13* и *Real-time PCR* у цереброспиналној течности)
- доступна комплетна остала медицинска документација: анамнестички подаци (пол, животна доб, занимање, подаци о претходном убоду крпеља или постојању *erythema migrans*, неуролошки и остали симптоми које је испитаник навео

приликом пријема у болницу, коморбидитети, трајање симптома до пријема у болницу, претходна терапија антибиотцима за лајмску борелиозу, клинички одговор на антибиотску терапију у току хоспитализације), урађени стандардни хематолошки (комплетна крвна слика – еритроцити, хемоглобин, хематокрит, тромбоцити, леукоцити са леукоцитарном формулом: неутрофили, еозинофили, базофили, моноцити, лимфоцити) и биохемијских параметари крви (гликемија, аспартат аминотрансфераза, аланин аминотрансфераза, С- реактивни протеин).

Критеријуми за искључивање из истраживања:

- примјена антибиотске терапије за лајмску борелиозу прије лумбалне пункције
- изостанак повољног клиничког одговора на примијењену антибиотску терапију за лајмску неуроборелиозу у току хоспитализације
- постављена дијагноза другог неуролошког обољења.
- повлачење пацијента из истраживања.

Иницијално су анализирани подаци 141 пацијента који су у периоду спровођења студије били хоспитализовани у УКЦ РС због неуроинфекције и код којих се у оквиру диференцијалне дијагностике размишљало и о лајмској неуроборелиози. Од 141 пацијента, њих 51 је испуњавало услове за учествовање у нашем истраживању. Преосталих 90 пацијената је искључено из истраживања из разлога што цереброспинална течност није анализирана због контраиндикације за лумбалну пункцију, пацијент је користио антибиотску терапију за лајмску борелиозу прије лумбалне пункције, изостао је повољан клинички одговор на примијењену антибиотску терапију за лајмску неуроборелиозу или је постављена дијагноза другог неуролошког обољења.

4.2 Анализирани подаци

Код наведених испитаника анализирани су:

- основни анамнестички подаци (пол, животна доб, занимање, подаци о претходном убуду крпеља и постојању *erythema migrans*, неуролошки и остали симптоми које је испитаник навео приликом пријема у болницу, коморбидитети, трајање симптома

до пријема у болницу, претходна терапија антибиотцима за лајмску борелиозу, одговор на антибиотску терапију за лајмску неуроборелиозу у току хоспитализације)

- стандардни хематолошки (комплетна крвна слика – еритроцити; хемоглобин; хематокрит; тромбоцити; леукоцити са леукоцитарном формулом: неутрофили, еозинофили, базофили, моноцити, лимфоцити) и биохемијски параметри крви (гликемија, аспартат аминотрансфераза, аланин аминотрансфераза, С-реактивни протеин) као и параметри цито-хемијске анализе цереброспиналне течности (укупан број ћелија уз однос мононуклеара и полиморфонуклеара; протеинорахија; гликорахија) који су урађени у Заводу за клиничку лабораторијску дијагностику УКЦ РС (табела 3.)
- тестови двостепене серолошке дијагностике лајмске борелиозе у серуму (*ELISA anti-Borrelia IgM* и *IgG* и потврдни *Immunoblot* тест *anti-Borrelia IgM* и *IgG*) као и *ELISA anti-Borrelia IgM* и *IgG* у цереброспиналној течности (Завод за микробиологију УКЦ РС)
- концентрација хемокина *CXCL13* у цереброспиналној течности (Завод за микробиологију УКЦ РС)
- Реакција ланчаног умножавања у реалном времену (*Real-time Polymerase chain reaction – RT PCR*) у цереброспиналној течности (Ветеринарски институт Републике Српске „др Васо Бутозан“)
- налази МР ендокранијума урађени у Заводу за клиничку радиологију УКЦ РС.

Табела 3. Референтне вриједности хематолошко-биохемијских параметара крви

Параметри крви	Референтне вриједности
еритроцити	3.86-5.08 x 10 ¹²
хемоглобин	119-157 g/L
хематокрит	0.36 - 0.47 l/l
тромбоцити	158-424 x 10 ⁹ /l
леукоцити	3.4 – 9.7 x10 ⁹ /l
неутрофили	44.0-72.0%
еозинофили	0.0-7.0%
базофили	0.0-1.0%
моноцити	2.0-12.0%
лимфоцити	20.0-46.0%
гликемија	4.1-5.9 mmol/l
аспартат аминотрансфераза	0-35 U/L
аланин аминотрансфераза	0-35 U/L
C-реактивни протеин (CRP)	0-5 mg/L

4.3 Серолошка анализа крви и цито-хемијска, серолошка и молекуларна анализа цереброспиналне течности

Свим испитаницима су, одмах по пријему у УКЦ РС, на одјелима узимани и узорци крви и цереброспиналне течности за потребе цито-хемијске анализе цереброспиналне течности и микробиолошког испитивања крви и цереброспиналне течности, уз поштовање принципа асепсе и добре клиничке и лабораторијске праксе.

Крв за серолошку дијагностику је извађена венепункцијом у епрувете без антикоагуланса и транспортована на собној температури у Завод за микробиологију УКЦ РС. У Заводу за микробиологију УКЦ РС су узорци крви центрифугирани пет минута на 1600 обртаја (*rpm*) те након одвајања серума аликвотирани у *SARSTEDT* микро тубе са навојним затварачем од 1.5ml и похрањивани на -20°C.

Цереброспинална течност је узимана лумбалном пункцијом по два милилитра у стерилне епрувете и хитно на собној температури један милилитар транспортован у Завод за клиничку лабораторијску дијагностику УКЦ РС за цито-хемијску анализу и један милилитар у Завод за микробиологију УКЦ РС за серолошку дијагностику.

4.3.1 Цито-хемијска анализа цереброспиналне течности

У Заводу за клиничку лабораторијску дијагностику УКЦ РС је за сваки узорак, одмах по достављању материјала, урађена цито-хемијска анализа цереброспиналне течности: број ћелија уз однос мононуклеара и полиморфонуклеара, протеинорахија, гликорахија.

Нормалан број ћелија у цереброспиналној течности је $\leq 5 \text{ mm}^3$, референтна вриједност протеинорахије 0,15-0,45g/L, а гликорахије 1/2 до 2/3 од вриједности гликемије.

За потребе овог истраживања резултати су интерпретирани у складу са вриједностима наведених претрага (Табела 4).

Табела 4. Референтне вриједности параметара цито-хемијске анализе ЦСТ

Цитохемијска анализа ЦСТ	Вриједности
Број ћелија у ЦСТ	
Нормалан	$\leq 5 \text{ mm}^3$
Блага плеоцитоза	5-100mm ³
Умјерена плеоцитоза	100-1000mm ³
Изразита плеоцитоза	>1000mm ³
Протеинорахија	
Референтна вриједност	<0,45 g/L
Повишена вриједност	>0,45 g/L
Гликорахија (mmol/l)	
Референтна вриједност	1/2 до 2/3 вриједности гликемије
Снижена вриједност	мања од 1/2 вриједности гликемије

У Завод за микробиологију УКЦ РС се достављао други узети милилитар узорака наведене цереброспиналне течности који су, због сакупљања узорака, замрзнути на 20°C.

4.3.2 Серолошка анализа крви и цереброспиналне течности

Узорци крви и цереброспиналне течности за серолошку дијагностику су узимани истовремено и из њих је у наредном периоду урађена стандардна и додатна дијагностика:

- *Anti-Borrelia ELISA gM* и *Anti-Borrelia VlsE ELISA IgG* у серуму и *ELISA Anti-Borelia IgM* и *IgG* у цереброспиналној течности (*EUROIMMUN Analyzer I-2*, *EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostik AG Lubeck, Germany*) (слика 3.). Резултати су интерпретирани према препорукама произвођача да се концентрација *IgM* и *IgG* антитијела у серуму (уз истовремено одређивање у цереброспиналној течности) изнад 5 RU/ml (релативних јединица по милилитру) сматра позитивном, а концентрација испод 5 RU/ml негативном.



Слика 3: *EUROIMMUN Analyzer I-2*

- *Anti-Borrelia EUROLINE RN-AT- adv IgM* и *Anti-Borrelia EUROLINE RN-AT IgG* су урађени као потврдни *EUROLINE Immunoblot* тестови у серуму за све испитанике којима су наведени *ELISA* тестови у серуму и/или цереброспиналној течности били позитивни или неодређени у *IgM* и/или *IgG* класи (*EUROIMMUN EUROLINE BLOT*, *EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostik AG Lubeck, Germany*).

- *ELISA* концентрација хемокина *CXCL13* у цереброспиналној течности *Euroimmun* тестом *CXCL13 ELISA (EUROIMMUN Analyzer I-2, EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostik AG Lubeck, Germany)*. Према упутама произвођача нормалне вриједности концентрације хемокина *CXCL13* у цереброспиналној течности су <20pg/ml, граничне вриједности од ≥ 20 до <30pg/ml, повишене од ≥ 30 до <100pg/ml а изразито повишене >100pg/ml.

Сви тестови су урађени према упутствима наведених произвођача и уз поштовање стандардних оперативних процедура рада у микробиолошкој лабораторији.

4.3.3 Молекуларна анализа цереброспиналне течности

Молекуларне анализе су урађене у Ветеринарском институту Републике Српске „др Васо Бутозан“ и обухватиле су:

- а. изолацију ДНК из цереброспиналне течности испитаника,
- б. *RT PCR* детекцију ДНК *Borrelia burgdorferi sensu lato (B. afzelii, B. garinii, B. burgdorferi sensu stricto)*.

4.3.3.1 Изолација ДНК из цереброспиналне течности

За изолацију ДНК из ЦСТ испитаника кориштен је кит *RealBest extraction 100 (AO Vector-Best, Новосибирск, Русија)*, према упутама произвођача.

- Први корак у изолацији ДНК из ЦСТ је била припрема реагенса за лизу који је загријан на температури 50-60°C у циљу отапања присутног талога.
- Након отапања талога туба са реагенсом за лизу је вортексована.
- Сљедећи корак је било додавање 80µl суспензије са магнетним честицама (*Sorbent*) у бочицу са реагенсом за лизу, након чега је добијена смјеса промијешана на вортексу.
- Потом је припремљен узорак интерне контроле на начин да је у бочицу са интерном контролом додано 1ml раствора за опоравак (*Recovery Solution for Control samples*).

- Након овог корака, растворена интерна контрола је чувана на собној температури (18-26°C) 15 минута.

Изолација ДНК из цереброспиналне течности након припреме реагенса је урађена на следећи начин:

- У тубе за узорке и тубу за контролни узорак је додано 30µl припремљене интерне контроле. Следећи корак је био додавање по 200µl цереброспиналне течности у обиљежене тубе за узорке испитаника.
- Припремљене су негативна и позитивна контрола. У тубу за негативну контролу додано је 100µl узорка негативне контроле из кита *RealBest extraction 100 (AO Vector-Best, Novosibirsk регион, Русија)*. Потом је припремљена позитивна контрола додавањем 70µl узорка негативне контроле и 30µl позитивне контроле (компонента комплемента за *PCR* тест) у епрувету означена као позитивна контрола.
- У тубе је додано 300µl припремљеног реагенса за лизу са сорбентом након са чега су тубе вортексоване 10-15 секунди. Услиједила је инкубација у термалном шејкеру на 65 °C и 1 300 обртаја (*rpm*) у трајању од 10 минута.
- У добијени садржај додано је по 400µl раствора за преципитацију. Након вортексовања 10-15 секунди урађено је центрифугирање на 13000 обртаја (*rpm*) у трајању од 5 минута. Без мјешања пелета, тубе су стављене у магнетни сталак. Следећи корак је било уклањање супернатанта без додиривања талог на дну тубе.
- Након овог додатно је по 500µl пуфера за испирање 1 у сваку епрувету. Након мијешања на вортексу у трајању 10–15 секунди тубе су центрифугиране на 13 000 обртаја (*rpm*) у трајању од 2 минуте. Без мијешања пелета, тубе су стављене на магнетни сталак. Потом је уклоњен супернатант без додиривања пелета.
- У наредном кораку у сваку тубу је додано по 300µl пуфера за испирање 2 након чега је садржај вортексован 10-15 секунди. Тубе су потом центрифугиране на 13000 обртаја (*rpm*) у трајању од 2 минуте.
- Без мијешања пелета, тубе су стављене у магнетни сталак. Уклоњен је супернатант а потом је пелет осушен у отвореним епруветама 2-3 минуте на собној температури (18–26°C).

- У тубе са пелетом додано је по 100µl пуфера за растварање након чега су тубе протрешене у циљу да се талог ресуспендује. Услиједила је инкубација у термалном шејкеру на 65°C и 1300 обртаја (*rpm*) у трајању од 5 минута. Потом су тубе центрифугиране на 13 000 обртаја (*rpm*)/ 1 минутоу.

Добијени ДНК филтрат је употребљен за *RT PCR* исти дан након изолације нуклеинске киселине.

Изолација ДНК из биолошког материјала је урађена у ламинарној комори (слика 4.).



Слика 4. Ламинарна комора

4.3.3.2 Детекција и квантитација *Borrelia burgdorferi*

У овом истраживању је урађена детекција и квантитација *Borrelia burgdorferi* у узорцима ликвора *RT PCR* методом (*RealBest DNA Borrelia burgdorferi s.l.*, АО Vector-Best, Новосибирск, Русија).

Тест је дизајниран за детекцију *Borrelia burgdorferi sensu lato complex* (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi sensu stricto*). Кориштена је интерна контрола која је укључена у кит за процјену реакције умножавања, праћење присуства инхибитора, те за процјену ефиканости изолације нуклеинске киселине. Умножавање *Borrelia burgdorferi* и интерне контроле ћелијске ДНК је мјерена према праговном циклусу односно циклусу почетка амплификације циљне нуклеинске киселине (*Cycle Threshold-Ct*). Према упутству произвођача теста, позитиван налаз *Borrelia burgdorferi* је присутан уколико је *Ct* вриједност кроз канал *ROX Ct* ≤ 40, а за интерну контролу тест је био тумачен као позитиван уколико је *Ct* вриједност кроз канал *FAM* била већа или једнака од 40.

За амплификацију у реалном времену припремљен је мастер *PCR* микс загријавањем на собној температури (18-26°C) до 30 минута. Након тога, у тубе са мастер *PCR* миксом је сипано по 300µl раствора за опоравак (*recovery solution*). Припремљен је мастер *PCR* микс, промијешан и чуван на собној температури (18-26°C) до 15 минута. Тубе су поново вортексоване и кратко центрифугиране како би се скупиле капи које су се задржале на поклопцима тубе.

Реакциона смјеса је према упутству произвођача укупне запремине 50µl била састављена од 25µl мастер *PCR* микса и 25µl изоловане ДНК.

Умножавање у реалном времену је обухватило активацију ензима на 50°C у трајању од и 2 минуте, након чега је слиједила иницијална денатурација ДНК у времену од 2 минуте на 95°C, након чега је услиједило 50 циклуса који су обухватили два корака, први денатурације ДНК на температури од 94°C 10 секунди, те други, који је обухватио везивање прајмера и проба, као и екстензију циљне нуклеинске киселине на 60°C у времену од 20 секунди.

Амплификација у реалном времену, анализа резултата и одређивање праговог циклуса су изведени помоћу *Mx3005P* програма на апарату *Stratagene Mx3005P* (*Agilent Technologies*) (слика 5.).



Слика 5. *Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies)*

4.4 Статистичка анализа

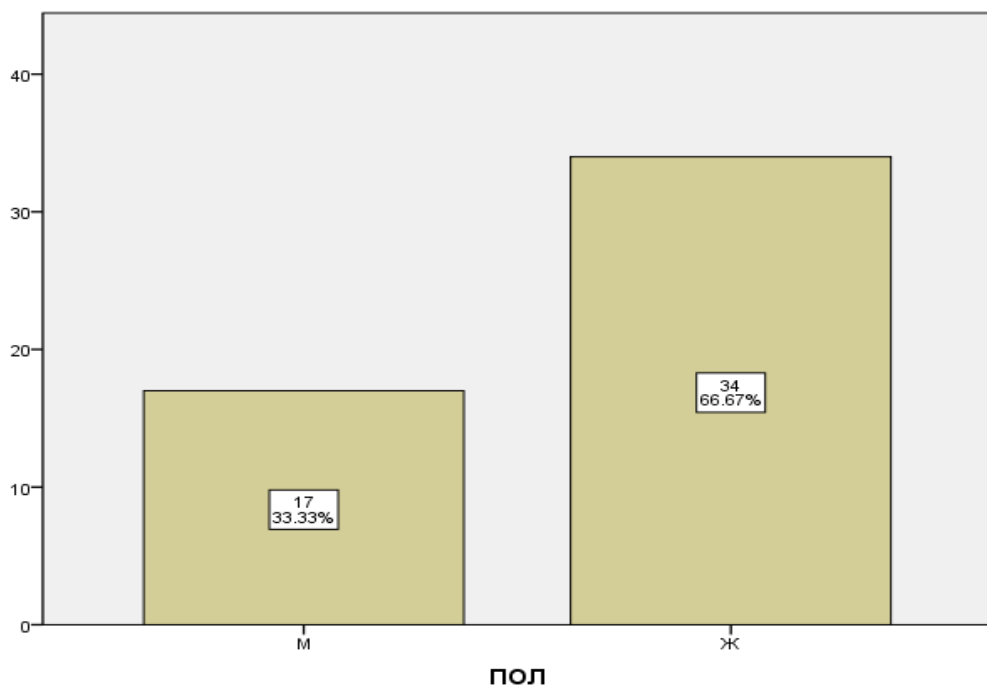
Подаци су представљени стандардним дескриптивним статистичким мјерама у складу са типом података. Анализа и поређење испитиваних група су урађени у складу са типом података. Фреквенције су поређене одговарајућим хи-квадрат тестом. Корелација резултата је утврђена коефицијентом корелације по Спирману. Повезаност резултата установљена је Дајсовим коефицијентом сличности, на основу којег је сачињен и дендрограм. Статистичка значајност испитиваних разлика је установљена за $p < 0.05$. Статистичка анализа и графичко представљање података урађену уз помоћ статистичког софтверског пакета *SPSS 22 (IBM, 2013)*.

