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.
Tatjana Roganović

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

DOCTORAL DISSERTATION

BANja LUKA, 2022.
Ментор: др Милош Корач, 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 (екыретама мигранс), 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 апти 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 увјек 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 увјек 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: B 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 biomarker for 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 clinical 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

AV атриовентрикуларни
ACА acrodermatitis chronica atrophicans
BSK Барбур-Стонер-Кели подлога (Barbour-Stoenner-Kelly)
VlsE варијабилни површински липопротеин (Vmp like sequence)
ДНК дезоксирибонуклеинска киселина
ELISA имуноензимски тест (enzyme-linked immunosorbent assay)
ЕМ erythema migrans
IL-6 интерлеукин 6
IgM имуноглобулин М
IgG имуноглобулин Γ
КТ компјутеризована томографија
ЛНБ лајмска неуроборелиоза
МР магнетна резонанца
NMDAR N-methyl D-aspartat receptor
Osp вањски површински протеин (Outer surface protein)
OspA спољашњи протеин А
OspC спољашњи протеин Ц
PCR реакција ланчаног умножавања (polymerase chain reaction)
PET позитронска емисиона томографија (positron emission tomography)
ХИВ вирус хумане имунодефицијенције
CDC Центри за контролу и превенцију болести (Centers for Disease Control and Prevention)
ЦНС централни нервни систем
ЦСТ цереброспинална течност
CXCL13 хемокин лиганд 13 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 13)
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-бихемијске 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 дјеце 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 (ACA) 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 1a.) 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 1b.) 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% \[^{6}\].
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 пример, *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 примјеђено у централној и источној Канади. У сјевероисточној Америци и у већем дијелу Европе мјесеци врхунца појаве болести су јун и јул, што је посљедица 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 југоисточних 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 имунни одговор домаћина, изазиваћући 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 пљувачке 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 пријање на молекуле домаћина посредовано површинским липопротеинима су кључни за кретање *Borrelia burgdorferi* кроз крв и ткива домаћина и избјегавање 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 нелечених пацијената још неколико година, што може изазвати упорне симптоме у неким случајевима [6]. Спирохетална инфекција нервног система је додатно комплексована, јер експресија гена *Borrelia burgdorferi* може бити различита у крви домаћина у поређењу са цереброспиналном течности. На примјер, познато је да је спољашњи протеин Α (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 разумевање 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 обилежена 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 потпуног или прецедењивање или прецјењивање броја случајева због погрешне дигнозе или шифрања [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].


Осим лајмске борелиозе крпељима се могу пренијети и друге заразне болести као што су крпељски менингдонцефалитис, 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\textsuperscript{[3,6,9]}. Клинички консензус тренутно дијели лајмску борелиозу у акутну локализовану (\textit{erythema migrans}) и рану и касну дисеминовану инфекцију\textsuperscript{[4]}. Табела 1. Стадијуми лајмске борелиозе

<table>
<thead>
<tr>
<th>Систем</th>
<th>Рана локализована инфекција</th>
<th>Рана дисеминована инфекција</th>
<th>Касна дисеминована инфекција</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Кожа</td>
<td>\textit{Erythema migrans}</td>
<td>мултипл еритеми, макулозни осип, уртикарија, лимфоцитом</td>
<td>\textit{ACA}</td>
</tr>
<tr>
<td>Мишићно-контактни систем</td>
<td>миграторне артралгије, бол у мишићима, тетивама, бурзама, костима, краткотрајни артритис</td>
<td>дужи напади артритиса, хронични артритис, периферне ензезопатије, упална перипне или луксације везане за \textit{ACA}</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Нервни систем</td>
<td>менингитис, кранијални неуритис, Bell-ова парализа, моторни и сензорни радикулонеуритис, благи енцефалитис, mononeuritis multiplex, ријетко: мијелитис, кореја, церебеларна атаксија</td>
<td>хронични енцефаломијелитис, спастичка парапареза, атактички ход, благи ментални поремећаји, хронична аксонална полирадикулонеуропатија</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Лимфни систем</td>
<td>регионална лимфаденопатија</td>
<td>регионална и генерализована лимфаденопатија, спленомегалија</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Срце</td>
<td>\textit{AV} блок I, II и III степени</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

