



UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET



**Faktori rizika za infestiranje krpeljima i obolevanje od lajmske borelioze u
Južnobačkom okrugu i dijagnostika u ranoj fazi bolesti**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Prof. dr Gordana Smieško

Kandidat:

Asist. dr med. Pavle Banović

Novi Sad, 2022. godine

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ОБРАЗАЦ – 5а

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ НОВИ САД

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	др мед. Павле Бановић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	проф. др мед. Гордана Смиешко ванредни професор Медицински факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду
Наслов рада:	Фактори ризика за инфестирање крпељима и оболевање од лајмске борелиозе у Јужнобачком округу и дијагностика у раној фази болести
Језик публикације (писмо):	Српски (латиница)
Физички опис рада:	Унети број: Страница 118 Поглавља 9 Референци 187 Табела 0 Слика 5 Графикона 18 Прилога 0
Научна област:	Медицинске науке

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штапане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штапаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

Ужа научна област (научна дисциплина):	Медицинска микробиологија
Кључне речи / предметна одредница:	лајмска болест; лајмска неуроборелиоза; крпељи; Борелија бургдорфери; серолошки тестови; предиктивна вредност тестова; демографија; фактори ризика; рана дијагноза
Резиме на језику рада:	<p>Лајмска борелиоза је најчешћа болест преносива крпељима у Србији и другим земљама Европе. Упркос напорима да се побољша контрола лајмске борелиозе, у последњим деценијама ова зооноза је и даље најрапрострањенија болест коју преносе артропode у великом броју региона северне хемисфере. Рачунање инциденце лајмске борелиозе на тлу Европе представља изазов, с обзиром да у више земаља лајм борелиоза не подлеже пријављивању, што је и случај у Р. Србији у последњих неколико година. Сматра се да ће лајмска борелиоза постати све релевантнији здравствени ризик у блиској будућности због сложених интеракција између различитих услова спољашње средине и социоекономских фактора, који ће утицати на различите аспекте епидемиологије болести, као и екологије резевоара и вектора борелија.</p> <p>Клиничке манифестације лајмске борелозе представљају јасно дефинисане симптоме и знакове од којих су многи пролазни, услед чега може доћи до развоја хроничних и тешких, напредујућих и неповратних промена услед неблаговременог реаговања. Учињени су значајни напори у циљу стандардизације дијагностичких протокола лајмске борелиозе на тлу Европе. Услед нестандардизованог третмана пацијената инфестораних крпељима у Републици Србији, присутан је двоструки ризик: да је упитна валидност многих дијагноза лајмске борелиозе постављених на основу позитивних лабораторијских налаза и нејасне клиничке слике у протеклим годинама, као и могућност да постоје оболели пацијенти код којих није благовремено доказана лајмска борелиоза услед негативних лабораторијских налаза.</p> <p>Циљеви истраживања су утврђивање ефеката демографских карактеристика пацијенатаи ефекат годишњег доба на излагање убуду крпеља и оболевање од ране фазе лајмске борелиозе, као и испитивање позитивне и негативне предиктивне вредности серолошких и молекуларних скрининг тестова у дијагностици ране фазе лајмске борелиозе код особа које је инфестирао крпељ наспрам физикалног прегледа као златног стандарда за постављање дијагнозе. Резултати овог истраживања указују на то да:</p>

	<p>Старосне категорије деце и одраслих су чешће излагане нападима крпеља и могу се сматрати ризичним категоријама наспрам адолесцената и старијих особа за инфестацију крпељима.</p> <p>Старост не представља фактор ризика за оболевање од ране фазе лајмске борелиозе. Као годишње доба са највећим ризиком за инфестацију крпељима идентификовано је пролеће. Месеци са највећим ризиком за оболевање од ране фазе лајмске борелиозе су мај, јун и јул.</p> <p>Тип насеља у коме особа живи не представља фактор ризика за излагање крпељима и оболевање од ране фазе лајмске борелиозе код становништва Јужнобачког округа.</p> <p>Позитивна предиктивна вредност серолошких скрининг тестова у дијагностици прве фазе лајмске борелиозе код особа инфестираних крпељима је ниска и не треба се користити као замена за физикални преглед који је златни стандард.</p> <p>Негативна предиктивна вредност серолошких скрининг тестова код становника Јужнобачког округа особа инфестираних крпељима је висока. Серолошки скрининг тестови могу имати користи приликом диференцијално-дијагностичког отписивања могућег оболевања од ране фазе лајмске борелиозе код становника Јужнобачког округа.</p> <p>Позитивна предиктивна вредност молекуларних скрининг тестова крпеља на присуство ДНК <i>B. burgdorferi</i> s. l. у дијагностици ране фазе лајм борелиозе је виша од позитивних предиктивних вредности серолошких скрининг тестова, али недовољно висока да би се анализа могла користити као замена за физикални преглед који је златни стандард.</p> <p>Негативна предиктивна вредност молекуларних скрининг тестова крпеља на присуство ДНК <i>B. burgdorferi</i> s. l. у дијагностици ране фазе лајмске борелиозе је виша од негативних предиктивних вредности серолошких скрининг тестова и може се користити током диференцијално-дијагностичког отписивања могућег оболевања од ране фазе лајмске борелиозе.</p>
<p>Датум прихватања теме од стране надлежног већа:</p>	<p>23.03.2021.</p>

Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	
Напомена:	

UNIVERSITY OF NOVI SAD**FACULTY OF MEDICINE****KEY WORD DOCUMENTATION²**

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Pavle Banović MD
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Gordana Smieško MD, PhD, associate professor Faculty of Medicine, University of Novi Sad
Thesis title:	Early-stage diagnosis and risk factors for tick infestation and development of Lyme borreliosis in residents of South Bačka District
Language of text (script):	Serbian language (latin script)
Physical description:	Number of: Pages 118 Chapters 9 References 187 Tables 0 Illustrations 5 Graphs 18 Appendices 0
Scientific field:	Medical sciences
Scientific subfield (scientific discipline):	Medical microbiology

² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 – Statement on the authority,

5B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

Subject, Key words:	Lyme Disease; Lyme Neuroborreliosis; Ticks; <i>Borrelia burgdorferi</i> ; Serologic Tests; Predictive Value of Tests; Demography; Risk Factors; Early Diagnosis
Abstract in English language:	<p>Lyme borreliosis is the most common tick-borne disease in Serbia and other European countries. Despite efforts to improve control of Lyme borreliosis, in recent decades this zoonosis has remained the most widespread disease transmitted by arthropods in many regions of the northern hemisphere. Calculating the incidence of Lyme borreliosis in Europe is a challenge, given that in several countries Lyme borreliosis is not subject to reporting, which is the case in the Republic of Serbia in the last few years.</p> <p>Lyme borreliosis is thought to become an increasingly relevant health risk in the near future due to complex interactions between different environmental conditions and socioeconomic factors, which will affect different aspects of the disease epidemiology, as well as the ecology of reservoirs and <i>Borrelia</i> vectors.</p> <p>Clinical manifestations of Lyme borreliosis are clearly defined symptoms and signs, many of which are transient, which can lead to the development of chronic and severe, progressive and irreversible changes due to untimely response. Significant efforts have been made to standardize diagnostic protocols for Lyme borreliosis in Europe. Given that management of Lyme borreliosis in the Republic of Serbia is non-standardized, there is a double risk: that the validity of many diagnoses of Lyme borreliosis positive laboratory findings and unclear clinical picture in recent years, as well as the possibility that there are patients in whom Lyme borreliosis has not been proven in a timely manner due to negative laboratory findings.</p> <p>The objectives of the study are to determine the effects of demographic characteristics of patients and the effect of the season on exposure to tick bites and early stage Lyme borreliosis, as well as to examine the positive and negative predictive value of serological and molecular screening tests in diagnosing early stage Lyme borreliosis in infected individuals. compared to physical examination of the patient as the current gold standard for diagnosis. The results of this research indicate that:</p> <p>Age categories of children and adults are more often exposed to tick infestation and can be considered risk categories compared to adolescents and the elderly for tick infestation.</p> <p>Age is not a risk factor for early-stage Lyme borreliosis. Spring has been identified as the season with the highest risk of tick</p>

	<p>infestation. The months with the highest risk of developing early-stage Lyme borreliosis are May, June and July.</p> <p>The type of settlement in which a person lives is not a risk factor for tick exposure and early stage Lyme borreliosis in the population of South-Bačka District.</p> <p>The positive predictive value of serological screening tests in the diagnosis of the first phase of Lyme borreliosis in persons infested with ticks is low and should not be used as a substitute for physical examination, which is the current gold standard.</p> <p>The negative predictive value of serological screening tests in the South-Bačka District residents infested with ticks is high. Serological skinning tests can be useful in the differential diagnostic ruling out of possible Lyme borreliosis.</p> <p>Positive predictive value of tick molecular screening tests for the presence of <i>B. burgdorferi</i> s. l. DNA in the diagnosis of early stage Lyme borreliosis is higher than the positive predictive values of serological screening tests, but not high enough for the analysis to be used as a substitute for physical examination, which is the gold standard.</p> <p>Negative predictive value of tick molecular screening tests for the presence of <i>B. burgdorferi</i> s. l. DNA in the diagnosis of the early phase of Lyme borreliosis is higher than the negative predictive values of serological screening tests and can be used during the differential diagnostic ruling out of possible Lyme borreliosis.</p>
Accepted on Scientific Board on:	23.03.2021.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	
Note:	