5. РЕЗУЛТАТИ

Овом проспективном дијагностичком студијом обухваћено је 51 испитаника који су под сумњом на лајмску неуроборелиозу испитивани и лијечени у Универзитетском клиничком центру Републике Српске (УКЦ РС) у периоду од октобра 2017. године до октобра 2021. године.

5.1 Резултати епидемиолошког истраживања

Анализом пола испитаника уочава се да је њих 34 (66.67%) било женског пола, док је мушког пола било њих 17 (33.33%). Поређењем односа мушких и женских испитаника уочава се статистички значајно ($p=0.017$) већи удио испитаника женског пола у односу на испитанике мушког пола (слика 6.).



Слика 6. Полна дистрибуција испитаника

Анализом структуре испитаника по доби уочава се да је највише испитаника старости између 50 и 60 година. Испитаници преко 40 година чине преко 80% узорка, прецизније 80.4%. Млађи испитаници су знатно мање заступљени, и само један у категорији до 20 година (слика 7.).

Мушкарци

Просјек година X_{sr} – 57,59

Стандардна девијација SD – 16,07

Стандардна грешка S_x – 3,89

Коефицијент варијације V_k – 27,9

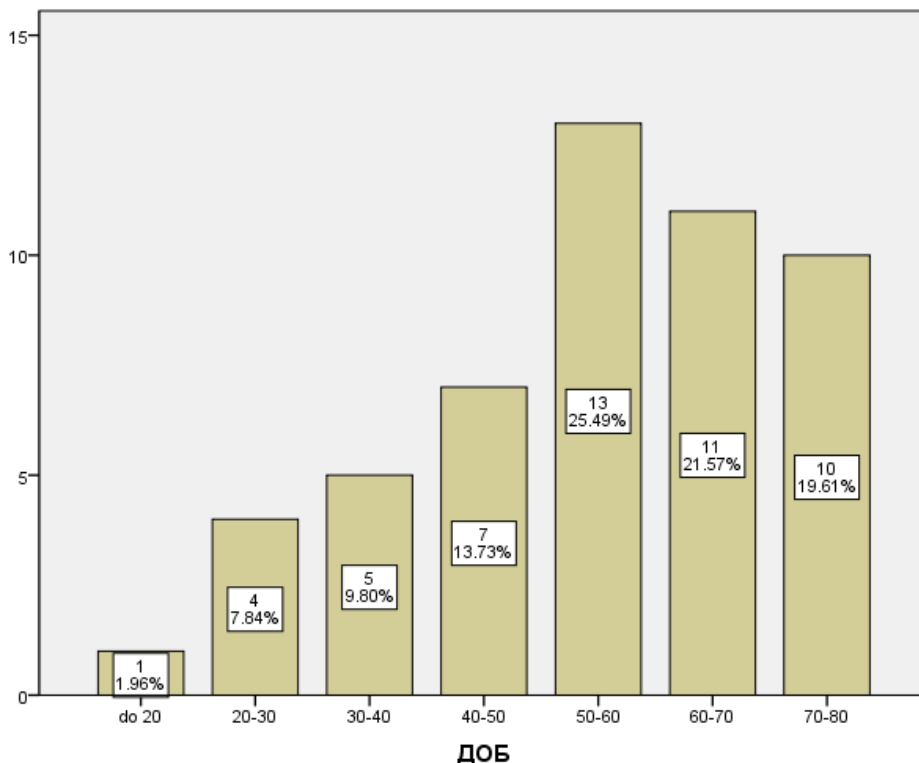
Жене

Просјек година X_{sr} – 52,32

Стандардна девијација SD – 15,4

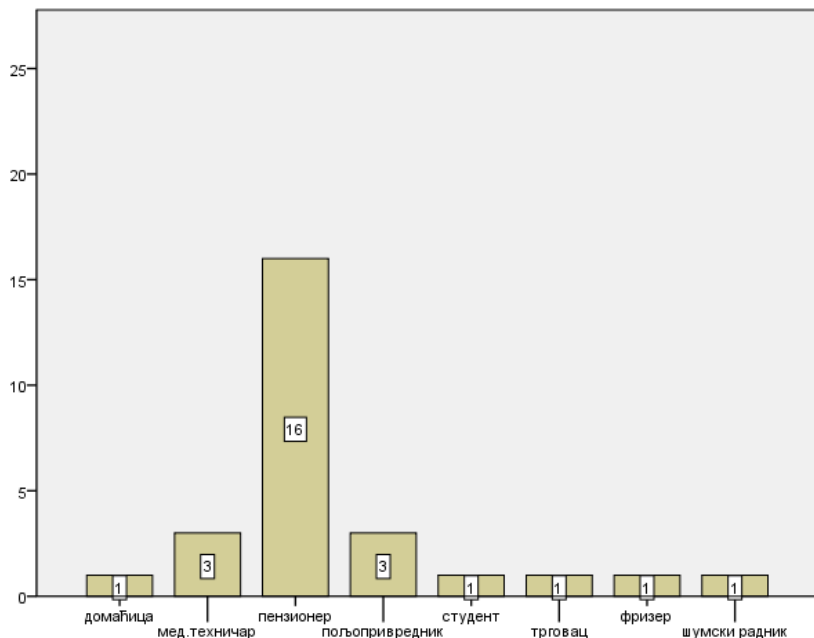
Стандардна грешка S_x – 2,64

Коефицијент варијације V_k – 29,43



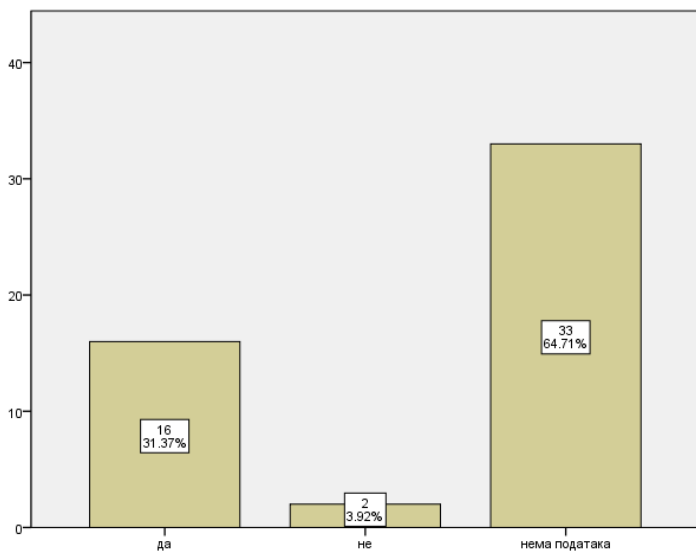
Слика 7. Старосна дистрибуција испитаника

Највише су заступљени пензионери, којих је било 16. Затим по заступљености занимања испитаника слиједу пољопривредници и медицински техничари. Остала занимања која су забиљежена су шумски радници, студенти, трговци, фризер и домаћице (слика 8.).



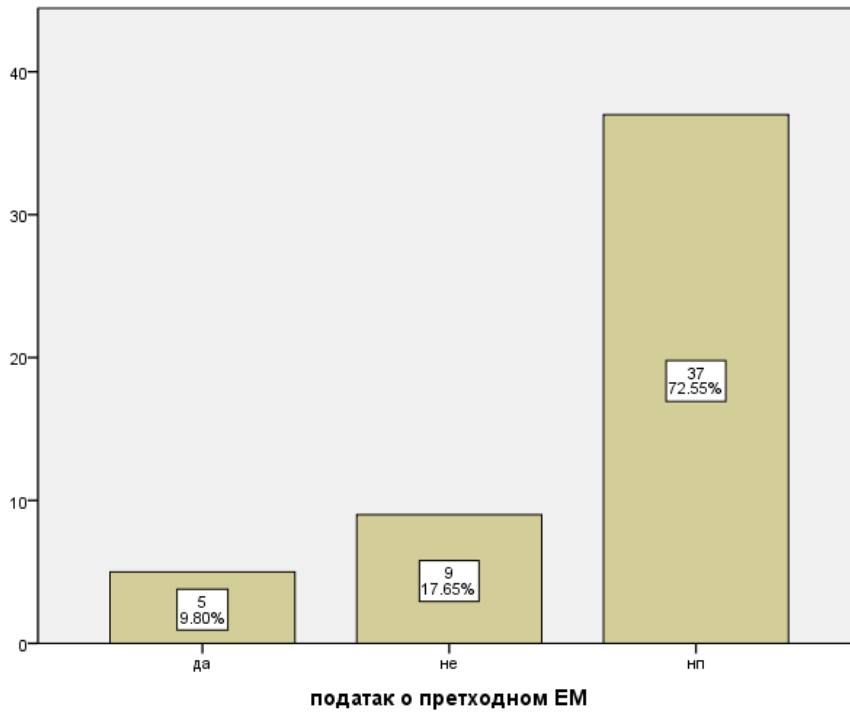
Слика 8. Занимање испитаника

За највећи број наших испитаника податак о претходном убоду крпеља није био доступан (64.71%). Само 31.37% испитаника је имало податак о претходном убоду крпеља (слика 9.).



Слика 9. Податак о претходном убоду крпеља

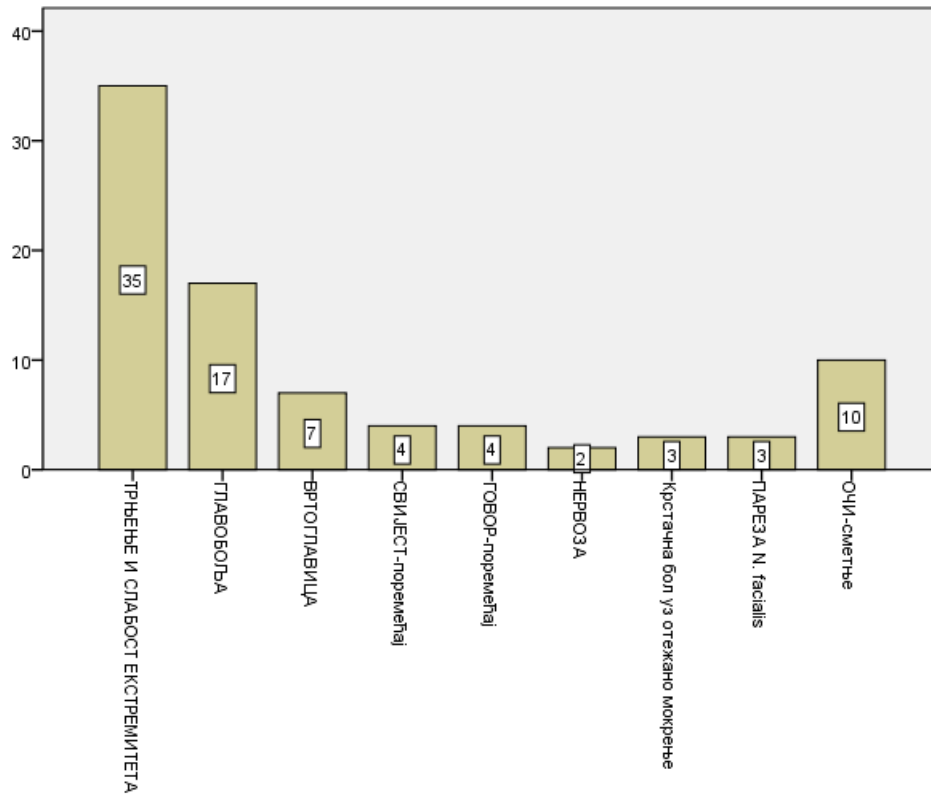
Анализом се уочава да највећи број испитаника није имао податке о претходној промјени на кожи која одговара првом стадијуму лајмске борелиозе (*erythema migrans*), њих 37 (72.55%). Само пет испитаника је имало податке о *erythema migrans* (слика 10.).



Слика 10. Податак о претходном *erythema migrans* (ЕМ)

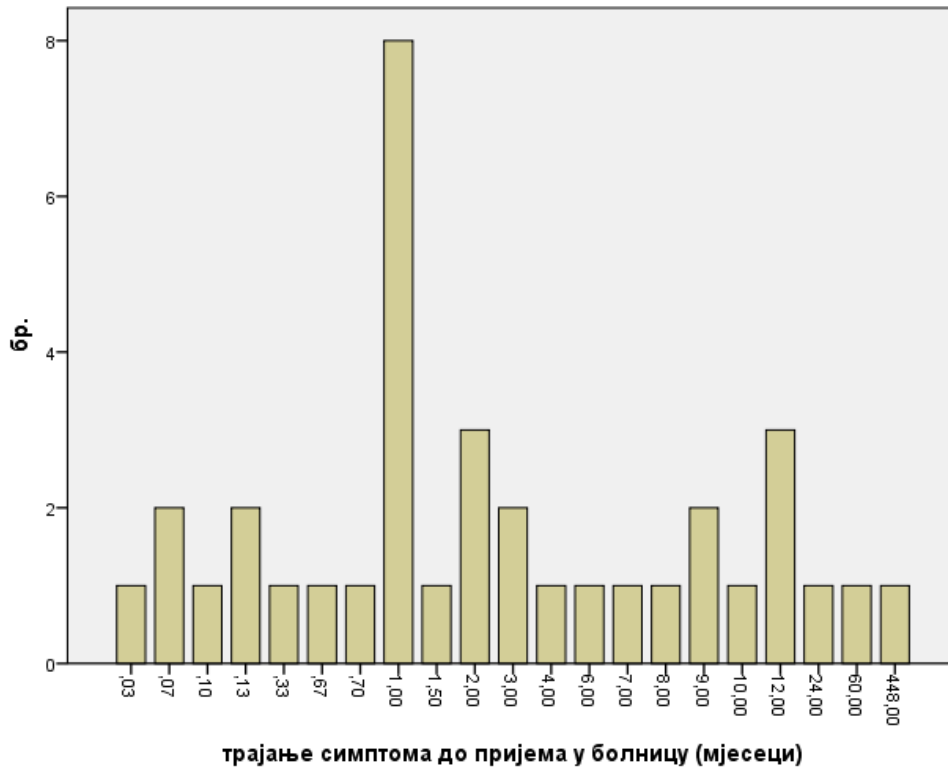
5.2 Клинички резултати

Анализом учесталости неуролошких тегоба на пријему уочава се највећи број жалби на осјећај трњења и слабост екстремитета, затим у нешто мањој мјери на главобољу, офталмолошке тегобе и вртоглавицу (слика 11.). Мање су били присутни поремећај свијести, говора, те пареза *n.facialis*, крстачна бол и нервоза.



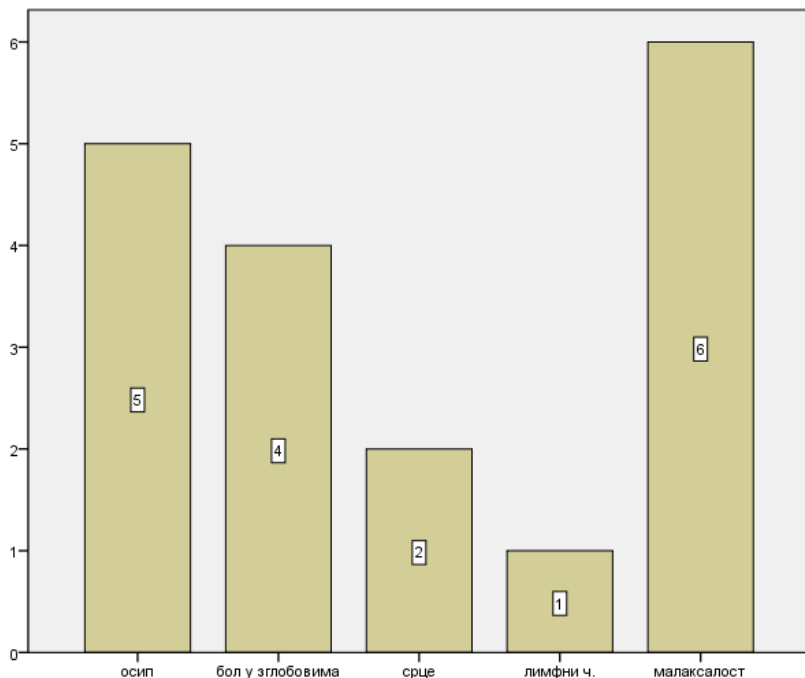
Слика 11. Неуролошке тегобе које су испитаници навели на пријему у болницу

Сагледавањем трајања симптома до пријема у болницу уочава се да је највећи број испитаника имао симптоме у трајању до три мјесеца прије него што је примљен у болницу. Убједљиво највећи број испитаника се жалио на симптоме тачно мјесец дана (слика 12.).



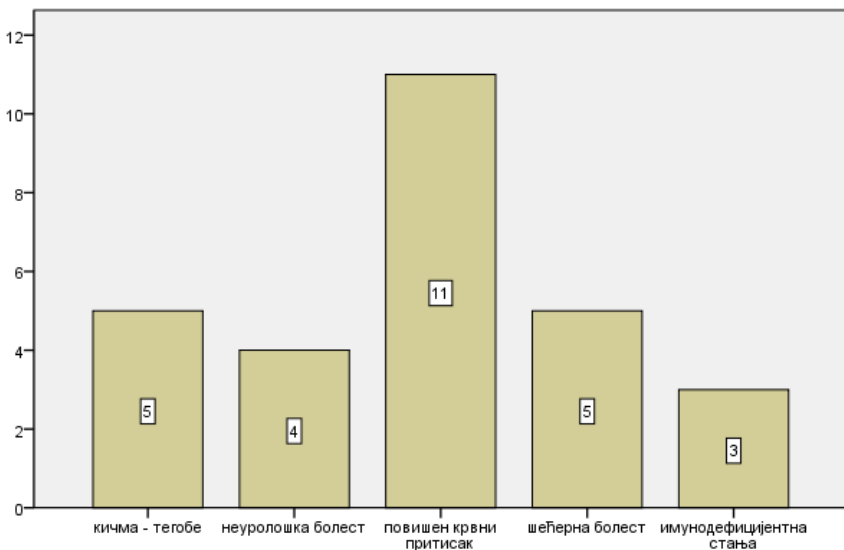
Слика 12. Трајање симптома до пријема у болницу

Од осталих тегоба испитаници су се највише жалили на малаксалост - њих шест, затим осип пет пацијената и редом на бол у зглобовима, кардиолошке тегобе и увећане лимфне чворове (слика 13.).