1.2.1 Рана локализована инфекција

Рана локализована инфекција се уочава код 80-90% пацијената неколико дана или недеља након убора крпеља, на месту убора, у виду локализоване промјене на кожи (\textit{erythema migrans})\textsuperscript{[1,4,6,8,9]}. У року од 3 до 32 дана, борелија може да мигрира по кожи око подручја убора, да се шири лимфним или крвним путем до различитих органа\textsuperscript{[14]}. У Европи \textit{erythema migrans} обично није праћена другим симптомима, за разлику од Америке гдје је често праћена општим симптомима као што су артралгије, миалгије, малаксалост,
умор, главобољ, 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 недеља [6]. Како се спирохете шире кроз крвоток или ткива
развијају се различите клиничке манифестације лајмске борелиозе [1]. Кожа, зглобови,
нерви 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
erthema migrans [8]. Borrelia burgdorferi се може проширити на друга мјеста на кожи,
изазивајући вишеструку erythema migrans. Борелијски лимфоцитом је ријетка кожна
манIFESTација ране лајмске борелиозе у Европи, манифестује се као субакутна лезија
коже која се обично јавља на брадавици код одраслих или на ушној реси код дјеце 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, краниjalnu 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 менингарадикулонеуритисом 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 главном се манифестује као флуктуирајући 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 недеља, 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 обилежјима. 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 неуролошким 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 неуролошких симптома мање или више од шест мјесеци (табела 2.) \[^5\].

Табела 2. Разлике у презентацији ране и касне лајмске неуроборелиозе

<table>
<thead>
<tr>
<th>Параметар</th>
<th>Рана лајмска неуроборелиоза</th>
<th>Касна лајмска неуроборелиоза</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Појава неуролошких симптома</td>
<td>недјеље до мјесеци</td>
<td>мјесеци до године</td>
</tr>
<tr>
<td>Типичне манифестације</td>
<td>Банвартов синдروم: болни менингорадикулитис са једностраном или обостраном парезом n.facialis</td>
<td>енцефаломијелитис са спастичким атактичким поремећајем хода заједно са дисфункцијом мокраћне бешике</td>
</tr>
<tr>
<td>Бол</td>
<td>радикуларни бол</td>
<td>ријетко било какав бол</td>
</tr>
</tbody>
</table>

1.3.1 Ране неуролошке манифестације

Гаран-Бужаду-Банварт синдروم (менингорадикулонеуритис) 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]. Паацијент 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, билиateralно 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-мононуклеарну ћелијску плеоцитозу, борелија специфичне олигоклоналне траке се могу појавити, обично након четири седмице болести, као и интратекална синтеза антитијела [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, занимљив 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 услед 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 ACA код 48–64% случајева, претежно сензорна и дистална, парестезије и хипоестезије су водећи симптоми [4,8]. Изолована полиурипатија или полиуриритис 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-атаксичним поремећајем хода и дисфункцијом мокраћног мјехура. Симптоми се могу развићи током неколико дана или мјесеци. Неки пацијенти пате од тешке тетра- и парапарезе. 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 узрочани 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 антитијела [4].

1.4 Дијагностичке методе

Не постоји златни стандард међу дијагностичким методама лајмске неуроборелиозе ни код одраслих ни код дјеце [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 антитијела иницијално користећи скрининг тест (*enzyme-linked immunoassay-* ELISA) и уколико је он позитиван или неодређен ради се потврдни *Immunoblot* тест [4,8,16,17,20,22,23].

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

У случају ране лајмске борелиозе, борелија специфична IgM антитијела се могу детектовати од треће седмице, а IgG антитијела 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 неопстојање златног стандарда и немогућност поуздане корелације између резултата серолошких тестова и клиничког стања пацијента [22].

Мјерљив одговор антитијела може бити одсутан у раној, локализованој манифестацији болести (*erythema migrans*) [8,21,25]. Такође, мјерљив хуморални имунитет одговор може изостати и у случају веома ране антибиотске терапије. Могући 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 \cite{20}. \textit{IgM} антитијелима може недостајати специфичност и могу бити позитивна у случају укрштене реакције са другим спирохетама, \textit{EBV, CMV, HIV} и аутоантитијелима \cite{24}. Висока концентрација \textit{IgG} антитијела се обично налази код касних манифестација\cite{8,16,20}. Извођење серолошког теста на четири недеље код пацијената са реинфекцијом може помоћи у откривању повећаних нивоа \textit{IgG} \cite{20}.