ZAHVALNICA

Zahvaljujem svima koji su pomogli da ovaj doktorat ugleda svetlost dana.

Mene, ako se sete za Dan bezbednosti, sete se.

Ako se ne sete – nikom ništa.

To je bila moja dužnost, da radim.

Najveće zadovoljstvo biće mi misao da sam jednog čoveka izveo na pravi put.

Ilija Čvorović, „Balkanski špijun” (Dušan Kovačević)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 <i>Borrelia burgdorferi</i> i lajmska borelioza – otkriće i istorijat	1
1.2 <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato complex	6
1.3 Rezervoari borelija sensu lato kompleksa	10
1.4 Vektori borelija sensu lato kompleksa	12
1.5 Ukrštanje tri sveta: krpelj, borelija i čovek – koncept <i>jednog zdravlja</i>	20
1.6 Faktori rizika za kontakt čoveka sa krpeljima	23
1.7 Demografske karakteristike kao faktori rizika za obolevanje od lajmske borelioze ..	26
1.8 Patogeneza lajmske borelioze	27
1.9 Faze lajmske borelioze	29
1.9.1 Rana (I) faza lajmske borelioze (migratorni eritem)	29
1.9.2 Faza II lajmske borelioze (multipli migratorni eritem, borelijski limfocitom, rana neuroborelioza, lajmski karditis)	33
1.9.3 Kasna (III) faza lajmske borelioze (lajmski artritis, hronični atrofični akrodermatitis, kasna neuroborelioza)	35
1.10 Dijagnostika i terapija tokom prve faze lajmske borelioze	37
1.11 Prevencija lajmske borelioze	40
2. PROBLEM	41
3. HIPOTEZE	43
4. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	44
5. METODE I ISPITANICI	45
6. REZULTATI	54
6.1 Karakteristike osoba infestiranih krpeljima sa prebivalištem u Južnobačkom okrugu	54
6.1.1 Distribucija infestacije pacijenata krpeljima po mesecima	54
6.1.2 Učestalost infestacije pacijenata krpeljima naspram godišnjeg doba	55
6.1.3 Učestalost infestacije krpeljima u odnosu na pol pacijenata	56
6.1.4 Razlika u infestaciji krpeljima u odnosu na starost pacijenata	57

6.1.5 Učestalost infestacije krpeljima u odnosu na tip prebivališta pacijenata	58
6.1.6 Razlika u infestiranosti različitih delova tela pacijenata svih starosnih kategorija sa prebivalištem u Južnobačkom okrugu	59
6.1.7 Razlika u infestiranosti različitih delova tela pacijenata dečje dobi.....	60
6.2 Karakteristike pacijenata obolelih od rane faze lajmske borelioze.....	61
6.2.1 Učestalost obolelih pacijenata od rane faze lajmske borelioze	61
6.2.2. Distribucija pacijenata obolelih od rane faze lajmske borelioze po mesecima	62
6.2.3 Učestalost pola pacijenata obolelih od rane faze lajmske borelioze	63
6.2.4 Razlika u obolevanju od rane faze lajmske borelioze u odnosu na starost pacijenata .	64
6.2.5 Učestalost obolevanja od rane faze lajmske borelioze u odnosu na tip prebivališta pacijenata infestiranih krpeljima	65
6.2.6 Učestalost zahvatanja različitih delova tela migratornim eritemom kod pacijenata infestiranih krpeljima.....	66
6.3 Karakteristike krpelja uklonjenih sa pacijenata	67
6.3.1 Pregled geografskih lokaliteta na kojima su pacijenti sa prebivalištem u Južnobačkom okrugu bili infestirani krpeljima	67
6.3.2 Vrste krpelja uklonjenih sa pacijenata.....	68
6.3.3 Razvojni stadijumi krpelja vrste <i>I. ricinus</i> uklonjenih sa pacijenata	69
6.3.4 Zaraženost krpelja vrste <i>I. ricinus</i> uklonjenih sa pacijenata uzročnikom iz <i>B. burgdorferi</i> sensu lato kompleksa	70
6.3.5 Učestalost infekcije krpelja vrste <i>I. ricinus</i> uzročnikom <i>B. burgdorferi</i> s. l. u urbanim područjima	71
6.3.6 Učestalost infekcije krpelja vrste <i>I. ricinus</i> sa <i>B. burgdorferi</i> s. l. u ruralnim područjima	72
6.4 Prediktivna vrednost i druge karakteristike seroloških analiza koje detektuju antitela usmerena protiv <i>Borrelia</i> spp. kod osoba infestiranih krpeljima	73
6.5 Prediktivna vrednost i druge dijagnostičke karakteristike molekularne PCR analize koja detektuje DNK <i>Borrelia burgdorferi</i> s. l. kompleksa u krpeljima uklonjenih sa ljudi	75
7. DISKUSIJA	76
8. ZAKLJUČAK	90
9. REFERENCE.....	92
План третмана података	118