Слика 13. Остале тегобе које су испитаници навели на пријему у болницу

Од коморбидитета најчешће је био заступљен повишен крвни притисак и то код 11 испитаника, најмање су биле заступљене друге неуролошке болести и имунодефицијентна стања (слика 14.).



Слика 14. Најчешћи коморбидитети

5.3 Резултати добијени дијагностичким поступцима

5.3.1 Резултати хематолошко-биохемијске анализе крви

Табела 5. приказује просјечне вриједности параметара крвне слике наших испитаника и види се да су били у референтним вриједностима изузев нешто више просјечне вриједности моноцита у диференцијалној крвној слици (13.86%).

Табела 5. Подаци о крвној слици испитаника

Елементи крвне слике	Референтне вриједности	Просјечна вриједност узорка	Стандардна грешка ар. средине [%]
еритроцити	3.86 - 5.08 x10 ¹²	4.540	0.070
хемоглобин	119 - 157 g/L	131.771	2.242
хематокрит	0.36 - 0.47 l/l	0.402	0.006
леукоцити	3.4 - 9.7x10 ⁹ /l	7.560	0.411
неутрофили	44.0 - 72.0%	62.956	2.272
еозинофили	0.0 - 7.0%	4.920	2.159
базофили	0.0 - 1.0%	0.380	0.060
моноцити	2.0 - 12.0%	13.864	3.868
лимфоцити	20.0 - 46.0%)	29.855	5.322
тромбоцити	158 - 424 x10 ⁹ /l	247.272	11.527

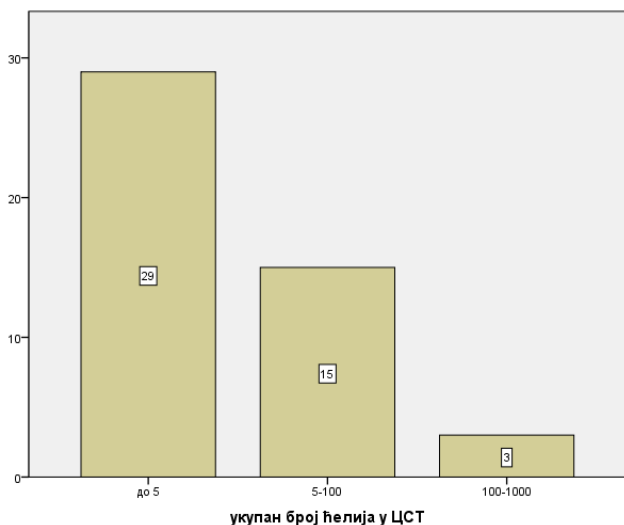
У табели 6. се види да су просјечне вриједности аспартат аминотрансферазе и аланин аминотрансферазе биле у референтним вриједностима, а гликемије (6.07mmol/l) и С-реактивног протеина (5.87mg/L) које су биле незнатно изнад горње границе.

Табела 6. Подаци о биохемијским параметрима крви

Лабораторијска карактеристика налаза	Референтне вриједности	Просјечна вриједност узорка	Стандардна грешка ар. средине [%]
ŠUK - гликемија	4.1 - 5.9 mmol/l	6.070	0.222
AST - аспартат аминотрансфераза	0 - 35 U/L	24.711	2.021
ALT - аланин аминотрансфераза	0 - 35U/L	26.632	2.636
CRP - С-реактивни протеин	0 - 5mg/L	5.869	1.659

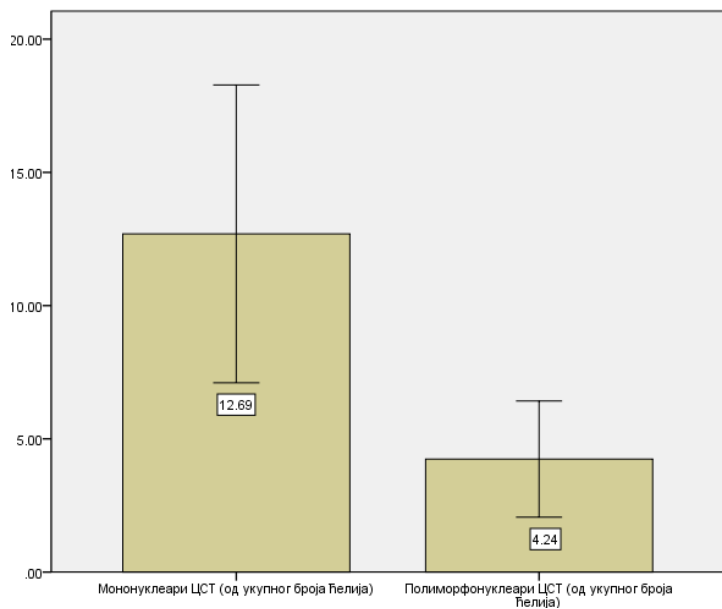
5.3.2 Резултати цито-хемијске анализе цереброспиналне течности

Слика 15. приказује да је од 51 испитаника, њих 18 (35.3%) имало плеоцитозу (повећан број ћелијских елемената у цереброспиналној течности) и то њих 15 са вриједностима укупног броја ћелијских елемената од 5 до 100, а њих три са вриједностима од 100 до 1000.



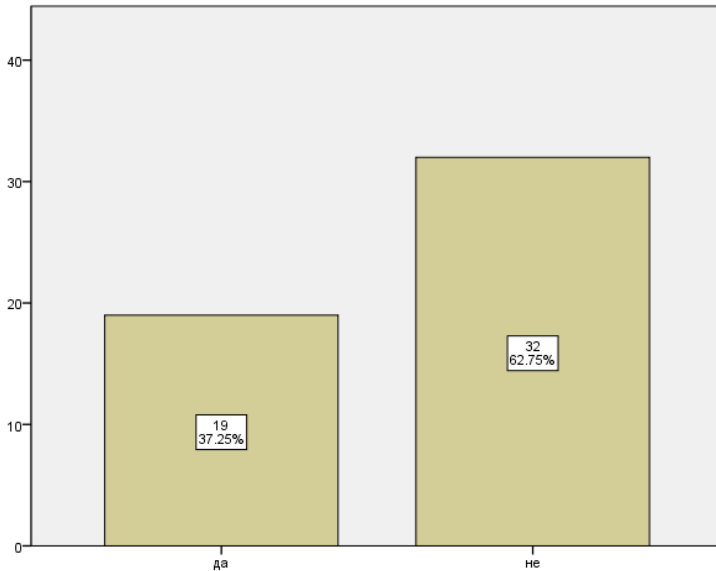
Слика 15. ЦСТ груписана према броју ћелија (<5, 5-100 и 100-1000)

Слика 16. приказује однос мононуклеара и полиморфнуклеара код испитаника са плеоцитозом у цереброспиналној течности.

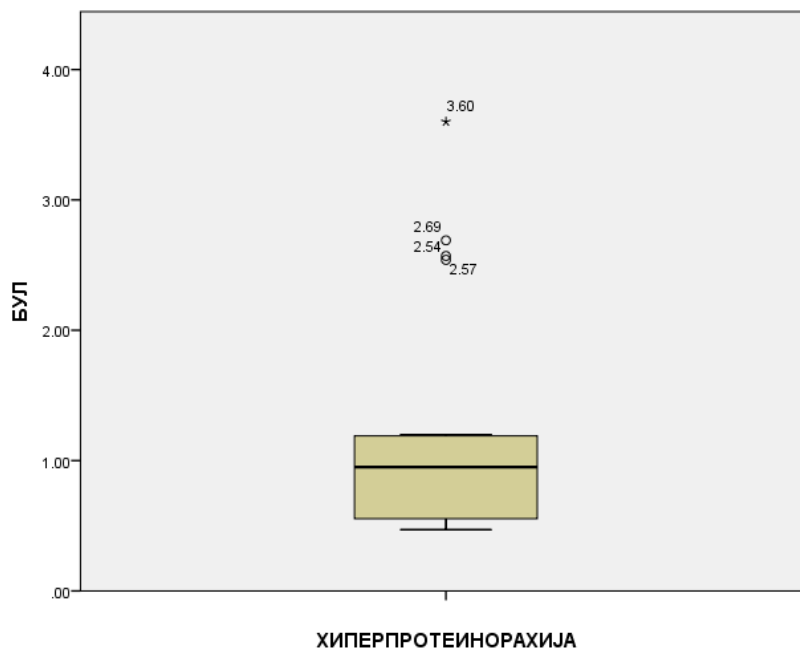


Слика 16. Однос мононуклеара и полиморфнуклеара у ЦСТ

На сликама 17. и 18. се види да је хиперпротеинорахију (повишене вриједности протеина у цереброспиналној течности) имало 19 (37.25%) наших испитаника те да је распон повишених вриједности био од 0.48 до 3.6 g/L.

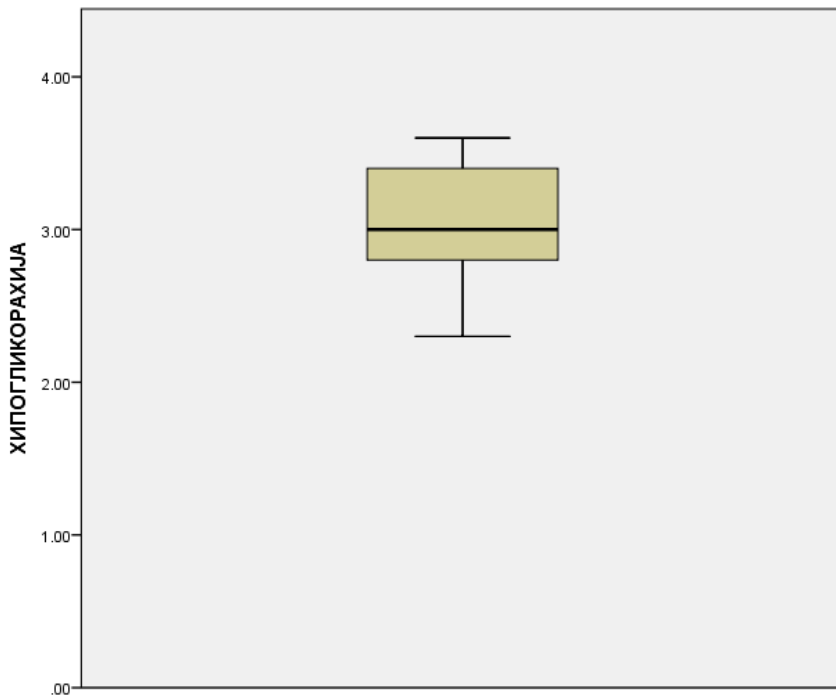


Слика 17. Повишене вриједности протеина у ЦСТ (g/L)



Слика 18. Распон повишених вриједности протеина у ЦСТ (g/L)

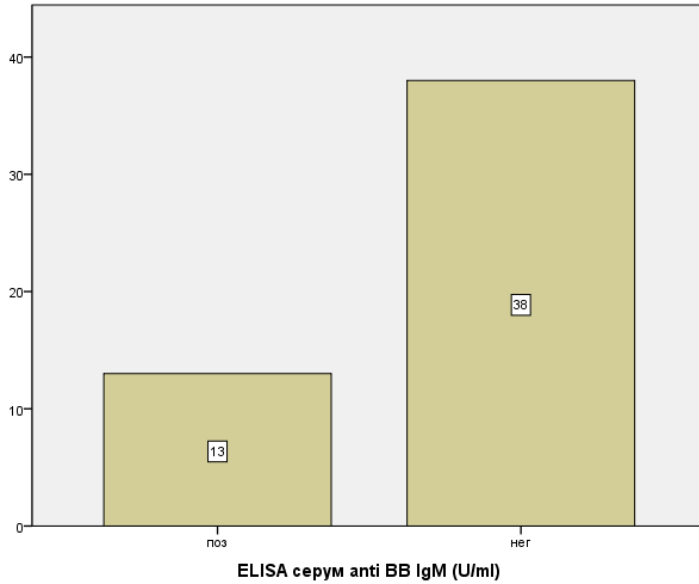
Девет испитаника је имало незнатно снижене вриједности гликорахије (у односу на гликемију) (слика 19.).



Слика 19. Распон гликорахије код испитаника са снижени вриједностима (у односу на гликемију)

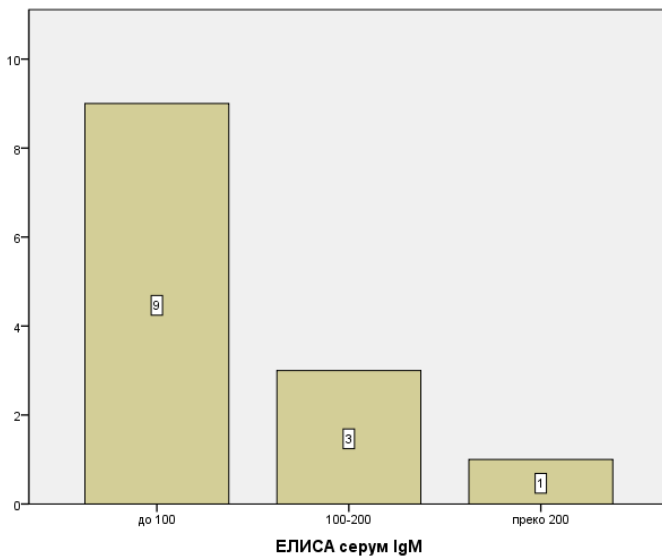
5.3.3 Резултати директних дијагностичких метода (серолошка дијагностика)

Од 51 нашег испитаника њих 13 (25.5%) је имало *ELISA* тестом у серуму позитивна *anti Borrelia burgdorferi IgM* антителијела (слика 20).



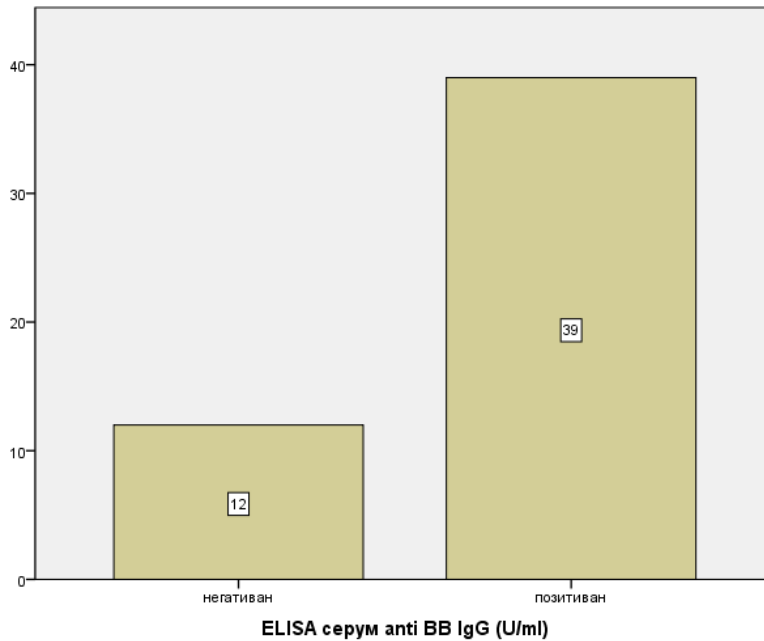
Слика 20. *ELISA* серум *anti Borrelia burgdorferi (BB) IgM (U/ml)*

На слици 21.су приказане висине титра *anti Borrelia burgdorferi IgM* антителијела у серуму за 13 наших испитаника који су *ELISA* тестом у серуму имали позитивна *anti Borrelia burgdorferi IgM* антителијела.



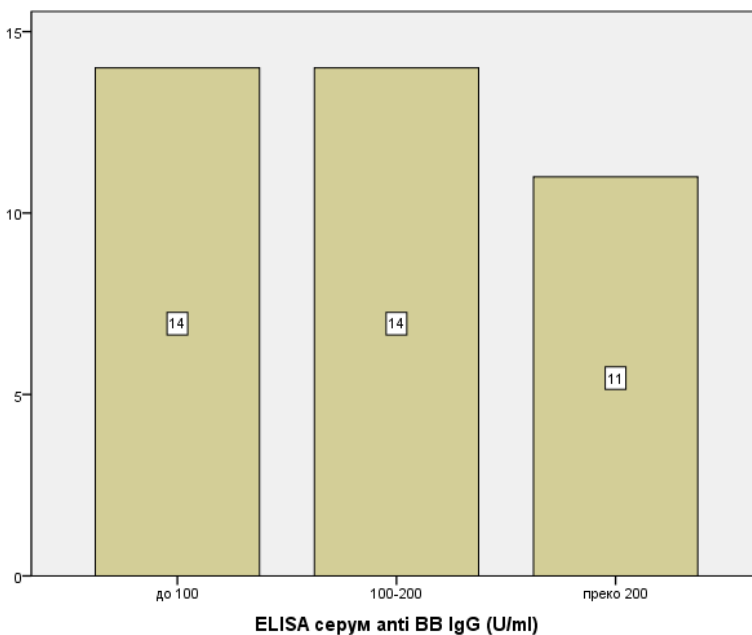
Слика 21. *ELISA* серум *anti Borrelia burgdorferi (BB) IgM (U/ml)* позитивне вриједности груписане према висини титра

Код 39 испитаника (76.47%) су у серуму била позитивна *anti Borrelia burgdorferi IgG* антителијела *ELISA* тестом (слика 22.).



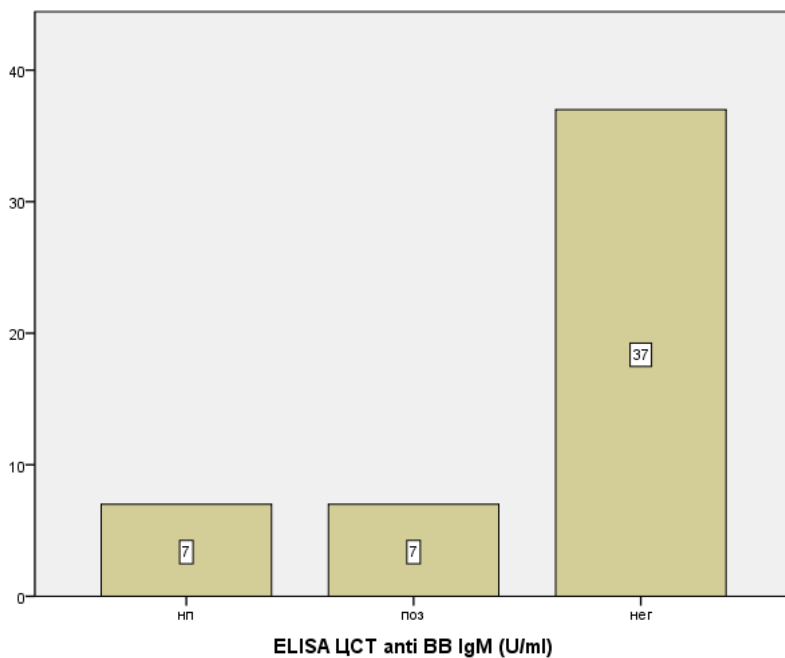
Слика 22. *ELISA* серум *anti Borrelia burgdorferi (BB) IgG (U/ml)*

Слика 23. приказује висине титра *anti Borrelia burgdorferi IgG* антителијела у серуму за 39 наших испитаника који су *ELISA* тестом у серуму имали позитивна *anti Borrelia burgdorferi IgG* антителијела.