Изостанак детекције антитијела у великој мјери искључује лајмску борелиозу код пацијената са очуваним имунитетом и продуженом болести \cite{8}. Сама серопозитивност није довољна да се постави дијагноза лајмске борелиозе \cite{20}. Детекција \textit{IgM} и/или \textit{IgG} антитијела сама за себе није потврда болести изазване борелијом \cite{8}. Антитијела као одговор на инфекцију са борелијом могу да остану у цереброспиналној течности неколико недеља или у серуму неколико година \cite{2,25}. Серологија није адекватна за мониторинг резултата антибиотичке терапије лајмске борелиозе и не препоручује се у ту сврху \cite{8,20}. Успјех лијечења треба процјенити на основу клиничких знакова и симптома \cite{20}. Висок ниво антитијела може да буде код лијечених пацијената и неколико година након опоравка \cite{6,16,20}. Позитиван серолошки резултат не разликује активну инфекцију од серолошког ожиљка \cite{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 \cite{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 антибиотичкој терапији али и изостанку лијечења у случају лажно негативних резултата \cite{22}. Дуготрајно перзистирање антитијела након инфекције са борелиjom и висока серопреваленца у здравој популацији у ендемском подручју може такође утицати на клиничку дијагнозу јер може бити компликовано разликовати активну од претходне инфекције \cite{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 антитијела могу перзистирати неколико година након тога [23]. Преваленца борелија специфичних антитијела у популацији може бити изnad 20% у неким подручјима, позитивни резултати не значе увијек и активну болест [24].

6. 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 дисеминована 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 она 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, p4I)
- 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 макрофага, 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 сугеришео да је детекција CXCL13 у ЦСТ користан маркер у дијагностици ране лајмске неуроборелиозе, чак и прије специфичног одговора антитијела, 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 демијелинизационим лезијама, не у инактивним), ХИВ инфекцијом, неurosифилисом, 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 детektovati и у другим манифестацијама лајмске борелиозе: пацијенти са борелијским лимфоцитом такође имају у серуму високе нивое CXCL13. У неким другим неуролошких манифестацијама лајмске борелиозе CXCL13 тест је негативан. Лајмску енцефалопатију, коју је тешко детектори, карактеришу неспецифичне неуробижевиоралне 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 senso lato ДНК PCR методом је кориснија у дијагностици лајмске борелиозе из узорака кожних 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].

6. 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 контаминарана 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 антитијела у серуму (серологија може бити негативна у веома раној фази болести)
- Анализа ЦСТ није рађена/ није рађена лумбална пункција
- Искућивање 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 антитијела (позитivan IgG и/или IgM индекс антитијела) у ЦСТ или позитивна култура или PCR у ЦСТ [8,16].

За ране дисеминоване манифестације са неуролошким симптомима у року од шест недјеља након убеда крапља (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]. Просјечен 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 борелизом обично је нормалан [9]. Због своје сензитивности и специфичности, магнетна резонанца (MR) се може сматрати бољом у погледу визуализације лезија у току лајмске неуроборелиозе и у првих неколико недеља могу се видјети хиперинтензне лезије на MR прегледу, а на позитронској емисионој томографији (ПЕТ) може бити идентификован благи до умјерен хипометаболизам [2]. Неурорадиолошка дијагностика не може искључити лајмску неуроборелизу или замијенити лумбалну пункцију [40], а ниједна радиолошка лезија не указује са сигурношћу на лајмску борелизну [20]. Нема контролисаних студија за дијагностички значај MR у дијагностици лајмске неуроборелиозе. У већини случајева ране лајмске неуроборелиозе не очекују се значајне промјене због ријетке захваћености мозга и кичмене мождине, а MR 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 поузdana 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 осjetљивост 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 параметрама крви (гликемија, аспартат аминотрансфераза, аланин аминотрансфераза, C-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. Одређити 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

Спроведено 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 убуду крпеља или постојању erythema migrans, неуролошки и остали симптоми које је испитник навео
приликом пријема у болницу, коморбидитети, трајање симптома до пријема у болницу, претходна терапија антибиотицима 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 параметаре крви (гликемија, аспартат аминотрансфераза, аланин аминотрансфераза, C- 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 убоду крпеља и постојању erythema migrans, неуролошки и остали симптоми које је испитник навео приликом пријема у болницу, коморбидитети, трајање симптома
до пријема у болницу, претходна терапија антибиотицима 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, C-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

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

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 микроbióлошког 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

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

У Завод за микробиологију УКЦ РС се достављао други узети милилитар узорака наведене цереброспиналне течности који су, због сакупљања узорака, замрзнути на -20\(^\circ\)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 Mediziniche 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) изnad 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 Mediziniche Labordiagnostik AG Lubeck, Germany).
• **ELISA** концентрација хемокина **CXCL13** у цереброспиналној течности **Euroimmun** тестом **CXCL13 ELISA** (**EUROIMMUN Analyzer I-2, EUROIMMUN Mediziniche Labordiagnostik AG Lubeck, Germany**). Према упутама произвођача нормалне вриједности концентрације хемокина **CXCL13** у цереброспиналној течности су <20 pg/ml, граничне вриједности од ≥20 до <30 pg/ml, повишене од ≥30 до <100 pg/ml а изразито повишене >100 pg/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 смјesa 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 реагенаса је урађена на сљедећи начин:

- У тубе за узорке и тубу за контролни узорак је додано 30µl припремљене интерне контроле. Сљедећи корак је био додавање по 200µl цереброспиналне течности у обилежене 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. После једине инкубације 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. Сљедећи корак је било уклањање супернатанта без додиривања талога на дну тубе.
- Након овог додатно је по 500µl пуфера за испирање 1 у сваку епрувету. Након мјешања на вортексу у трајању 10–15 секунди тубе су центрифугиране на 13 000 обртаја (rpm) у трајању од 2 минуте. Без мјешања 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 мјешања 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 ресуспендије. Услиједила је инкубација у термалном шејкеру на 65°C и 1300 обртаја (rpm) у трајању од 5 минута. Потом су тубе центрифугирани на 13 000 обртаја (rpm)/ 1 минуту. 

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

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

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., AO Vector-Best, Новосибирск, Русија).
Тест је дизајниран за детекцију *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex (B. afzelii, B. garinii, B. burgdorferi sensu stricto). Коришћена је интерна контрола која је укључена у кит за процјену реакције умножавања, праћење присуства инхибитора, те за процјену ефикасности 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 центрифугирани 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 1 и 2 минуте, након чега је слиједила иницијална денатурација ДНК у времену од 2 минуте на 95°C, након чега је слиједило 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 праговног циклуса су изведени помоћу *Mx3005P* програма на апарату *Stratagene Mx3005P* (*Agilent Technologies*) ( слика 5.).
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 обухвата 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 удео испитаника женског пола у односу на испитанике мушког пола (слика 6.).

Слика 6. Полна дистрибуција испитаника
Анализом структуре испитника по доби уочава се да је највише испитника 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 $Sx$ – 3.89
Коефицијент варијације $Vk$ – 27.9

Жене
Просјек година $X_{sr}$ – 52.32
Стандардна девијација $SD$ – 15.4
Стандардна грешка $Sx$ – 2.64
Коефицијент варијације $Vk$ – 29.43

Слика 7. Старосна дистрибуција испитника
Највише су заступљени пензионери, којих је било 16. Затим по заступљености занимања испитаника слиједе пољопривредници и медицински техничари. Остала занимања која су забиљежена су шумски радници, студенти, трговци, фризери и домаћице (слика 8.).

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.).
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 (EM)
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, офталмологске 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 пацјената и редом на бол у зглобовима, кардиологијске 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 неурологијске 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%).

<table>
<thead>
<tr>
<th>Елеменат крвне слике</th>
<th>Референтне вриједности</th>
<th>Просјечна вриједност узорка</th>
<th>Стандардна грешка ар. средине [%]</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>еритроцити</td>
<td>3.86 - 5.08 x10¹²</td>
<td>4.540</td>
<td>0.070</td>
</tr>
<tr>
<td>хемоглобин</td>
<td>119 - 157 g/L</td>
<td>131.771</td>
<td>2.242</td>
</tr>
<tr>
<td>хематокрит</td>
<td>0.36 - 0.47 l/l</td>
<td>0.402</td>
<td>0.006</td>
</tr>
<tr>
<td>леукоцити</td>
<td>3.4 - 9.7x10⁹/l</td>
<td>7.560</td>
<td>0.411</td>
</tr>
<tr>
<td>неутрофили</td>
<td>44.0 - 72.0%</td>
<td>62.956</td>
<td>2.272</td>
</tr>
<tr>
<td>еозинофили</td>
<td>0.0 - 7.0%</td>
<td>4.920</td>
<td>2.159</td>
</tr>
<tr>
<td>базофили</td>
<td>0.0 - 1.0%</td>
<td>0.380</td>
<td>0.060</td>
</tr>
<tr>
<td>моноцити</td>
<td>2.0 - 12.0%</td>
<td><strong>13.864</strong></td>
<td>3.868</td>
</tr>
<tr>
<td>лимфоцити</td>
<td>20.0 - 46.0%</td>
<td>29.855</td>
<td>5.322</td>
</tr>
<tr>
<td>тромбоцити</td>
<td>158 - 424 x10⁹/l</td>
<td>247.272</td>
<td>11.527</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Лабораторијска характеристика налаза</th>
<th>Референтне вриједности</th>
<th>Просјечна вриједност узорка</th>
<th>Стандардна грешка ар. средине [%]</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>ŠUK - гликемија</td>
<td>4.1 - 5.9 mmol/l</td>
<td><strong>6.070</strong></td>
<td>0.222</td>
</tr>
<tr>
<td>AST - аспартат аминотрансфераза</td>
<td>0 - 35 U/L</td>
<td>24.711</td>
<td>2.021</td>
</tr>
<tr>
<td>ALT - аланин аминотрансфераза</td>
<td>0 - 35U/L</td>
<td>26.632</td>
<td>2.636</td>
</tr>
<tr>
<td>CRP - C-реактивни протеин</td>
<td>0 - 5mg/L</td>
<td><strong>5.869</strong></td>
<td>1.659</td>
</tr>
</tbody>
</table>
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 полимофронуклеара код испитаника са плеоцитозом у цереброспиналној течности.