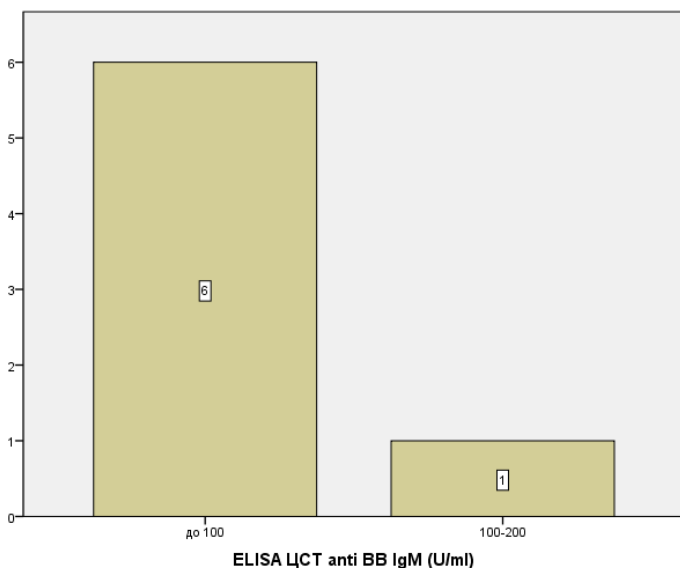
Слика 23. *ELISA* серум *anti Borrelia burgdorferi (BB) IgG (U/ml)* позитивне вриједности груписане према висини титра

Anti Borrelia burgdorferi IgM ELISA тестом у цереброспиналној течност је био позитиван код седам наших испитаника (13.7%) што је приказано на слици 24.



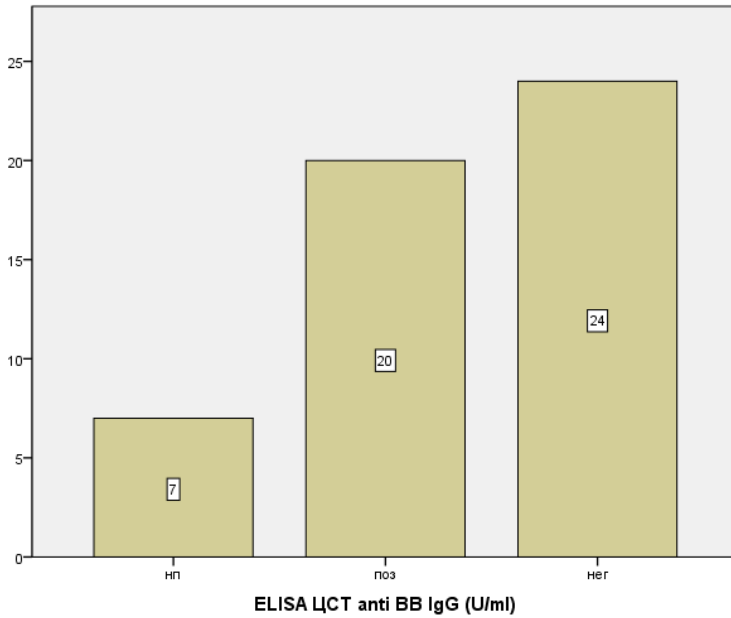
Слика 24. *ELISA ЦСТ anti Borrelia burgdorferi (BB) IgM (U/ml)*

Слика 25. приказује висине титра *anti Borrelia burgdorferi IgM* антителијела у цереброспиналној течности за седам наших испитаника који су *ELISA* тестом у цереброспиналној течности имали позитивна *anti Borrelia burgdorferi IgM* антителијела.



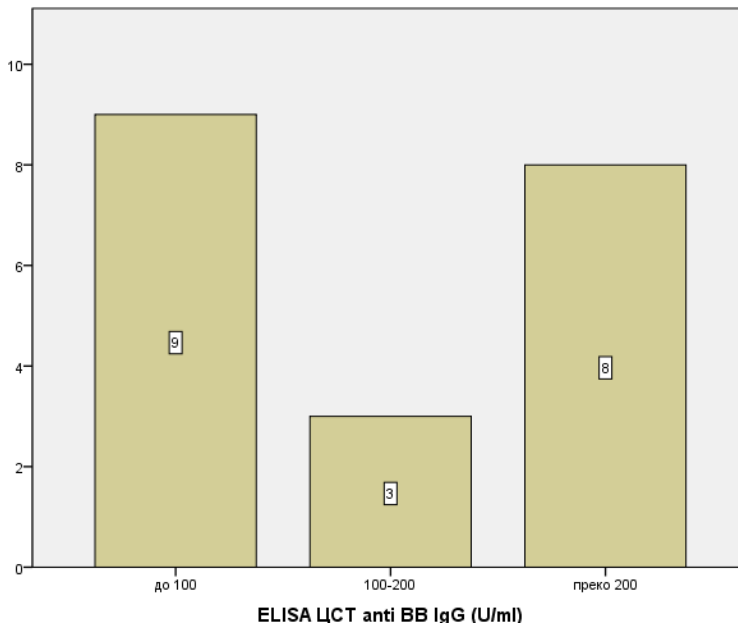
Слика 25. *ELISA ЦСТ anti Borrelia burgdorferi (BB) IgM (U/ml)* позитивне вриједности груписане према висини титра

На слици 26. се види да је *anti Borrelia burgdorferi IgG ELISA* тестом у цереброспиналној течности је био позитиван код 20 (39.2%) наших испитаника.



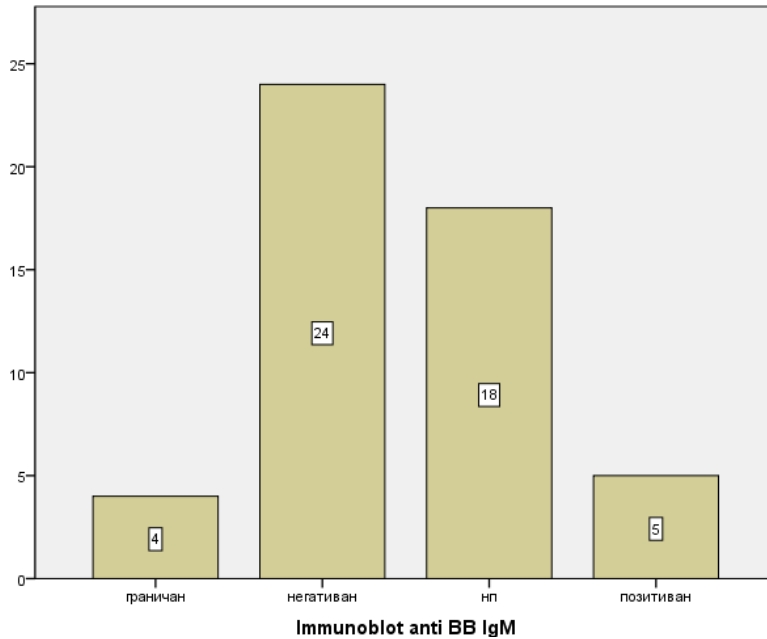
Слика 26. *ELISA* цереброспинална течност *anti Borrelia burgdorferi (BB) IgG (U/ml)*

Слика 27. приказује висине титра *anti Borrelia burgdorferi IgG* антитијела у цереброспиналној течности за 20 наших испитаника који су *ELISA* тестом у серуму имали позитивна *anti Borrelia burgdorferi IgG* антитијела.



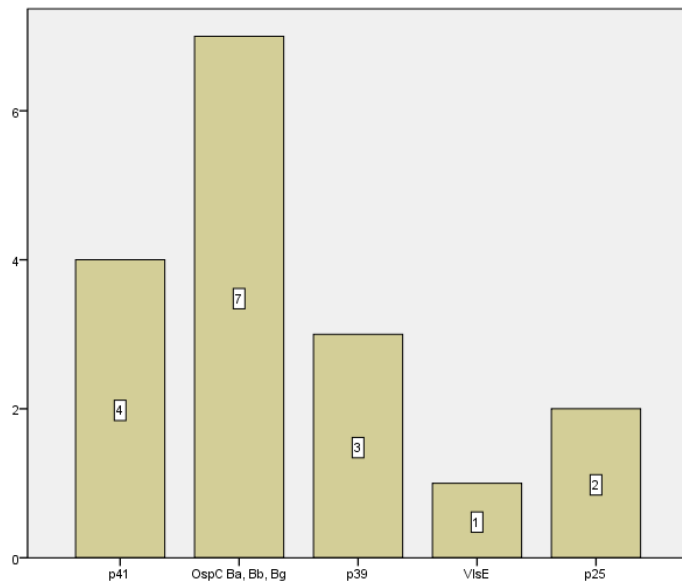
Слика 27. *ELISA* цереброспинална течност (ЦСТ) *anti Borrelia burgdorferi (BB) IgG (U/ml)* позитивне вриједности груписане према висини титра

Слика 28. приказује да је резултат *Immunoblot* теста *anti Borrelia burgdorferi IgM* у серуму код наших испитаника био граничан код четири испитаника, позитиван код њих пет а за њих 18 није било података.



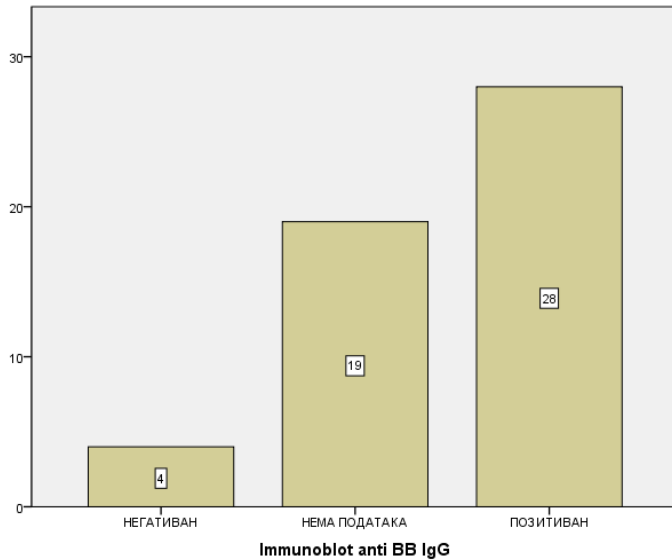
Слика 28. *Immunoblot* серум *anti Borrelia burgdorferi (BB) IgM*

На слици 29. је приказано која антителија на појединачне специфичне антигене *Borrelia burgdorferi* су била позитивна код наших испитаника код којих је *Immunoblot* теста *anti Borrelia burgdorferi IgM* у серуму био позитиван.



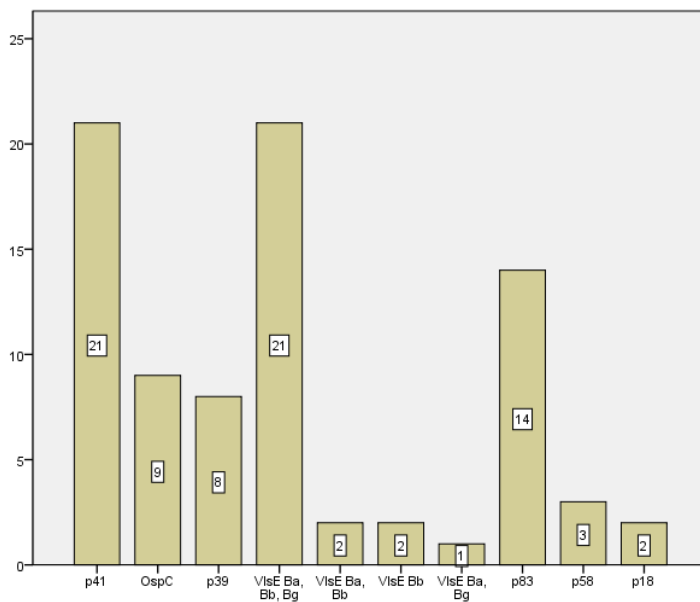
Слика 29. *Immunoblot* серум *anti Borrelia burgdorferi (BB) IgM* позитивна антителија на појединачне специфичне антигене *Borrelia burgdorferi*

На слици 30. је приказано да је резултат *Immunoblot* теста anti *Borrelia burgdorferi* IgG у серум код наших испитаника био позитиван код њих 28 а за 19 није било података.



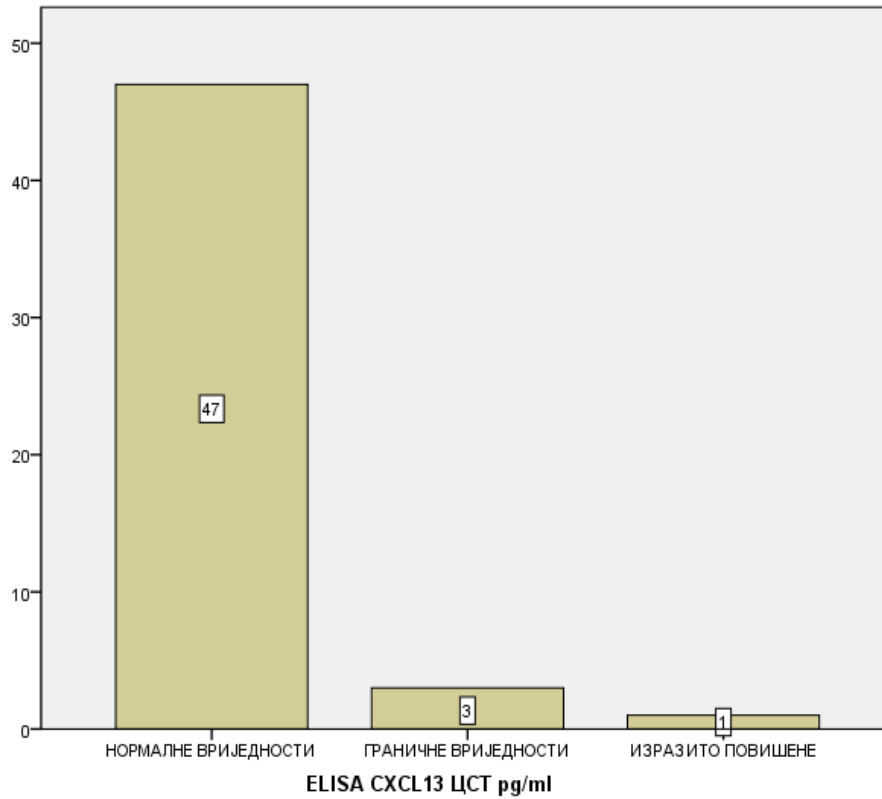
Слика 30. *Immunoblot* серум anti *Borrelia burgdorferi* (BB) IgG

Слика 31. приказује која антителијела на појединачне специфичне антигене *Borrelia burgdorferi* су била позитивна код наших испитаника код којих је *Immunoblot* теста anti *Borrelia burgdorferi* IgG у серуму био позитиван.



Слика 31. *Immunoblot* серум anti *Borrelia burgdorferi* (BB) IgG позитивна антителијела на појединачне специфичне антигене *Borrelia burgdorferi*

Одређивањем концентрације хемокина *CXCL13* у цереброспиналној течности *ELISA* тестом 47 наших испитаника је имало нормалне вриједности, три испитаника граничне а само један изразито повишене вриједности (слика 32.).



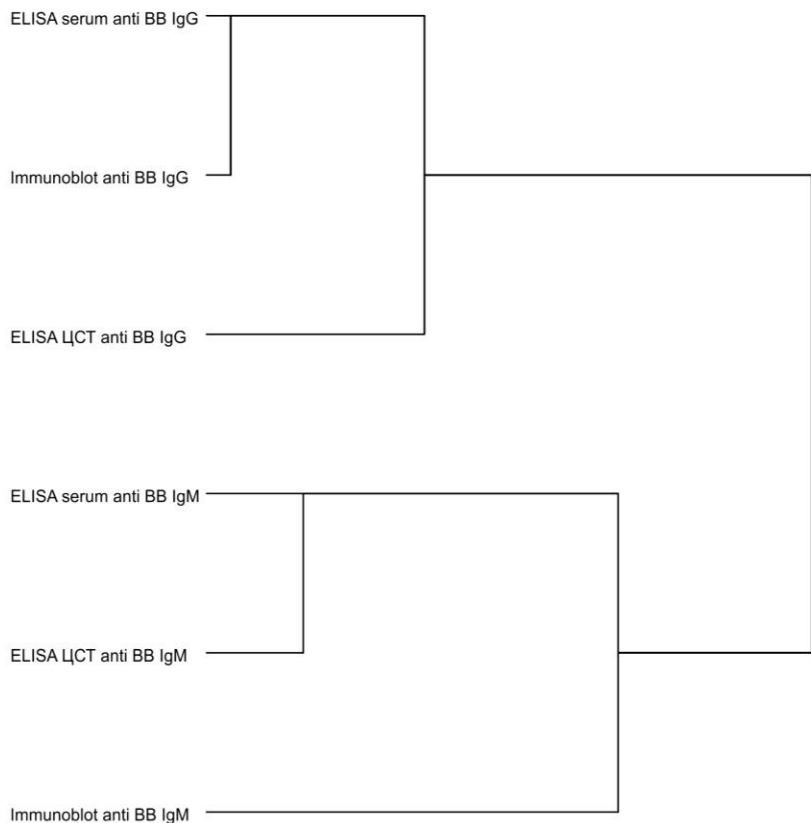
Слика 32. *ELISA CXCL13* у ЦСТ

Анализом корелације резултата појединих серолошких тестова (табела 7.) уочава се јака веза резултата *ELISA anti Borrelia burgdorferi IgM* у серуму и у цереброспиналној течности ($\rho=0,802$, $p<0.001$). Такође јака веза се уочава и између *ELISA anti Borrelia burgdorferi IgG* у серуму и *Immunoblot anti Borrelia burgdorferi IgG* ($\rho=0,787$, $p<0.001$).