Слика 16. Однос мононуклеара и полиморфонуклеара у ЦСТ
На сликама 17. и 18. се види да је хиперпротеинорахију (повишене вриједности протеина у цереброспиналној течности) имало 19 (37.25%) наших испитника 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 антитијела (слика 20).

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

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

Слика 21. ELISA серум anti Borrelia burgdorferi (BB) IgM (U/ml) позитивне вриједности груписане према висини титра
Код 39 испитника (76.47%) су у серуму била позитивна anti Borrelia burgdorferi IgG антитијела ELISA тестом (слика 22.).

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

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

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 антитијела у цереброспиналној течности за седам наших испитаника који су ELISA тестом у цереброспиналној течности имали позитивна anti Borrelia burgdorferi IgM антитијела.

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.

На слици 29. је приказано која антитијела 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.
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 антитијела 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 антитијела 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 (тabela 7.) уочава се јака веза резултата ELISA anti *Borrelia burgdorferi* IgM у серуму и у цереброспиналној течности (*ρ*=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 (*ρ*=0,787, *p*<0,001).

Табела 7. Корелација резултата серолошких тестова

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>ELISA serum anti BB IgM</th>
<th>ELISA ЦСТ anti BB IgM</th>
<th>ELISA serum anti BB IgG</th>
<th>ELISA ЦСТ anti BB IgG</th>
<th>Immunoblot anti BB IgG</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Immunoblot anti BB IgM</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>коef. кор.</td>
<td>.447**</td>
<td>.478*</td>
<td>.112</td>
<td>.181</td>
<td>0.000</td>
</tr>
<tr>
<td><em>p</em></td>
<td>.009</td>
<td>.010</td>
<td>.534</td>
<td>.357</td>
<td>1.000</td>
</tr>
<tr>
<td>N</td>
<td>33</td>
<td>28</td>
<td>33</td>
<td>28</td>
<td>32</td>
</tr>
<tr>
<td>ELISA serum anti BB IgM</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>коef. кор.</td>
<td>.802**</td>
<td>-.206</td>
<td>.050</td>
<td>-.029</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td><em>p</em></td>
<td>.000</td>
<td>.147</td>
<td>.750</td>
<td>.877</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>N</td>
<td>44</td>
<td>51</td>
<td>44</td>
<td>44</td>
<td>32</td>
</tr>
<tr>
<td>ELISA ЦСТ anti BB IgM</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>коef. кор.</td>
<td>-.242</td>
<td>.102</td>
<td>-.120</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td><em>p</em></td>
<td>.114</td>
<td>.510</td>
<td>.552</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>N</td>
<td>44</td>
<td>44</td>
<td>27</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>ELISA serum anti BB IgG</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>коef. кор.</td>
<td>.463**</td>
<td>.787**</td>
<td>.002</td>
<td>.000</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td><em>p</em></td>
<td>.002</td>
<td>.000</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>N</td>
<td>44</td>
<td>32</td>
<td>27</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>ELISA ЦСТ anti BB IgG</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>коef. кор.</td>
<td>.433*</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td><em>p</em></td>
<td>.024</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>N</td>
<td></td>
<td></td>
<td>27</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>
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)

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>ELISA ЦСТ anti BB IgG</th>
<th>ELISA ЦСТ anti BB IgM</th>
<th>ELISA serum anti BB IgG</th>
<th>ELISA serum anti BB IgM</th>
<th>Immunoblot anti BB IgG</th>
<th>Immunoblot anti BB IgM</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>ELISA серум anti BB IgG</td>
<td>.778</td>
<td>.296</td>
<td>.231</td>
<td>.467</td>
<td>.978</td>
<td>.978</td>
</tr>
<tr>
<td>ELISA ЦСТ anti BB IgG</td>
<td>.421</td>
<td>.333</td>
<td>.455</td>
<td>.757</td>
<td>.286</td>
<td>.286</td>
</tr>
<tr>
<td>ELISA серум anti BB IgM</td>
<td>.889</td>
<td>.615</td>
<td>.222</td>
<td>.222</td>
<td>.452</td>
<td>.452</td>
</tr>
<tr>
<td>ELISA ЦСТ anti BB IgM</td>
<td></td>
<td></td>
<td>.500</td>
<td>.500</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Immunoblot anti BB IgM</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>
Иако постоје неке статистички значајне везе, коефицијент корелације између поједина клиничких манифестација и антитијела на поједине специфичне антитивене 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 антитивене B. burgdorferi