Табела 7. Корелација резултата серолошких тестова

		ELISA serum anti BB IgM	ELISA ЦСТ anti BB IgM	ELISA serum anti BB IgG	ELISA ЦСТ anti BB IgG	Immunoblot anti BB IgG
Immunoblot anti BB IgM	коэф. кор.	.447**	.478*	.112	.181	0.000
	p	.009	.010	.534	.357	1.000
	N	33	28	33	28	32
ELISA serum anti BB IgM	коэф. кор.		.802**	-.206	.050	-.029
	p		.000	.147	.750	.877
	N		44	51	44	32
ELISA ЦСТ anti BB IgM	коэф. кор.			-.242	.102	-.120
	p			.114	.510	.552
	N			44	44	27
ELISA serum anti BB IgG	коэф. кор.				.463**	.787**
	p				.002	.000
	N				44	32
ELISA ЦСТ anti BB IgG	коэф. кор.					.433*
	p					.024
	N					27

Уочава се груписање очекивано по типу *IgG* и *IgM*. Ипак, код *IgG* најбоље се слажу резултати *ELISA* у серуму и *Immunoblot*, док код *IgM* најбоље слагање резултата теста уочава се између *ELISA* у серуму и *ELISA* у цереброспиналној течности (слика 33. и табела 8.).



Слика 33. Повезаност појединих испитиваних серолошких тестова по слагању

Табела 8. Индекс слагања резултата појединих испитиваних тестова (Дајсов индекс, 100% слагање је 1)

	ELISA ЦСТ anti BB IgG	ELISA serum anti BB IgM	ELISA ЦСТ anti BB IgM	Immunoblot anti BB IgM	Immunoblot anti BB IgG
<i>ELISA</i> серум <i>anti BB IgG</i>	.778	.296	.231	.467	.978
<i>ELISA</i> ЦСТ <i>anti BB IgG</i>		.421	.333	.455	.757
<i>ELISA</i> серум <i>anti BB IgM</i>			.889	.615	.286
<i>ELISA</i> ЦСТ <i>anti BB IgM</i>				.500	.222
<i>Immunoblot anti BB IgM</i>					.452

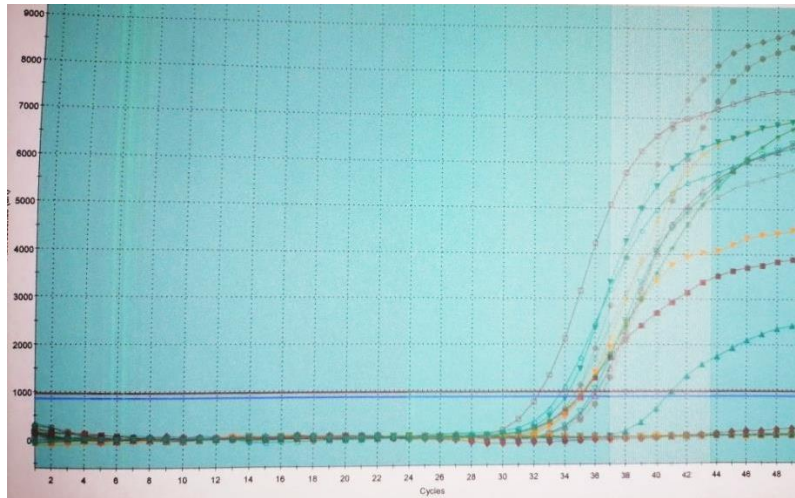
Иако постоје неке статистички значајне везе, коефицијент корелације између појединих клиничких манифестација и антитијела на поједине специфичне антигене *B. burgdorferi* је низак и стога те везе нису значајне за практичну анализу (табела 9.).

Табела 9. Корелација између појединих клиничких манифестација код испитаника и антитијела на поједине специфичне антигене *B. burgdorferi*

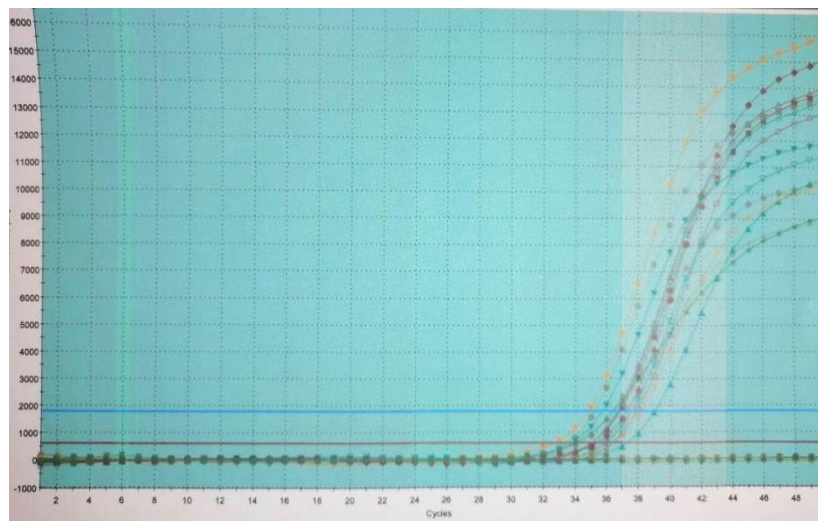
		p41	OspC	p39	VlsE Ba, Bb, Bg	VlsE Ba, Bb	VlsE Bb	VlsE Ba, Bg	p83	p58	p18
трњење и слабост екстремитета	коэф. кор.	-.207	.091	-.406**	-.207	.137	-.081	.096	-.342*	-.011	-.299*
	p	.145	.524	.003	.145	.339	.572	.504	.014	.941	.033
	N	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51
главоболја	коэф. кор.	.169	.109	.267	.169	-.143	.286*	-.100	.217	0.000	.071
	p	.236	.446	.058	.236	.317	.042	.485	.125	1.000	.618
	N	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51
очи-сметње	коэф. кор.	-.215	-.271	-.129	-.215	-.118	.114	-.083	-.360**	-.146	-.118
	p	.130	.055	.369	.130	.409	.427	.564	.010	.306	.409
	N	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51
вртоглавица	коэф. кор.	.477**	.264	.298*	.245	-.081	.213	.355*	.521**	.142	.507**
	p	.000	.061	.034	.083	.574	.133	.011	.000	.319	.000
	N	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51
свијест- поремећај	коэф. кор.	-.096	.248	-.126	-.096	-.059	-.059	-.041	-.016	-.073	-.059
	p	.503	.080	.379	.503	.681	.681	.774	.911	.611	.681
	N	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51
говор- поремећај	коэф. кор.	-.244	-.135	-.126	-.244	-.059	-.059	-.041	-.179	-.073	-.059
	p	.084	.345	.379	.084	.681	.681	.774	.208	.611	.681
	N	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51
нервоза	коэф. кор.	.241	.171	.191	.241	-.041	-.041	-.029	.102	-.051	-.041
	p	.088	.229	.180	.088	.776	.776	.842	.476	.725	.776
	N	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51
крстачна бол уз отежано мокрење	коэф. кор.	.129	-.116	.121	.129	-.051	-.051	-.035	-.154	-.063	-.051
	p	.365	.419	.396	.365	.725	.725	.805	.281	.663	.725
	N	51	51	51	51	51	51	51	51	51	51

5.3.4 Резултати индиректних дијагностичких метода (молекуларна дијагностика)

Резултати *Real-time PCR* методе примјеном дијагностичког сета за доказивање и квантификацију *Borrelia burgdorferi sensu lato complex*, нису показали присуство ДНК бактерије нити у једном узорку цереброспиналне течности (Слика 34.). Интерна контрола теста у узорцима је доказана код испитаника у узорцима цереброспиналне течности након екстракције ДНК.



а.

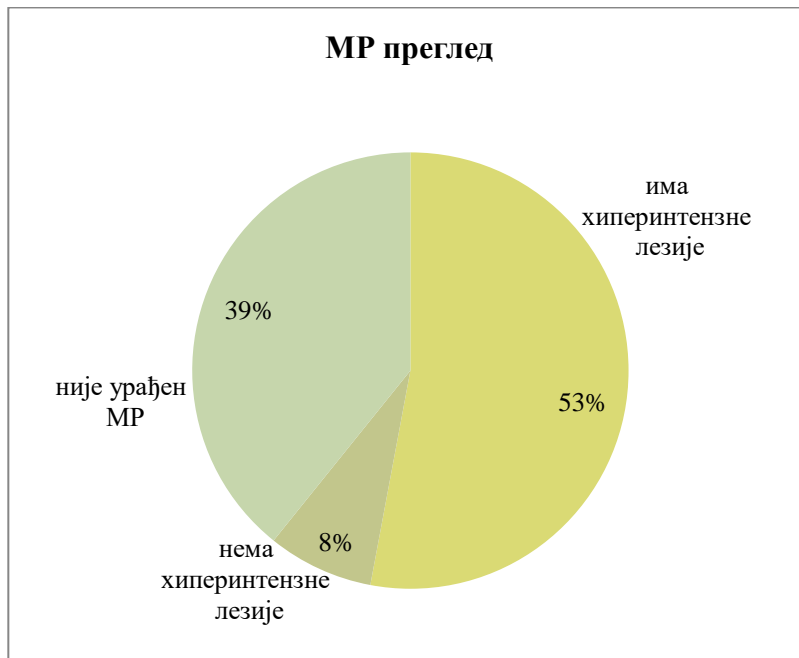


б.

Слика 34. Резултат *RT PCR* методе за детекцију *Borrelia burgdorferi sensu lato complex* (а,б) Слика *Borrelia burgdorferi* амплификације: амплификациона крива за *Borrelia burgdorferi* позитивну контролу, сви тестирани узорци *Borrelia burgdorferi* негативни, амплификационе криве интерне контроле за тестиране узорке.

5.3.5 Резултати неурорадиолошких налаза

Слика 35. приказује да је од свих наших испитаника МР преглед ендокранијума код њих 53% верификовао неспецифичне хиперинтензне лезије, код 8% наведене промјене нису верификоване, а код њих 39% претрага није рађена.



Слика 35. МР преглед ендокранијума

6. ДИСКУСИЈА

Лајмска неуроборелиоза се може развити у било ком тренутку у дисеминованој раној и касној фази лајмске борелиозе ^[9]. Јавља се у 10%–15% свих случајева лајмске борелиозе и може захватити било који дио нервног система ^[4,5,9,14,15,41]. Почетак неуроборелиозе је најчешће субакутан са прогресијом током недјеља ^[42]. Идентификовање ране лајмске борелиозе је од виталног значаја за хитан третман како би се спријечило погоршање и прелазак у касне манифестације болести када је опоравак спорији и може бити непотпун ^[12,14,41]. За класификацију стадијума неуроборелиозе се уз клиничку слику све више користи и дужина трајања болести ^[8].

Према нашем искуству, које је у складу са искуством о лајмској неуроборелиози генерално у Европи, није могуће дијагностиковати лајмску неуроборелиозу само на основу клиничке слике ^[31]. Различите клиничке манифестације и неодређени природни ток лајмске борелиозе често постављају дијагностичке и терапијске дилеме ^[43]. Заједничке смјернице за клиничку праксу Америчког удружења за инфективне болести (*Infectious Diseases Society of America - IDSA*), Америчке академије за неурологију (*American Academy of Neurology - AAN*) и Америчког удружења реуматолога (*American College of Rheumatology - ACR*) из 2020.године за превенцију, дијагнозу и лијечење лајмске борелиозе значајно се разликују од смјерница Европске федерације неуролошких удружења (*European Federation of the Neurological Societies - EFNS*) када је у питању дијагноза лајмске неуроборелиозе. Док смјернице Европске федерације неуролошких удружења наводе анализу цереброспиналне течности као темељ дијагностиковања лајмске неуроборелиозе остали препоручују индивидуалан приступ за анализу цереброспиналне течности, уз одређивање серумских антитијела у ситуацији када пацијенти имају клиничку слику која упућује на могућу лајмску неуроборелиозу и факторе ризика ^[44].

Серолошко тестирање на лајмску борелиозу је значајно побољшано усвајањем двостепене серолошке дијагностике ^[45].

Тренутно нема златног стандарда у дијагностици лајмске борелиозе [22]. Потребно је узети у обзир све доступне параметре, с обзиром на значајну разноликост клиничких облика и исхода [46]. Потребна је корелација резултата тестова са клиничком сликом пацијента [22].

Још увек недостају високо сензитивни и специфични тестови анализе цереброспиналне течности за лајмску неуроборелиозу. Неки од њих су тренутно у фази испитивања као што је концентрација хемокина *CXCL13* у цереброспиналној течности [44]. Идентификација нових биомаркера за активну инфекцију борелијом представљала би велики напредак у дијагностици и праћењу лајмске борелиозе [37].

Наше истраживање лајмске неуроборелиозе са посебним освртом на значај и побољшање дијагностике је прво истраживање овог типа у Републици Српској.

Статистички значајно ($p=0.017$) доминантан пол међу нашим испитаницима је био женски (66.67%). Наведени податак је у складу са подацима из литературе гдје се наводи да се неуроборелиоза чешће јавља код жена средњих година него код мушкараца [47-50], премда има и супротних података [42]. Поједини радови наводе да је, код млађих од 60 година, инциденца лајмске борелиозе већа код мушкараца него код жена, док је однос полова скоро једнак или нешто већи код жена у старијим старосним групама. У неким европским земљама, као што су Словенија и Њемачка, инциденција лајмске борелиозе је већа међу одраслим женама (55%) него међу мушкарцима (45%) [6]. Као могући разлог чешћег оболијевања жена се наводи чињеница да су жене свјесније свог здравља и да чешће траже здравствену заштиту као и могућност да су жене више експонирале инфекцији и да постоје разлике у полној осјетљивости на инфекцију и у клиничким манифестацијама инфекције [47,49,50].

Наши испитаници су били одрасле особе старости од 19 до 78 година. Анализом структуре испитаника по доби уочава се да их је највише било старости између 50 и 60 година. Испитаници преко 40 година чине преко 80% узорка, прецизније 80.4%. Двије трећине њих је било старије од 50 година. Млађи пацијенти су знатно мање заступљени, и

само један у категорији до 20 година. Наведени подаци су у складу са подацима у литератури и што се тиче генерално старости обољелих и што се тиче животне доби са највећим бројем обољелих ^[47,48]. Према литератури наведено може бити последица разлика у активностима у слободно вријеме односно разлике у експонираности инфекцији као и могуће разлике у осјетљивости и кличком испољавању инфекције у различитој животној доби ^[48,50].

Већина наших испитаника, за које смо имали доступне податке о занимању, су пензионери (њих 16) што је такође у складу са животном доби са највећим бројем обољелих. Затим по заступљености занимања испитаника слиједе пољопривредници и медицински техничари. Остала занимања која су забиљежена су шумски радници, студенти, трговци, фризерски и домаћице.

Према подацима из литературе, прецизно вријеме инфекције је често непознато јер само око једна трећина пацијената може да се сјети убода крпеља ^[5,8,42,51,52]. Наведени подаци су у складу са нашим подацима, гдје је 31.37% испитаника навело да зна за убуд крпеља, а већина осталих, њих 64.71%, није могла да се сјети убода крпеља нити да га изричито негира. Уколико се угриз догодио на скривеним дијеловима тијела, постоји шанса да није примијећен, као ни типична лезија коже (*erythema migrans*) ^[19]. Још мање наших испитаника, свега њих пет (9.8%), је навело да је имало *erythema migrans* док је највећи број, њих 37 (72.55%), навело да не зна да је имало *erythema migrans* али да наведену промјену на кожи не може изричито ни да негира, што је последично довело до тога да је наведени проценат мањи у односу на податке из литературе према којој се наведене промјене на кожи најчешће сјетило једна трећина до једна половина обољелих ^[5,42,52]. Тиме се наглашава важност узимања детаљне анамнезе од пацијента, али и чињеница да лајмска неуроборелиоза може бити први и једини клинички знак код пацијената са раном лајмском борелиозом ^[52,53].

Клиничка слика лајмске борелиозе варира у зависности од стадијума болести [12]. Нервни систем је други најчешће захваћен систем после коже [54]. Неуролошке манифестације се јављају код 10%-15% пацијената са лајмском борелиозом [41].

Главни неуролошки дефицит који су наши испитаници навели на пријему у болницу је осјећај трњења и слабости екстремитета (њих 35 односно близу 70%), потом главобоља (17), три пацијента са парезом *n. facialis*, 10 пацијената са офталмолошким тегобама (диплопија, птоза капка, губитак вида на једно око, титрање ока, нистагмус, панувеитис, офталмопареза), вртоглавица (7), поремећај свијести (4), поремећај говора (4), крстачни бол са отежаним мокрењем (3), нервоза (2). У истраживање су ушли само они испитаници код којих је рађена лумбална пункција. Резултати других студија такође показују да су најчешће клиничке манифестације лајмске неуроборелиозе радикулитис (бол у леђима сам или у комбинацији са исијавањем бола у екстремитете без или са додатном парализом екстремитета), кранијална парализа (најчешће *n. facialis*), главобоља, слабост [4,42,55]. Такође се наводи и да вртоглавица и атаксија хода могу бити симптоми лајмске борелиозе у неким случајевима [19].

Симптоми неуроборелиозе могу бити прилично неспецифични или чак имитирати друге неуролошке болести [42]. Као што је приказано и у нашем раду, и подаци из литературе наводе да су манифестације веома хетерогене, и да се лајмска неуроборелиоза може манифестовати широким спектром различитих симптома од стране централног и периферног нервног система који се могу јавити изоловано или истовремено [43,56]. Код наших испитаника су доминирале манифестације периферног нервног система које према литератури укључују кранијалне неуропатије, радикулонеуритис и друге облике захватања периферних нерава [51]. Старије особе често имају неспецифичне клиничке знаке који се често и преклапају са хроничним болестима и слабошћу која је у вези и са животном доби (посебно са когнитивним оштећењем и поремећајем хода) [57,58]. Двије трећине наших испитаника је било старије од 50 година.