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>p41</th>
<th>OspC</th>
<th>p39</th>
<th>VlsE Ba, Bb</th>
<th>VlsE Ba, Bg</th>
<th>VlsE Bb</th>
<th>p83</th>
<th>p58</th>
<th>p18</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>трињење и слабост екстримитета коef. кор. N</td>
<td>-.207</td>
<td>.091</td>
<td>-.406**</td>
<td>-.207</td>
<td>.137</td>
<td>-.081</td>
<td>.096</td>
<td>-.342*</td>
<td>-.011</td>
</tr>
<tr>
<td>p</td>
<td>.145</td>
<td>.524</td>
<td>.003</td>
<td>.145</td>
<td>.339</td>
<td>.572</td>
<td>.504</td>
<td>.014</td>
<td>.941</td>
</tr>
<tr>
<td>коеф. кор.  N</td>
<td>.169</td>
<td>.109</td>
<td>.267</td>
<td>.169</td>
<td>-.143</td>
<td>-.286*</td>
<td>-.100</td>
<td>.217</td>
<td>.000</td>
</tr>
<tr>
<td>главобоља коef. кор. N</td>
<td>.236</td>
<td>.446</td>
<td>.058</td>
<td>.236</td>
<td>.317</td>
<td>.042</td>
<td>.485</td>
<td>.125</td>
<td>1.000</td>
</tr>
<tr>
<td>очи-сметње коef. кор. N</td>
<td>-.215</td>
<td>-.271</td>
<td>-.129</td>
<td>-.215</td>
<td>-.118</td>
<td>.114</td>
<td>-.083</td>
<td>-.360**</td>
<td>-.146</td>
</tr>
<tr>
<td>коеф. кор. N</td>
<td>.130</td>
<td>.055</td>
<td>.369</td>
<td>.130</td>
<td>.409</td>
<td>.427</td>
<td>.564</td>
<td>.010</td>
<td>.306</td>
</tr>
<tr>
<td>вртоглавица коef. кор. N</td>
<td>.477**</td>
<td>.264</td>
<td>.298*</td>
<td>.245</td>
<td>-.081</td>
<td>.213</td>
<td>.355*</td>
<td>.521**</td>
<td>.142</td>
</tr>
<tr>
<td>коеф. кор. N</td>
<td>.000</td>
<td>.061</td>
<td>.034</td>
<td>.083</td>
<td>.574</td>
<td>.133</td>
<td>.011</td>
<td>.000</td>
<td>.319</td>
</tr>
<tr>
<td>свијест-поремећај коef. кор. N</td>
<td>-.096</td>
<td>.248</td>
<td>-.126</td>
<td>-.096</td>
<td>-.059</td>
<td>-.059</td>
<td>-.041</td>
<td>-.016</td>
<td>-.073</td>
</tr>
<tr>
<td>коеф. кор. N</td>
<td>.503</td>
<td>.080</td>
<td>.379</td>
<td>.503</td>
<td>.681</td>
<td>.681</td>
<td>.774</td>
<td>.911</td>
<td>.611</td>
</tr>
<tr>
<td>говор-поремећај коef. кор. N</td>
<td>-.244</td>
<td>-.135</td>
<td>-.126</td>
<td>-.244</td>
<td>-.059</td>
<td>-.059</td>
<td>-.041</td>
<td>-.179</td>
<td>-.073</td>
</tr>
<tr>
<td>коеф. кор. N</td>
<td>.084</td>
<td>.345</td>
<td>.379</td>
<td>.084</td>
<td>.681</td>
<td>.681</td>
<td>.774</td>
<td>.208</td>
<td>.611</td>
</tr>
<tr>
<td>нервоза коef. кор. N</td>
<td>.241</td>
<td>.171</td>
<td>.191</td>
<td>.241</td>
<td>-.041</td>
<td>-.041</td>
<td>-.029</td>
<td>-.102</td>
<td>-.051</td>
</tr>
<tr>
<td>крстачна бол уз отежано мокрење коef. кор. N</td>
<td>.129</td>
<td>-.116</td>
<td>.121</td>
<td>.129</td>
<td>-.051</td>
<td>-.051</td>
<td>-.035</td>
<td>-.154</td>
<td>-.063</td>
</tr>
<tr>
<td>коеф. кор. N</td>
<td>.365</td>
<td>.419</td>
<td>.396</td>
<td>.365</td>
<td>.725</td>
<td>.725</td>
<td>.805</td>
<td>.281</td>
<td>.663</td>
</tr>
</tbody>
</table>
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 испитника у узорцима цереброспиналне течности након екстракције ДНК.