Неуролошки симптоми лајмске неуроборелиозе могу се појавити рано (трајање симптома краће од шест мјесеци) или касно (трајање симптома дуже од шест мјесеци) у

току болести ^[42,59]. Сагледавањем трајања симптома до пријема у болницу уочили смо да је највећи број наших испитаника имао симптоме у трајању до три мјесеца. Доминантно највећи број међу њима се жалио на симптоме тачно мјесец дана прије пријема у болницу.

Клиничке карактеристике ране неуроборелиозе укључују лимфоцитни менингитис, радикулонеуритис, кранијални неуритис са једностраном или билатералном парезом *n. facialis* и повремене нападе тешких главобоља ^[59]. Наведене манифестације се могу јавити изоловано или у комбинацији и сматрају се класичним знацима који би требало да сугеришу дијагнозу неуроборелиозе чак и у одсуству кожных лезија или података о убоду крпеља ^[12,14,19,51,52,55,60,61]. Ако су захваћени кранијални нерви, најчешће је то *n. facialis*. Постоје и изоловани извјештаји који описују случајеве захватања вестибулокохлеарног нерва са губитком слуха или вртоглавицом ^[19]. У Енглеској су, на примјер, током петогодишњег периода истраживања забиљежена 22 случаја неуроборелиозе укључујући пацијенте са парализом *n. facialis*, радикулонеуритисом и менингоенцефалитисом, и два пацијента са периферним сензорним манифестацијама а пријављена је и изолована парализа нерва (*n. facialis, n. abducens*) ^[55]. Од наших испитаника менингитис је имало њих 18 (35.3%), парезу *n. facialis* три испитаника, а главобољу је пријавило њих 17.

Радикулонеуритис се обично манифестује израженим сегментним болом, који је израженији ноћу. Бол има пекући, пробадајући или тргајући карактер и обично слабо реагује на све уобичајене аналгетике. Око 75% пацијената са са наведеним синдромом развије неуролошке дефиците за једну до четири недјеље, углавном у облику млохаве парализе или сегментног сензорног поремећаја. Радикулитис је често сакрални уз уринарне симптоме, укључујући задржавање урина. Постоји неколико пријављених случајева неурогене дисфункције уринарног тракта због сакралног радикулитиса изазваног борелијом. Крстачни бол са отежаним мокрењем су имала три наша испитаника. Уринарни тракт може бити захваћен на два начина: прво, утицајем радикулитиса на инервирајућа влакна што доводи до слабости мишића детрузора, и друго, слабошћу детрузора као резултатом директне инвазије спирохета у зид мокраћне бешике. Оба механизма могу резултирати хиперрефлексијом детрузора, арефлексијом детрузора или дисинергијом детрузора-сфинктера. У случајевима радикулонеуритиса са неурогеном

мокраћном бешиком разумно је урадити магнетну резонанцу лумбалне кичме да би се искључили други могући разлози наведених тегоба ^[14]. Радикулитис се, код наших испитаника, као и у литератури ^[42], манифестовао као осјећај бола и трњења у екстремитетима, болом у леђима уз повремено и отежано мокрење и исијавање бола у ноге, руке и леђа у комбинацији са једностраном слабошћу руку или ногу што се у почетку погрешно може протумачити као мождани удар.

Уз окуларне манифестације лајмске неуроборелиозе обично постоје додатни симптоми ^[62]. Манифестације на оку које су повезане са лајмском неуроборелиозом су ријетке, али су описане различите укључујући коњунктивитис, кератитис и парализу екстраокуларних мишића као и хориоидитис, папилитис, замагљен вид, страбизам ^[40,51,61]. Изоловани едем папиле је ријетка манифестација, поготово код одраслих, која се обично манифестује као диплопија ^[52,62]. Диференцијална дијагноза код пацијената са диплопијом је веома широка и укључује интракранијалну масу, идиопатску интракранијалну хипертензију, инфективну етиологију, трауму главе или поремећени проток цереброспиналне течности у коморама ^[62]. Офталмолошке тегобе које су имали наши испитаници су диплопија, птоза капка, губитак вида на једно око, титрање ока, нистагмус, панувеитис, офталмопареза.

Могуће је да су пацијенти са офталмолошким тегобама као и са парезом *n. facialis* испитивани на другим одјељењима, у наше истраживање су ушли само они испитаници код којих је рађена лумбална пункција. Холандске и друге смјернице препоручују серолошко тестирање на лајмску борелиозу у ситуацијама када пацијенти имају билатералну парализу *n. facialis* или једнострану парализу *n. facialis* са другим знацима могуће лајмске борелиозе, као што је недавни *erythema migrans* и/или убод крпеља ^[57,63,64]. У литератури се наводи да преко 70% пацијената са парализом *n. facialis* због лајмске неуроборелиозе не пријави недавни убод крпеља и/или *erythema migrans* ^[63]. Наши испитаници са парализом *n. facialis* су сви дали податак о претходном убоду крпеља и посљедичној појави *erythema migrans*. Од њих троје, два испитаника су имала парализу *n. facialis* без других наведених тегоба, а један је уз парализу *n. facialis* имао и радикулопатију што је као могућа комбинација симптома описано и у литератури ^[42].

Финска проспективна студија је, међу 503 пацијента са парализом *n. facialis*, од којих је њих 11 имало лајмску неуроборелиозу, открила повезаност између главобоље и лајмске неуроборелиозе ^[63]. Податак о главобољи је дало 17 наших испитаника.

Касна неуроборелиоза је присуство континуирано активне болести која траје дуже од шест мјесеци, а симптоме карактеришу хронични менингитис, прогресивни енцефалитис, мијелитис или енцефаломијелитис и церебрални васкулитис ^[59]. Једна трећина наших испитаника, од оних који су навели дужину трајања тегоба прије пријема у болницу, је имала тегобе дуже од шест мјесеци. Потпуна клиничка слика прогресивног енцефаломијелитиса код лајмске неуроборелиозе може да имитира хроничну прогредирајућу мултиплу склерозу ^[65]. Мијелитис и енцефалитис су ријетке клиничке манифестације касне лајмске неуроборелиозе ^[42]. Типичне манифестације трансверзалног мијелитиса укључују билатералну (често несиметричну) или једнострану слабост екстремитета, сензорне поремећаје и поремећај аутономног нервног система испод захваћеног нивоа кичмене мождине ^[52]. Акутни церебелитис је ријетка манифестација лајмске неуроборелиозе са веома хетерогеним клиничким током, од самоограничавајућих благих симптома до тешке клиничке слике са компресијом задње лобањске јаме или пирамидалних путева. Симптоми укључују главобољу, повраћање, грозницу, атаксију, дизартрију, тремор, менингизам, поремећај свијести ^[43]. Церебрални васкулитис и симптоми слични можданом удару су пријављени код младих особа без икаквих основних фактора ризика за мождани удар; ови пацијенти обично имају лошије дугорочне исходе у поређењу са типичним пацијентима са можданим ударом ^[59]. Главобоља, мучнина, малаксалост и повраћање, вјероватно знаци хроничног менингитиса, могу бити повезани са секундарном деменцијом и хроничном лајмском неуроборелиозом ^[65]. Хронична периферна неуропатија је могућа касна манифестација лајмске неуроборелиозе која се често повезује са АСА ^[55,66]. Док неки пацијенти са периферном неуропатијом показују доказе о захваћености менингеа, преглед цереброспиналне течности је често неуспјешан када је лајмска неуроборелиоза ограничена на периферни нервни систем. Стога се може претпоставити да је код периферне лајмске неуропатије развој специфичног имуног одговора за борелију у цереброспиналној течности процес који зависи од времена ^[66].

Периферна неуропатија генерално је уобичајен неуролошки поремећај са више узрока. У до 25% случајева није идентификована етиологија ^[58].

Остале тегобе на пријему које су наводили наши испитаници су малаксалост, осип, бол у зглобовима, кардиолошке тегобе, један случај увећаних лимфних чворова. Наведени симптоми су симптоми који се и описују као могуће клиничке манифестације лајмске борелиозе у једном од њена три стадијума.

Најчешћи коморбидитети које су наводили наши испитаници су повишен крвни притисак (њих 11), потом шећерна болест и проблеми са кичмом са по пет испитаника, те друге неуролошке болести (четири испитаника), имунодефицијентна стања (три испитаника). Присуство других болести са највећом учесталости код наших испитаника је у складу са њиховом животном доби и са подацима из литературе ^[67]. Раније студије су показале да хипергликемија умањује реакције неутрофила на борелију и уклањање ових бактерија из више ткива, и утиче на лошије исходе инфекције са борелијом. Иако остаје још доста да би се утврдили механизми помоћу којих хипергликемија ремети имуни одговор на борелију, ови налази сугеришу да би истраживање потенцијалних утицаја шећерне болести на исходе инфекције са борелијом код пацијената могло бити оправдано ^[68].

У истраживању смо извршили процјену хематолошких и биохемијских параметара крви код наших испитаника (комплетна крвна слика, диференцијална крвна слика, гликемија, аспартат аминотрансфераза, аланин аминотрансфераза, С-реактивни протеин) које су рађене у Заводу за клиничку лабораторијску дијагностику УКЦ РС. Просјечне вриједности наведених параметара су биле у референтним вриједностима изузев нешто више просјечне вриједности моноцита у диференцијалној крвној слици (13.86%) и просјечне вриједности гликемије (6.07) и С-реактивног протеина (5.87) које су биле незнатно изнад горње границе. И у литератури се наводи да су параметри комплетне крвне слике, јетрене функције и С-реактивни протеин код обољелих од лајмске неуроборелиозе углавном у референтним вриједностима ^[44,53,67,69].

Темељна анализа цереброспиналне течности се сматра неопходном за поуздану дијагнозу лајмске неуроборелиозе посебно у ситуацији када је серологија позитивна или негативна али са снажном клиничком сумњом на лајмску неуроборелиозу [42,62,63,69,70]. Цито-хемијска анализа цереброспиналне течности је урађен у Заводу за клиничку лабораторијску дијагностику УКЦ РС код свих наших испитаника. Од 51 испитаника, њих 18 (35.3%) је имало плеоцитозу (повећан број ћелијских елемената у цереброспиналној течности) и то њих 15 са вриједностима укупног броја ћелијских елемената од 5 до 100, а њих три са вриједностима од 100 до 1000. Мононуклеари су били више заступљени од полиморфонуклеара. Преосталих 33 (64.7%) наших испитаника нису имала плеоцитозу у цереброспиналној течности. Уредан налаз анализе цереброспиналне течности код обољелих од лајмске неуроборелиозе је описан и у литератури [55]. Активна неуроборелиоза без плеоцитозе се у литератури контроверзно расправља и предлажу се три сценарија. Најчешћа интерпретација је да је већина случајева са интратекалном производњом антителија на борелију без плеоцитозе у цереброспиналној течности последица претходне неуроборелиозе. Други аутори приписују одсуство плеоцитозе у неким случајевима продуженој болести. Супротно томе, неки аутори су сугерисали да недостатак повећаног броја ћелија у цереброспиналној течности може бити повезан са кратком дужином трајања болести у неким случајевима [42]. Наши испитаници нису били подвргнути другој лумбалној пункцији. Вриједности протеина у цереброспиналној течности су биле повишене код 19 (37.3%) наших испитаника и кретале су се у распону од 0.48 до 3.6 g/L код једног нашег испитаника. Вриједности шећера у цереброспиналној течности су код већине наших испитаника биле у референтним вриједностима а незнатно снижене код њих девет. И у литератури се наводи да је најчешћа абнормалност цереброспиналне течности благо повишени протеини заједно са лимфоцитном плеоцитозом [44,55,62] као и да су вриједност глукозе у цереброспиналној течности код обољелих од лајмске неуроборелиозе обично у референтним вриједностима (1/2 до 2/3 од вриједности глукозе у крви) [56]. Ови налази немају специфичност јер нису неуобичајени и код других инфекција нервног система [44]. Низак ниво глукозе у цереброспиналној течности је ријетко описан налаза код обољелих од лајмске неуроборелиозе [12].

Дијагноза и серолошка потврда лајмске борелиозе може бити изазовна и тешка, поставља се на основу клиничких симптома и лабораторијских тестова ^[47,56]. Дијагноза лајмске неуроборелиозе у нашем истраживању је дефинисана клиничком сликом уз позитивне серолошке тестове потврђене *Immunoblot* тестом. И према литератури, дијагностички критеријуми за борелиозу нервног система укључују могућност излагања крпељима, клиничке карактеристике повезане са неуроборелиозом и пратећи лабораторијски налази ^[42,51,60]. Дијагностиковање неуроборелиозе је изазов јер је клиничка слика веома разнолика и неуролошки симптоми често откривају борелиозу без пријављеног податка о убоду крпеља или лезији коже ^[55]. И код наших испитаника са клиничком сликом лајмске неуроборелиозе, њих само 31.37% је дало податак о убоду крпеља, још мање 9.8% је видјело промјену на кожи која одговара *erythema migrans* и ти испитаници су и знали за претходни убод крпеља. Према актуелним европским дефиницијама случаја, *erythema migrans* се дијагностикује клинички и не захтијева лабораторијско тестирање док дијагноза лајмске неуроборелиозе подразумејева анализу цереброспиналне течности и одређивање серумских антителија на борелију. Због ниске позитивне предиктивне вриједности, не препоручује се тестирање особа са неспецифичним субјективним симптомима ^[47]. Ензимски имуносорбентни тест (*ELISA*) је прва линија, а потом се, код пацијената који имају позитиван или граничан налаз *ELISA* теста, ради потврди *Immunoblot* тест којим се потврђује позитиван или неодређен *IgM* и *IgG* резултат *ELISA* теста ^[42,47,63]. Наведени тестови су рађени у Заводу за микробиологију УКЦ РС и код наших испитаника и интерпретирани према упутама произвођача. Од укупно 51 пацијента, *ELISA* серум *anti Borrelia burgdorferi IgM* тест је био позитиван код њих 13, а *IgG* код њих 38; *ELISA* цереброспинална течност *anti Borrelia burgdorferi IgM* је био позитиван код седам испитаника, *IgG* код њих 20, а за седам пацијената нисмо имали податке ни за *IgM* ни за *IgG*. *Immunoblot* тест серум *anti Borrelia burgdorferi IgM* је био граничан код четири испитаника, позитиван код њих пет, а за њих 18 није било података; док је *IgG* био позитиван код њих 28 а за 19 није било података. Код осам испитаника у серуму су била присутна и *IgG* и *IgM* позитивна антителија, а у цереброспиналној течности код њих четири. Анализом корелације резултата појединих серолошких тестова наших испитаника уочена је јака веза резултата *ELISA anti Borrelia burgdorferi IgM* у серуму и у цереброспиналној течности ($\rho=0,802$, $p<0.001$). Такође јака веза је уочена и

између *ELISA anti Borrelia burgdorferi IgG* у серуму и *Immunoblot anti Borrelia burgdorferi IgG* ($\rho=0,787$, $p<0.001$). Од 18 наших испитаника са плеоцитозом, њих двоје је имало позитивна и *IgM* и *IgG* антителијела *ELISA* тестом и у серуму и у цереброспиналној течности и на потврдном *Immunoblot* тесту; четири испитаника су имала позитивна само *IgG* антителијела *ELISA* тестом и у серуму и у цереброспиналној течности од њих два и на потврдном *Immunoblot* тесту, а за два нисмо имали података; код четири испитаника позитивна само *IgG* антителијела *ELISA* тестом у серуму и од њих два и на потврдном *Immunoblot* тесту, а за два нисмо имали података.

Позитивни резултати теста не доводе увијек до дијагнозе лајмске борелиозе, а негативни тестови не искључују дефинитивно дијагнозу, неинфицирани људи могу имати имунитет и тест је позитиван, док инфицирани људи могу имати кашњење у одговору антителијела и могу бити негативни ^[14,42,47,55]. Одржавање позитивних серолошких претрага лајмске борелиозе у цереброспиналној течности може бити узроковано одложеним клиренсом протеина цереброспиналне течности, прије него упорном интратекалном синтезом, леукоцити се ријетко налазе, а титар *IgG* може остати повишен ^[46]. *IgM* антителијела у серуму имају ограничену дијагностичку вриједност за дијагнозу лајмске неуроборелиозе ^[24]. Ако симптоми болести трају мјесец дана или дуже, нема потребе да се ради *ELISA* теста за *IgM*, због лажно позитивних резултата, што је и названо једномјесечним дијагностичким правилом за лајмску борелиозу ^[47]. У случају ране лајмске борелиозе, борелија-специфична *IgM* антителијела се могу детектовати од треће седмице, а *IgG* антителијела од шесте седмице и тада се сматра да је серолошки тест повезан са више од 90% сензитивности и специфичности ^[8,16,20]. Сероконверзија понекад изостаје након раног третмана антибиотиком који може блокирати производњу антителијела ^[47,55]. Специфична интратекална производња *IgG* се може открити тек након шест до осам недјеља у неким случајевима ^[55]. Пошто *IgM* може унакрсно да реагује са антигенима који нису повезани са борелијом, *IgM* тест је мање специфичан од *IgG* теста за лајмску борелиозу. Антителијела могу да трају мјесецима до годинама, чак и након успјешног лијечења антибиотиком и излијечења болести и, стога, тестирање не би требало да буде у сврху контроле лијечења ^[47]. Што се тиче *Immunoblot* теста, сматра се да пацијент у првих 30 дана од појаве симптома има позитиван *IgM* блот. Лажно позитиван *IgM* није

неуобичајен и може се јавити код разних других инфекција и аутоимуних болести. Ако су симптоми присутни дуже од 30 дана, *IgG* блот такође треба да буде позитиван. Ако није, позитиван *IgM* блот је вјероватно лажно позитиван резултат. Позитиван *IgG* блот се може примијетити у раној дисеминованој и касној фази болести или може одражавати прошлу инфекцију. Лажно негативни серолошки резултати се такође могу јавити ако је пацијент имунокомпромитован или је лијечен веома рано у току болести [50]. Циљ мора бити да се неуроборелиоза и атипични случајеви идентификују што је прије могуће, уз помоћ анализе цереброспиналне течности, да се пацијент брзо лијечи и побољша прогноза [55].

Иако постоје неке статистички значајне везе, коефицијент корелације између појединих клиничких манифестација и антитијела на поједине специфичне антигене *B. burgdorferi Immunoblot* теста је био низак и није доказан његов клинички значај.

Анализом присуства антитијела на поједине специфичне антигене *B. burgdorferi Immunoblot* теста у *IgM* класи наших испитаника најзаступљенији је био *ospC* код 7 испитаника, потом *p39*, те *p25* и код једног испитаника *VlsE* док је у *IgG* класи најзаступљенији *VlsE* код 26 испитаника, *p41* код 21 испитаника, потом *p83* код 14 испитаника, *ospC* код њих 9, потом *p58* и *p18*. Према литератури, за интерпретацију *Immunoblot* теста је значајно познавање антигенских карактеристика појединих протеина, *p41* је изузетно имуноген али има релативно мали дијагностички значај због укрштене реакције са флагелином других бактерија, *p25* је маркер ране фазе имуности, *VlsE* варијабилни површински липопротеин који је заједнички за различите врсте борелије, имуноген у раној и касној фази болести [71].

Одређивање концентрације хемокина *CXCL13* у цереброспиналној течности ELISA тестом до сада није рађено у Републици Српској. Наведена претрага је у сврху нашег истраживања рађена у Заводу за микробиологију УКЦ РС, кориштен је *Euroimmun* тестом *CXCL13 ELISA* и добили смо резултате који показују да је 47 наших испитаника имало нормалне вриједности, три испитаника граничне, а само један изразито повишене вриједности. Повећање концентрације хемокина *CXCL13* у цереброспиналној течности је предложено као потенцијални биомаркер за рану лајмску неуроборелиозу [6,28,29,33,34,42,59,72-

^{76]}. Велика варијација у нивоу *CXCL13* у цереброспиналној течности примијећена код пацијената са лајмском неуроборелиозом у ранијим студијама је још увек необјашњена^[74]. Још увијек се не користи као рутински параметар због питања око специфичности, његова улога се истражује, сматра се да још увијек није довољно проучен ни стандардизован^[42,75,77,78]. Кроз литературу је показано да и бројна друга стања (инфективна, инфламаторна, неопластична) такође могу изазвати повећане нивое *CXCL13*, укључујући неуросифилис, туберкулозни менингитис, ХИВ инфекцију, криптококозу, трипаносомијазу, лимфом ЦНС-а, мултиплу склерозу, *anti-NMDA* рецептор енцефалитис, Расмусенов (*Rasmussen*) енцефалитис па и вирусни менингитиси ^[6,31,33,34,72,77,79-81]. За спорадично повишење *CXCL13* у цереброспиналној течности пацијената са вирусним менингитисом (варичела зостер вирус, ентеровирус, крпељски менингоенцефалитис, херпес симплекс вирус) које је описано у различитим студијама се наводи да вјероватно одражава ријетку пролазну индукцију *CXCL13* код вирусних инфекција централног нервног система ^[79]. Код већине наших пацијената *CXCL13* је био негативан и није помогао дијагнози. И у литератури је описано да су пацијенти са дефинитивном лајмском неуроборелиозом имали негативан *CXCL13* ^[33,66], док у многим радовима наилазимо и на податке да европски пацијенти са Банвартовим синдромом обично имају високе нивое *CXCL13* у цереброспиналној течности који је присутан и прије појаве антитијела ^[6,59]. Тестирање цереброспиналне течности, укључујући *CXCL13*, може бити информативно за лајмску борелиозу централног нервног система, али не и за периферни нервни систем гдје је откривена неосјетљивост *CXCL13* у цереброспиналној течности. Код већине наших пацијената се радило о захваћености управо периферног нервног система. Концентрација *CXCL13* у цереброспиналној течности је генерално нормална и код лајмске енцефалопатије ^[66,82]. Неки аутори сматрају да *CXCL13* у цереброспиналној течности вјероватно има потенцијал да подржи дијагнозу акутне лајмске неуроборелиозе код пацијената са типичним клиничким симптомима и плеоцитозом у цереброспиналној течности (чак и прије плеоцитозе), али са негативном серологијом и без претходне антибиотске терапије ^[28,66,74,76-79,83]. Треба га пажљиво тумачити и увијек у складу са другим лабораторијским тестовима и клиничком сликом конкретног пацијента ^[28,72,84]. Нивои *CXCL13* повишени у цереброспиналној течности код пацијената са лајмском неуроборелиозом брзо опадају након почетка лијечења антибиотиком, посебно

цефтриаксоном или доксициклином [28,79]. Један од критеријума за искључивање из истраживања је примјена антибиотске терапије за лајмску борелиозу прије лумбалне пункције. Међутим, као и у литератури [34], и ми смо свјесни чињенице да се може десити да третман антибиотиком прије лумбалне пункције не буде документован, што доводи до лажно ниског нивоа *CXCL13* у цереброспиналној течности. Процедура руковања има значајан утицај на резултат теста [34]. Дуготрајно складиштење узорака цереброспиналне течности би у теорији такође могло утицати на концентрације хемокина иако су неке претходне студије извијестиле о доброј стабилности *CXCL13* у узорцима цереброспиналне течности који су били замрзнути до пет година [79], премда има студија које наводе да би циклуси замрзавања-одмрзавања могли да изазову деградацију *CXCL13*, што доводи до смањених концентрација [31]. Хитонен (*Hitonen*) и сарадници су показали да до пет циклуса замрзавања-одмрзавања није значајно утицало на нивое *CXCL13* [31]. Наши узорци су имали само један циклуса замрзавања-одмрзавања, тако да се може претпоставити да су били високог квалитета. Наводи се и да је *CXCL13* подложен утицају и дужине времена прије складиштења и трајању складиштења [34]. Наше ограничено искуство са овим биомаркером цереброспиналне течности сугерише да то није високо осјетљива метода за дијагностиковање лајмске борелиозе што је у складу и са неким подацима из литературе [27]. Додатна истраживања су потребна да би се утврдила дијагностичка вриједност *CXCL13* у цереброспиналној течности код групе пацијената од посебног интереса, односно оних са типичним клиничким симптомима и плеоцитозом у цереброспиналној течности, али негативном серологијом (вјероватна лајмска неуроборелиоза) [34].

Real-time PCR у цереброспиналној течности је специфична дијагностичка метода за неуроборелиозу, али има ниску осјетљивост [27]. У нашем истраживању по први пут у Републици Српској је рађен *real-time PCR* у цереброспиналној течности за доказивање и квантификацију *Borrelia burgdorferi sensu lato complex* и није доказано присуство ДНК бактерије нити у једном узорку цереброспиналне течности. Молекуларне анализе су урађене у Ветеринарском институту Републике Српске „др Васо Бутозан“. Кориштен је тест руског произвођача *Vector-Best* који је основан 1991.године и водећи је руски произвођач за *ELISA* и *real-time PCR* тестове и који је у сврху евалуације генотипа *Borrelia*

burgdorferi кориштен и у другим истраживањима ^[85]. Слична ситуација као у нашем истраживању је описана у једној норвешкој студији гдје је наведено да ниједан од пацијената у групи могуће лајмске неуроборелиозе није имао позитиван *Real-time PCR* ^[18]. И друге студије наводе да је код раних дисеминованих и код касних неуролошких манифестација лајмске неуроборелиозе *PCR* у цереброспиналној течности често негативан и ограничене вриједности због малог броја бактерија у овим типовима узорака ^[86]. Највјероватније објашњење је да је концентрација ДНК борелије испод границе детекције *PCR* тестова који се користе за генотипизацију, иако се не може искључити ни присуство ријетких генотипова који нису циљани коришћеним тестовима ^[11]. Разлог се може потражити и у дизајну прајмера/сонде различитих *PCR* тестова. Сугерисано је да би запремина и поступак сакупљања цереброспиналне течности такође могли да играју улогу у вјероватноћи откривања ДНК борелије, пошто је број борелија у цереброспиналној течности веома мали ^[18].

Приликом утврђивања инфекције централног нервног система значајно би било разликовати интратекално произведена антителијела и антителијела која су мигрирала из крви у цереброспиналну течност, а да би се искључио пасивни пренос антителијела из крви ^[55]. Потребно је добијање истовремених узорака цереброспиналне течности и серума ^[16,39,45]. Квоцијент концентрације албумина у цереброспинална течност/серум (КАЛб) се сматра најбољим индикатором за дисфункцију крвно-ликворне баријере ^[42]. Наведени параметар се, према литератури, такође користи у комбинацији са историјом болести пацијента, клиничком сликом и другим лабораторијским налазима ^[36]. Може остати неупадљив када је трајање болести кратко или код дјете са парезом *n.facialis* као и у случају веома ране антибиотске терапије ^[8]. У нашем истраживању нисмо располагали потребним подацима за израчунавање наведеног квоцијента, потребна су додатна испитивања.

Најновија технологија која се развија за побољшање ране дијагнозе лајмске борелиозе је метаболомика. Ова метода користи течну хроматографију-масену спектрометрију за откривање биомолекула ниске молекуларне тежине које тијело производи током болести. Овај тест је тренутно у фази истраживања и још није доступан за клиничко тестирање ^[86].

Укупно 31 испитаник (61%) је урадио МР ендокранијума, њих 27 (53% од свих испитаника) је имало описане хиперинтензне лезије у бијелој мозданој маси. У литератури су, код обољелих од лајмске неуроборелиозе радиолошки пријављене различите лезије у бијелој мозданој маси. Лакунарне лезије код хроничне лајмске неуроборелиозе највероватније су последица васкулитиса малих и средњих крвних судова^[65]. Налази МР ендокранијума код обољелих од неуроборелиозе нису специфични и прије свега служе да се искључе друга обољења која могу бити узрок сличних симптома [19,42,45,46].

У циљу унапређења дијагностике лајмске неуроборелиозе, неопходни су нови дијагностички тестови са високом сензитивности и специфичности, посебно с обзиром и на чињеницу о ефикасности ране антибиотске терапије^[29,66,79,87,88]. Поуздани дијагностички тестови су потребни у циљу разликовања активне од инактивне форме лајмске неуроборелиозе, као и разликовања од других болести са сличним клиничким манифестацијама^[37].

7. ЗАКЉУЧЦИ

1. У клиничкој слици одраслих пацијената са сумњом на лајмску неуроборелиозу доминира захваћеност периферног нервног система у односу на централни нервни систем.
2. Одређени неуролошки симптоми, посебно уз податак о претходном убоду крпеља, би требало увијек да подстакну обраду у правцу лајмске неуроборелиозе.
3. Нема значајнијег одступања у основним хематолошко-биохемијским анализама код пацијената са сумњом на лајмску неуроборелиозу.
4. Код пацијената са сумњом на лајмску неуроборелиозу може бити присутна плеоцитоза у цереброспиналној течности чак и онда када нема клиничких симптома менингитиса.
5. Изостанак плеоцитозе у цереброспиналној течности није параметар који искључује лајмску неуроборелиозу.
6. Тестови двостепене серолошке дијагностике (*ELISA*, *Immunoblot*) су веома значајни код пацијената са сумњом на лајмску неуроборелиозу, али их треба тумачити са опрезом и у корелацији са клиничком сликом и другим доступним тестовима.
7. Повезаност између појединих клиничких манифестација лајмске неуроборелиозе и присуства антитијела на поједине специфичне антигене *B.burgdorferi* у *Immunoblot* тесту је ниска и нема значаја у постављању дијагнозе.
8. Није доказан значај одређивања концентрације хемокина *CXCL13* у цереброспиналној течности као маркера у дијагностици лајмске неуроборелиозе.

9. Осјетљивост *RT PCR* у цереброспиналној течности код обољелих са сумњом на лајмску неуроборелиозу је веома ниска и није од великог значаја у дијагностици, те нема основе да се ради рутински.

10. Потребне су додатне проспективне студије за нове поуздане дијагностичке тестове у циљу унапређења дијагностике лајмске неуроборелиозе и разликовања активне од инактивне форме лајмске неуроборелиозе као и од других болести са сличним клиничким манифестацијама.

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Kozak S, Kaminiow K, Kozak K, Paprocka J. Lyme Neuroborreliosis in Children. *Brain Sci.* 2021; 11(6):758.
2. Ford L, Tufts DM. Lyme Neuroborreliosis: Mechanisms of *B. burgdorferi* Infection of the Nervous System. *Brain Sci.* 2021;11(6):789.
3. Sinha P, Oberoi B, Sirohi YS, Sood A, Bhattacharjee S. A Case Report of Early Disseminated Lyme Disease. *Neurol India* 2020;68(4):916-918.
4. Garcia-Monco JC, Benach JL. Lyme Neuroborreliosis: Clinical Outcomes, Controversy, Pathogenesis, and Polymicrobial Infections. *Ann Neurol.* 2019; 85(1):21–31.
5. Lindland ES, Solheim AM, Andreassen S, Quist-Paulsen E, Eikeland R, Ljøstad U, et al. Imaging in Lyme neuroborreliosis. *Insights Imaging.* 2018;9(5):833-844.
6. Steere AC, Strle F, Wormser GP. Lyme borreliosis. *Nat Rev Dis Primers.*2016;2:16090.
7. Forde K, Gorman JO, Gavin PJ, Dryden M, Keady D, Hanahoe B. The clinical presentation, treatment and outcome of serologically confirmed paediatric Lyme disease in the Republic of Ireland over a 5-year period: a retrospective cohort study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*2021 Apr;40(4):725-734.
8. Rauer S, Kastenbauer S, Hofmann H, Fingerle V, Huppertz HI, Hunfeld KP, et al. Guidelines for diagnosis and treatment in neurology - Lyme neuroborreliosis. *Ger Med Sci.* 2020;18:Doc03.
9. Garkowski A, Łebkowska U, Kubas B, Garkowska E, Rutka K, Gawarecka E, et al. Imaging of Lyme Neuroborreliosis: A Pictorial Review. *Open Forum Infect Dis.* 2020;7(10):370.
10. Škiljić D, Gustavsson M, Dotevall L, Norrsell K, Grönlund MA. Ophthalmological findings in neuroborreliosis—a prospective study performed in western Sweden. *Acta Ophthalmol.* 2019; 97: 44–52.

11. Barstad B, Quarsten H, Tveitnes D, Noraas S, Ask IS, Saeed M, et al. Direct Molecular Detection and Genotyping of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Cerebrospinal Fluid of Children with Lyme Neuroborreliosis. *Clin Microbiol*. 2018;56(5):e01868-17.
12. Kayal N, Ghosh R, Mazumdar PS, Das S, Ghosh S, Pandit A, et al. Bilateral Facial Nerve Palsy in a Young Woman From West Bengal: Do Not Forget Lyme Neuroborreliosis. *Neurol India*. 2021;69(4):997-1001.
13. Јавна здравствена установа Институт за јавно здравство. Здравствено стање становништва Републике Српске у 2019. години. ЈЗУ Институт за јавно здравство, Република Српска.
14. Omotosho YB, Sherchan R, Ying GW, Shayuk M. A Unique Case of Bannwarth Syndrome in Early Disseminated Lyme Disease. *Cureus*. 2021; 13(4): e14680.
15. Yang J, Han X, Liu AM, Bao F, Peng Y, Tao L, et al. Chemokine CXC Ligand 13 in Cerebrospinal Fluid Can Be Used as an Early Diagnostic Biomarker for Lyme Neuroborreliosis: A Meta-Analysis. *J Interferon Cytokine Res*. 2017;37(10):433-439.
16. Rauer S, Kastenbauer S, Fingerle V, Hunfeld KS, Huppertz HI, Dersch R, et al. Lyme Neuroborreliosis. Clinical Practice Guideline. *Dtsch Arztebl Int*. 2018;115(45):751–756.
17. Roos K. Neurologic Complications of Lyme Disease. *Neuroinfectious Diseases* 2021; 27(4):1040-1050.
18. Skogman BH, Wilhelmsson P, Attalah S, Petersson AC, Ornstein K, Lindgren PE. Lyme neuroborreliosis in Swedish children-PCR as a complementary diagnostic method for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in cerebrospinal fluid. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021; 40(5):1003-1012.
19. Jozefowicz-Korczynska M, Zamyslowska-Szmytko E, Piekarska A, Rosiak O. Vertigo and Severe Balance Instability as Symptoms of Lyme Disease-Literature Review and Case Report. *Front Neurol*. 2019;10:1172.
20. Jaulhac B, Saunier A, Caumes E, Bouiller K, Gehanno JF, Rabaud C, et al. Lyme borreliosis and other tick-borne diseases. Guidelines from the French scientific societies (II). Biological diagnosis, treatment, persistent symptoms after documented or suspected Lyme borreliosis. *Med Mal Infect*. 2019;49(5):335-346.

21. Lager M, Dessau RB, Wilhelmsson P, Nyman D, Jensen GF, Matussek A, et al. Serological diagnostics of Lyme borreliosis: comparison of assays in twelve clinical laboratories in Northern Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38(10):1933-1945.
22. Kodym P, Kurzová Z, Berenová D, Pícha D, Smíšková D, Moravcová L, et al. Serological Diagnostics of Lyme Borreliosis: Comparison of Universal and *Borrelia* Species-Specific Tests Based on Whole-Cell and Recombinant Antigens. *J Clin Microbiol*. 2018; 56(11): e00601-18.
23. Gorkom T, Kremer K, Voet W, Notermans DW, Vlamincxx BJM, Sankatsing SUC, et al. Disagreement between the results from three commercial tests for the detection of *Borrelia*-specific serum antibodies in the Netherlands associated with antibiotic treatment for Lyme borreliosis: a retrospective study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017; 36(11):2137-2146.
24. Hillerdal H, Henningson AJ. Serodiagnosis of Lyme borreliosis-is IgM in serum more harmful than helpful? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2021;40(6):1161-1168.
25. Eckman EA, Clausen DM, Herdt AR, Pacheco-Quinto J, Halperin JJ. Specificity and Diagnostic Utility of Cerebrospinal Fluid CXCL13 in Lyme Neuroborreliosis. *Clin Infect Dis*. 2021;72(10):1719-1726.
26. Gudowska-Sawczuk M, Mroczko B. Chemokine Ligand 13 (CXCL13) in Neuroborreliosis and Neurosyphilis as Selected Spirochetal Neurological Diseases: A Review of Its Diagnostic Significance. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(8):2927.
27. Pöyhönen H, Lähdesmäki T, Hytönen J, Peltola V. Cerebrospinal Fluid Pleocytosis and Elevated C-X-C Motif Chemokine Ligand 13 Value Predict Lyme Borreliosis in Children With Facial Palsy. *Pediatr Infect Dis J*. 2019;38(12):1195-1198.
28. Henningson AJ, Lager M, Brännström R, Tjernberg I, Skogman BH. The chemokine CXCL13 in cerebrospinal fluid in children with Lyme neuroborreliosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018; 37(10):1983–1991.
29. Gorkom T, Arkel GHJ, Heron M, Volet W, Thijsen STF, Kremer K. The Usefulness of Two CXCL13 Assays on Cerebrospinal Fluid for the Diagnosis of Lyme Neuroborreliosis: a Retrospective Study in a Routine Clinical Setting. *J Clin Microbiol*. 2021;59(9):e00255-21.