Слика 34. Резултат *RT PCR* методе за детекцију *Borrelia burgdorferi sensu lato complex* (а,б) Слика *Borrelia burgdorferi* амплификације: амплификациони 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
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 \[4,5,9,14,15,41\]. Поchetак неуроборелиозе је најчешће субакутан са прогресијом током недеља \[42\]. Идентификовање ране лајмске борелиозе је од виталног значаја за хитан третман како би се спријечило погоршавање и прелазак у касне манифестације болести када је опоравак спорији и може бити непотпуни \[12,14,41\]. 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 неурологије \(European Federation of the Neurological Societies - EFNS\) када је у питању дијагноза лајмске неуроборелиозе. Док смјернице Европске федерације неурологије 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 \textit{CXCL13} у цереброспиналној течности \[44\]. Идентификација нових биомаркера за активну инфекцију борелијом представљала би велики напредак у дијагностици и праћењу лајмсke 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 литератури 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 експонирane 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 литературе наведено може бити последица разлика у активностима у слободно вријеме односно разлике у експонираности инфекцији као и могуће разлике у осjetљивости 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, фризери 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 убод крпеља, а већина осталих, њих 64.71%, није могла да се сјети убода крпеља нити да га изричито негира. Уколико се угриз догоди 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 процент 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 можебити 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 послије 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, нистагкус, панувентис, 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 радикуллитис (бол у леђима сам или у комбинацији са истицањем бола у екстремитетете 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 испитника су доминирале манифестације периферног нервног система које према литератури укључују кранијалне неуропатије, радикулонеуритис и друге облике захваћања 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]. Двije трећине наших испитника 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 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 кожних 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 вестibuлоокзларног 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 испитника, 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 недеље, 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 иззваног борелијом. Крстачни бол са отежаним мокрењем су имала три наша испитанка. 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 бешке. 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]. Радикалтивис се, код наших испитника, 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 једностраним слабошћу руку или ногу што се у почетку погрешно може протумачити као мождани удар.


Могуће је да су пацијенти са офтальмошким тегобама као и са парезом n. facialis испитивани на другим одјећењима, 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 вили 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 имали парализу и посљедично једне 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. Податак о главобољи је дало 17 наших испитаника.

Касна неуроборелиоза је присуство континуираних активних болести која траје дуже од шест мјесеци, а симптоме карактеристичну хронични менингитис, прогресивни енцефалитис, мијелитис или енцефаломијелитис и церебрални васкулитис. Једна трећина наших испитаника, од оних који су навели било главобоље или енцефалитис или мијелитис или енцефаломијелитис код лајмске неуроборелиозе може да имитира хроничну прогредију мултиплу склерозу. Мијелитис и енцефалитис су ријетке клиничке манифестације касне лајмске неуроборелиозе. Типичне манифестације трансверзалног мијелитиса укључују билиateralну (често несиметричну) или једнострану слабост екстремитета, сензорне поремећаје и поремећај аутономног нервног система испод захваћеног нивоа кичмене мождине. 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. Церебрални васкулитис и симптоми слични можданом удару су пријављени код младих особа без икаквих основних фактора ризика за мождан удар; ови пацијенти обично имају лошије дугорочне исходе у поређењу са типичним пацијентима са можавим ударом. Главобоља, мучнина, малаксалост и повраћање, вјероватно знаци хроничног менингитиса, могу бити повезани са секундарном деменцијом и хроничном лајмском неуроборелиозом. Хронична периферна неуропатија је могућа касна манифестација лајмске неуроборелиозе која се често повезује са ACA. Док неки пацијенти са периферном неуропатијом показују доказе о захваћености менингеа, преглед цереброспиналне течности је често неуспадљив када је лајмска неуроборелиоза ограничена на периферни нервни систем. Стога се може претпоставити да је код периферне лајмске неуропатије развој специфичног имуног одговара за борелију у цереброспиналној течности процес који зависи од времена.
Периферна неуропатија генерално је уобичајен неуролошки поремећaj 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, а утиче на лошије исходе инфекције са борелијом. Иако остаје још доста да би се утврдили механизми помоћу којих хипергликемија ремети имунни 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, C- реактивни протеин) које су рађене у Заводу за клиничку лабораторијску дијагностику УКЦ РС. Просјечне вриједности наведених параметара су биле у референтним вриједностима изузев незнатно више просјечне вриједности моноцита у диференцијалној крвној слици (13.86%) и просјечне вриједности гликемије (6.07) и C-реактивног протеина (5.87) које су биле незнатно изnad горње границе. И у литератури се наводи да су параметри комплетне крвне слике, јетрене функције и C-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 испитника, 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 испитника 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 антитиљела на борелију без плеоцитозе у цереброспиналној течности посљедица претходне неуроборелиозе. Други аутори приписују одсуство плеоцитозе у неким случајевима продуженој болести. Супротно томе, неки аутори су сугерирали да недостатак повећаног броја ћелија у цереброспиналној течности може бити повезан са кратком дужином трајања болести у неким случајевима \[42\]. Наши испитници нису били подвргнути другој лумбалној пункцији. Вриједности протеина у цереброспиналној течности су биле повишене код 19 (37.3%) наших испитника и кретале су се у распону од 0.48 до 3.6 g/L код једног нашег испитника. Вриједности шећера у цереброспиналној течности су код већине наших испитника биле у референтним вриједностима а незнатно снижени код њих девет. И у литератури се наводи да је најчешћа абнормалност цереброспиналне течности благо повишени протени 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 \[12\].