30. Haglund S, Lager M, Gyllemark P, Andersson G, Ekelund O, Sundqvist M, et al. CXCL13 in laboratory diagnosis of Lyme neuroborreliosis-the performance of the recomBead and ReaScan CXCL13 assays in human cerebrospinal fluid samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2022.;41:175-179.
31. Ziegler K, Rath A, Schoerner C, Meyer R, Bertsch T, Erbguth F, et al. Comparative Analysis of the Euroimmun CXCL13 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and the ReaScan Lateral Flow Immunoassay for Diagnosis of Lyme Neuroborreliosis. *J Clin Microbiol*. 2020;58(9):e00207-20.
32. Skogman BH, Lager M, Brudin L, Jenmalm MC, Tjernberg I, Henningsson AJ. Cytokines and chemokines in cerebrospinal fluid in relation to diagnosis, clinical presentation and recovery in children being evaluated for Lyme neuroborreliosis. *Ticks Tick Borne Dis*. 2020;11(3):101390.
33. Eckman EA, Pacheco-Quinto J, Herdt AR, Halperin JJ. Neuroimmunomodulators in Neuroborreliosis and Lyme Encephalopathy. *Clin Infect Dis*. 2018;67(1):80-88.
34. Rupprecht TA, Manz KM, Fingerle V, Lechner C, Klein M, Pfirrmann M, et al. Diagnostic value of cerebrospinal fluid CXCL13 for acute Lyme neuroborreliosis. A systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(12):1234-1240.
35. Gyllemark P, Forsberg P, Ernerudh J, Henningsson AJ. Intrathecal Th17- and B cell-associated cytokine and chemokine responses in relation to clinical outcome in Lyme neuroborreliosis: a large retrospective study. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):27.
36. Theel ES, Aguero-Rosenfeld ME, Pritt B, Adem PV, Wormser GP. Limitations and Confusing Aspects of Diagnostic Testing for Neurologic Lyme Disease in the United States. *J Clin Microbiol*. 2019;57(1):e01406-18.
37. Raffetin A, Saunier A, Bouiller K, Caraux-Paz P, Eldin C, Gallien S, et al. Unconventional diagnostic tests for Lyme borreliosis: a systematic review. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(1):51-59.
38. Wagemakers A, Visser MC, De Wever B, Hovius JW, Van de Donk NWCJ, Hendriks EJ, et al. Case report: persistently seronegative neuroborreliosis in an immunocompromised patient. *BMC Infect Dis*. 2018; 18: 362.

39. Lantos PM, Rumbaugh J, Bockenstedt LK, Falck-Ytter YT, Aguero-Rosenfeld ME, Auwaerter PG, et al. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA), American Academy of Neurology (AAN), and American College of Rheumatology (ACR): 2020 Guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Lyme Disease. *Arthritis Care & Research* 2021;73(1):1-9.
40. Ørbæk M, Bodilsen J, Møhring Gnthersen RM, Shekhrājka N, Nordberg CL, Larsen L, et al. CT and MR neuroimaging findings in patients with Lyme neuroborreliosis: A national prospective cohort study. *J Neurol Sci.* 2020;419:117-176.
41. Dixit A, Garcia Y, Tesoriero L, Berman C, Rizzo V. Diplopia: A Rare Manifestation of Neuroborreliosis. *Case Rep Neurol Med.* 2018; 2018:9720843.
42. Schwenkenbecher P, Pul R, Wurster U, Conzen J, Pars K, Hartmann H, et al. Common and uncommon neurological manifestations of neuroborreliosis leading to hospitalization. *BMC Infect Dis.* 2017; 17:90.
43. McGlacken-Byrne A, McCloskey C, Fisher A, Paul Mullaney P. Lyme neuroborreliosis causing unilateral cerebellitis presenting as horizontal nystagmus in a 7-year-old: an unusual presentation to an ophthalmology service. *Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus* 2021;25(4):250-252.
44. Portales-Castillo CA, Said M. To Lumbar Puncture or Not to Lumbar Puncture: A Case of Lyme Neuroborreliosis. *Cureus.* 2021;13(9):e17970.
45. Dutta A, Hunter JV, Vallejo JG. Bannwarth Syndrome: A Rare Manifestation of Pediatric Lyme Neuroborreliosis. *Pediatr Infect Dis J.* 2021;40(11):e442-444.
46. Jeantin L, Rodriguez-Regent C, De Martino S, Gayraud M, Cosserat J. Intrathecal antibody kinetics in neuroborreliosis: A report on three cases and a literature review. *Infectious Diseases Now.* 2021;(7):627-629.
47. Petrulionienė A, Radzišauskienė D, Paulauskas A, Venalis A. Lyme Disease among Patients at an Ambulatory Unit in a Highly Endemic Country: Lithuania. *Medicina (Kaunas).* 2021; 57(2):184.
48. Enkelmann J, Böhmer M, Fingerle V, Siffczyk C, Werber D, Littmann M, et al. Incidence of notified Lyme borreliosis in Germany, 2013–2017. *Sci Rep.* 2018;8:14976.

49. Von Fricken ME, Rolomjav L, Illar M, Altantogtokh D, Hogan KM, Uyanga B, et al. Geographic Range of Lyme Borreliosis in Mongolia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2019; 19(9): 658-661.
50. Ropac D, Šokman B, Stašević I, Kurešić Filipović S. Epidemiološke osobitosti lajmske bolesti u Republici Hrvatskoj u razdoblju od 2012. do 2016. Godine. *Acta Med Croatica* 2019;73:151-158.
51. Teodoro T, Oliveira R, Afonso P. Atypical Lyme Neuroborreliosis, Guillain-Barré Syndrome or Conversion Disorder: Differential Diagnosis of Unusual Neurological Presentations. *Case Rep Neurol.* 2019;11(1):142–147.
52. Opielka M, Opielka W, Sobocki BK, Starzynska A. Subacute transverse myelitis with optic symptoms in neuroborreliosis: a case report. *BMC Neurol.* 2020;20:244.
53. Hieber M, Lambeck J, Rauer S, Bardutzky J. Isolated Cervical Myelitis in Lyme Disease: A Rare Manifestation of Acute Neuroborreliosis. *Case Rep Neurol.* 2020;12(3):276-281.
54. Russell ALR, Dryden MS, Pinto AA, Lovett JK. Lyme disease: diagnosis and management. *Practical Neurology* 2018;18:455-464.
55. Kaminsky AL, Maisonobe T, Lenglet T, Psimaras D, Debs R, Viala K. Confirmed cases of Neuroborreliosis with involvement of peripheral nervous system. *Medicine (Baltimore).* 2020; 99(40):e21986.
56. Dabiri I, Calvo N, Nauman F, Pahlavanzadeh M, Burakgazi AZ. Atypical presentation of Lyme neuroborreliosis related meningitis and radiculitis. *Neurol Int.* 2019;11(4):8318.
57. Méreaux JL, Hébant B, Magne N, Quesney G, Lefaucheur R. Bilateral facial palsy in an older person. *Age and Ageing.* 2020;49(5):887–888.
58. Wormser GP, Strle F, Shapiro ED, Dattwyler RJ, Auwaerter PG. A critical appraisal of the mild axonal peripheral neuropathy of late neurologic Lyme disease. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017; 87(2):163–167.
59. Khan S, Bhattal GK, Shah NH, Lascano J, Karki A. Neuroborreliosis with Unusual Presentation: A Case Report. *Cureus.* 2019;11(9):e5758.

60. Owens J, Filatov A, Husain-Wilson S. Guillain-Barre Syndrome, Neuroborreliosis, or Both. *Cureus*. 2020;12(4):e7823.
61. Domic I, Vitorovic D, Spritzer S, Sviggum E, Patel J, Ramanan P. Acute transverse myelitis- A rare clinical manifestation of Lyme neuroborreliosis. *IDCases*. 2019;15: e00479.
62. May K, Upadhyayula S. Papilledema as the Sole Manifestation of Neuroborreliosis. *Case Rep Infect Dis*. 2021;2021:5565900.
63. Bierman SM, van Kooten B, Vermeeren YM, Bruintjes TD, van Hees BC, Bruinsma RA, et al. Incidence and characteristics of Lyme neuroborreliosis in adult patients with facial palsy in an endemic area in the Netherlands. *Epidemiol Infect*. 2019;147:e160.
64. Moniuszko-Malinowska A, Guziejko K, Czarnowska A, Kulakowska A, Zajkovska O, Pancewicz S. Assessment of anti-HSV antibodies in patients with facial palsy in the course of neuroborreliosis. *Int J Clin Pract*. 2021;75(3):13749.
65. Kristoferitsch W, Aboulenein-Djamshidian F, Jecel J, Rauschka H, Rainer M, Stanek G, et al. Secondary dementia due to Lyme neuroborreliosis. *Wien Klin Wochenschr*. 2018; 130(15):468–478.
66. Gubanova K, Lang J, Latzko J, Wuchty B, Waiß C, Sellner J, et al. Peripheral neuropathy due to neuroborreliosis: Insensitivity for CXCL13 as early diagnostic marker. *International Journal of Infectious Diseases* 2021;105:460-462.
67. Zulfiqar S, Qureshi A, Dande R, Puri C, Persaud K, Awasthi S. The many manifestations of a single disease: neuroborreliosis. *J Community Hosp Intern Med Perspect*. 2021;11(1): 56–59.
68. Javid A, Zlotnikov N, Pětrošová H, Tang TT, Zhang Y, Bansal AK, et al. Hyperglycemia Impairs Neutrophil-Mediated Bacterial Clearance in Mice Infected with the Lyme Disease Pathogen. *PLoS One*. 2016; 11(6):e0158019.
69. Lefeuvre F, Baseggio L. Lymphoid involvement of cerebrospinal fluid in Lyme disease. *Ann Biol Clin* 2020;78 (1):108-10.
70. Dersch R, Fingerle V. Lyme borreliosis and Lyme neuroborreliosis-an update. *Dtsch Med Wochenschr*. 2021;146(11):728-732.

71. Ristanović E, Atanasievska S, Protić-Đokić V, Hinić N, Lalošević D. Mikrobiološka detekcija borrelia burgdorferi i savremena dijagnostika lajm borelioze. MD-Medical Data 2017; 9(3):143-147.
72. Van Burgel ND, Bakels F, Kroes ACM, 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.
73. Lintner H, Hochgatterer-Rechberger P, Pischinger B, Seier J, Vollmann P, Haushofer A, et al. Sensitivity and specificity of cerebrospinal fluid CXCL13 for diagnosing Lyme neuroborreliosis-a study on 1410 patients and review of the literature. J Neurol Sci. 2020; 414:116843.
74. Barstad B, Tveitnes D, Dalen I, Noraas S, Ask IS, Bosse FJ, et al. The B-lymphocyte chemokine CXCL13 in the cerebrospinal fluid of children with Lyme neuroborreliosis: associations with clinical and laboratory variables. Infect Dis (Lond).2019;51(11-12):856-863.
75. Waiß C, Kindler W, Ströbele B, Aspöck C, Oberndorfer S. CXCL-13 as a biomarker in the diagnostics of neuroborreliosis.Nervenarzt.2017;88(6):635-641.
76. Pícha D, Moravcová L, Smíšková D. Diagnostic relevance of the chemokine CXCL13 and anti-C6 peptide antibodies in patients with neuroborreliosis. Epidemiol Mikrobiol Imunol. 2017;66(2):80-85.
77. Predkele N, Mednieks J. Lyme Disease and Associated NMDAR Encephalitis: A Case Report and Literature Review. Neurol Int. 2021;13(4):487–496.
78. Knudtzen FC, Nilsson AC, Hovius JW, Skarphedinsson S. The predictive value of CXCL13 in suspected Lyme neuroborreliosis: a retrospective cross-sectional study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2020;39(8):1461-1470.
79. Remy MM, Schöbi N, Kottanattu L, Pfister S, Duppenhaler A, Suter-Riniker F. Cerebrospinal fluid CXCL13 as a diagnostic marker of neuroborreliosis in children: a retrospective case-control study. J Neuroinflammation. 2017;14: 173.

80. Pilz G, Wipfler P, Otto F, Hitzl W, Afazel S, Haschke-Becher E, et al. Cerebrospinal fluid CXCL13 indicates disease course in neuroinfection: an observational study. *Journal of Neuroinflammation*.2019;16(1).
81. Wagner JN, Weis S, Kubasta C, Panholzer J, von Oertzen TJ. CXCL13 as a diagnostic marker of neuroborreliosis and other neuroinflammatory disorders in an unselected group of patients. *J Neurol*. 2018;265(1):74-81.
82. Halperin JJ. Lyme neuroborreliosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2019;32(3):259-264.
83. Masouris I, Klein M, Ködel U. The potential for CXCL13 in CSF as a differential diagnostic tool in central nervous system infection. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2020;18(9):875-885.
84. Barstad B, Tveitnes D, Noraas S, Ask IS, Saeed M, Bosse, F et al. Cerebrospinal Fluid B-lymphocyte Chemoattractant CXCL13 in the Diagnosis of Acute Lyme Neuroborreliosis in Children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*.2017; 36(12):286-292.
85. Nykytyuk S, Klymnyuk S, Podobivsky S, Levenets S, Stelmakh O. Lyme borreliosis-endemic disease in children of Ternopil region. *Georgian Med News*. 2020;(307):95-104.
86. Madison-Antenucci S, Kramer LD, Gebhardt LL, Kauffman E. Emerging Tick-Borne Diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(2):e00083-18.
87. Stupica D, Bajrović FF, Blagud R, Kišek TC, Collinet-Adler S, Lah A, et al. Clinical manifestations and long-term outcome of early Lyme neuroborreliosis according to the European Federation of Neurological Societies diagnostic criteria (definite versus possible) in central Europe. A retrospective cohort study. *Eur J Neurol*. 202;28(9):3155-3166.
88. Tjernberg I, Johansson M, Henningsson AJ. Diagnostic performance of cerebrospinal fluid free light chains in Lyme neuroborreliosis-a pilot study. *Clin Chem Lab Med*. 2019; 57(12):2008-2018.

БИОГРАФИЈА

Име (име оца) презиме: Татјана (Саво) Рогановић

Датум и мјесто рођења: 14.10.1974.године, Бањалука

Основну школу и средњу Медицинску школу завршила у Бањалуци.

Медицински факултет Универзитета у Бањалуци уписала 1993. године и на истом дипломирала јануара 2000. године просјечном оцјеном 9,12. Добитник Златне плакете Универзитета у Бањалуци.

Након завршеног студија и положеног стручног испита, радила као љекар опште праксе у Војно-медицинском центру у Бањалуци.

Од децембра 2000. године запослена у Клиници за инфективне болести Универзитетског Клиничког центра Републике Српске.

Специјализација из инфектологије одобрена 19.11.2002.године а **специјалистички испит из инфектологије** положила 19.12.2006. године на Медицинском факултету Универзитета у Бањалуци и стекла звање љекара **специјалисте инфектолога.**

Ужу специјализацију из клиничке фармакологије и фармакотерапије успјешно завршила 01.03.2011.године на Медицинском факултету Универзитета у Београду и стекла стручни назив **специјалисте клиничке фармакологије.**

Постдипломску наставу на Медицинском факултету у Бањалуци одслушала према плану и програму и положила све предвиђене испите просјечном оцјеном постдипломског студија 9,72.

Магистарску тезу „Карактеристике менингитиса изазваног вирусом мумпса у току епидемије у Републици Српској” одбранила 07.11.2014. године и тиме стекла научно звање **магистра медицинских наука.**

Асистент на предмету Инфективне болести Медицинског факултета Универзитета у Бањалуци од 2005. године, **виши асистент** од 2015. године, а задњи **реизбор у звање вишег асистента** 01.07.2021. године одлуком Сената Универзитета.

Изјава 1

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација

"Значај *ELISA*, *Immunoblot* теста, хемокина *CXCL 13* и *Real-time PCR* у
дијагностици лајмске неуроборелиозе"

"Diagnostic value of *ELISA*, *Immunoblot* test, chemokine ligand (*CXCL 13*) and
Real-time PCR in lyme neuroborreliosis"

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да докторска дисертација, у цјелини или у дијеловима, није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

У Бањој Луци, март 2022.године

Потпис докторанта

Маријана Ротарић

Изјава 2

Изјава којом се овлашћује Универзитет у Бањој Луци да докторску дисертацију учини јавно доступном

Овлашћујем Универзитет у Бањој Луци да моју докторску дисертацију под насловом "Значај *ELISA*, *Immunoblot* теста, хемокина *CXCL13* и *Real-time PCR* у дијагностици лајмске неуроборелиозе"

Која је моје ауторско дјело, учини јавно доступном.

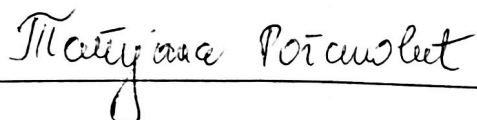
Докторску дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у дигитални репозиторијум Универзитета у Бањој Луци могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство - некомерцијално - без прераде
4. Ауторство - некомерцијално – дијелити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – дијелити под истим условима

У Бањој Луци, март 2022. године

Потпис докторанта



Изјава 3

Изјава о идентичности штампане и електронске верзије докторске дисертације

Име и презиме аутора Татјана Рогановић

Наслов рада Значај *ELISA*, *Immunoblot* теста, хемокина *CXCL 13* и *Real-time PCR* у дијагностици лајмске неуроборелиозе

Ментор Проф. др Милош Кораћ

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације идентична електронској верзији коју сам предала за дигитални репозиторијум Универзитета у Бањој Луци.

У Бањој Луци, март 2022. године

Потпис докторанта