64
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 клинилком сликом уз позитивне серолошке тестове потврђене Immunoblot тестом. И према литературе, 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 захтева лабораторијско тестирање док дијагноза лајмске неуроборелиозе подразумијева анализу цереброспиналне течности и одређивање серумских антитијела 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 потврдни 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 пацијената, ELISA серум anti Borrelia burgdorferi IgM тест је био позитиван код њих 13, a IgG код њих 38; ELISA цереброспинална течност anti Borrelia burgdorferi IgM је био позитиван код седам испитника, 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 испитника, 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 испитника у серуму су била присутна и IgG и IgM позитивна антитијела, а у цереброспиналној течности код њих четири. Анализом корелације резултата појединих серолошких тестова наших испитника уочена је јака веза резултата ELISA anti Borrelia burgdorferi IgM у серуму и у цереброспиналној течности (\(p=0.802, p<0.001\)). 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 плечитозом, њих двоје је имало позитивна и *IgM* и *IgG* антитијела *ELISA* тестом и у серуму и у цереброспиналној течности и на потврдном *Immunoblot* тесту; четири испитанника су имала позитивна само *IgG* антитијела *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 испитанника позитивна само *IgG* антитијела *ELISA* тестом и у серуму и од њих два и на потврдном *Immunoblot* тесту, а за два нисмо имали података.

Позитивни резултати теста не доводе у вијек до дијагнозе лајмске борелиозе, а негативни тестови не искључују дефинитивно дијагнозу, неинфекциране људи могу имати имунитет и тест је позитиван, док инфицирани људи могу имати кашњење у одговору антитијела 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, лецкоцити се ријетко налазе, а титар *IgG* може остати повишен [46]. *IgM* антитијела у серуму имају ограничену дијагностичку вриједност за дијагнозу лајмске неуруборелиозе [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* антитијела се могу детектовати од треће седмице, а *IgG* антитијела 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 антитијела [47, 55]. Специфична интратекална производња *IgG* се може открити тек након шест до осам недеља 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. Антитијела 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 аутоимунних 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 познање 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 нашем 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-
Велика варијација у нивоу CXCL13 у цереброспиналној течности примјећена 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 (инфекцивна, инфламаторна, неопластична) такође могу изазвати повећане ниво ове CXCL13, укључујући неуросифилис, туберкулозни менингитис, HIV 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 неурборелиозом имали негативан CXCL13, али у многим радовима наилазимо и на податке да европски пацијенти са Банвартовим синдромом обично имају високе ниво ентеовирус, херпес симплекс вирус, 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]. Тестирање цереброспиналне течности укључујући CXCL13, може бити информативно за лајмску борелиозу централног нервног система, али не и за периферни нервни систем где је откривена неосјетљивост CXCL13 у цереброспиналној течности. 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 антибиотичке терapiје [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 \(CXCL13\) \[31\]. Наш узорци су имали само један циклус 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 квантifikацију \(Borrelia burgdorferi\ sensu lato complex\) 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 сврhu евалуације генотипа \(Borrelia\)

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 можданој маси. У литератури су, код обољелих од лајмске неуроборелиозе радиолошки пријављене различите лезије у бијелој можданој 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 анибиотске 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 дијагностичи лајмске неуроборелиозе.
9. Osjetljivost RT PCR u cerebrospinalnoj tčnosti kod oboljelih sa sumnjom na lajsku neuroboreliozu je veoma niska i nije od velikog značaja u dijagnošći, te nemao osnovu da se radi rutinski.

10. Potešnene su dodatne prospektivne studije za slobodne dijagnostičke testove u cilju unapređenja dijagnošće lajske neuroborelioze i razlikovanja aktivne od inaktivne forme lajske neuroborelioze kao i od drugih bolesti sa slicnim kliničkim manifestacijama.
8. ЛИТЕРАТУРА


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.
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.
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
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

[Подпис]
Изјава 3

Изјава о идентичности штампана 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 Корач

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

[Подпис]