1. UVOD

1.1 *Borrelia burgdorferi* i lajmska borelioza – otkriće i istorijat

Lajmska borelioza je vekovima predstavljala enigm u kontekstu etiologije bolesti i polimorfne kliničke slike koju može izazvati. Prva publikacija vezana za opis manifestacije lajmske borelioze datira iz 1883. godine. Nemački lekar dr Alfred Buhvald opisao je u svom radu patološku promenu na koži koju je nazvao difuzna idiopatska atrofija kože (1). Oko 20 godina kasnije, toj promeni su Herkshajmer i Hartman dali drugi naziv – hronični atrofični artodermatitis (AHA), što je i danas korišćeni naziv za jednu od kasnih manifestacija lajmske borelioze (2).

Proces sastavljanja mozaika patološkog entiteta lajmske borelioze nije pratio redosled razvojnih faza bolesti. Skoro 30 godina nakon publikacije dr Buhvalda (1910. godine), švedski lekar dr Arvid Afzelius na skupu lekara opisuje promenu na koži, za koju se danas smatra da je prva faza lajmske borelioze. Prikazani pacijent je razvio leziju prstenastog oblika, sa centralnim rasvetljenjem, koja je sporo migrirala u vidu širenja svojih perifernih granica. Smatrao je da je lezija nastala kao posledica uboda krpelja i nazvao ju je migratorni dermatitis (*dermatitis migrans*). Svoj rad u kojem detaljno prikazuje tog pacijenta dr Afzelius objavljuje tek 1921. godine (3, 4). U međuvremenu, dr Bendžamin Lipšutc dermatolog sa kožnog odeljenja bolnice „Viden” u Beču, na skupu lekara 1912. godine, prikazuje slučaj žene starosti 29 godina sa sličnom promenom, koja je perzistirala 7 meseci. Rad na tu temu objavljuje 1923. godine, a nastalu promenu nazvao je hronični migratorni eritem (*erythema chronicum migrans*) (4).

Afzelius je smatrao da je lezija rezultat infekcije koju je izazvao ubod krpelja. Kao moguće patogene agense navodi viruse i/ili toksine koji se nalaze u krpeljima. Lipšutc ne navodi ubod krpelja kod svog pacijenta, već hipotetiše da je hronični migratorni eritem posledica dejstva infektivnih uzročnika. Smatra da je mala verovatnoća da je u pitanju toksin, zbog dugog perzistiranja promene i predlaže dalje mikrobiološko ispitivanje digestivnog sistema i pljuvačke krpelja (5).

Prvi slučaj kod kojeg su se javili znaci bolesti nervnog sistema uz migratorni eritem prijavili su francuski neurolozi Garin i Budažu 1922. godine. Opisan je bolni radikuloneuritis kod pacijenta kojeg je infestirao krpelj vrste *Ixodes hexagonus*. Pacijent je 3 nedelje nakon što je uklonjen krpelj prijavio radikularni bol, dok je na koži levog gluteusa uočeno crvenilo na mestu gde se nalazio krpelj. Crvenilo se širilo zahvatajući desni gluteus i levu natkolenicu. Garin i Budažu su tom prilikom postavili dijagnozu krpeljske paralize (6). Danas se zna da je ta dijagnoza netačna, s obzirom na to da krpeljska paraliza ne izaziva osećaj bola (7).

Prvi opis slučaja gde se migratorni eritem dovodi u povezanost sa znacima bolesti nervnog sistema objavio je dr Sven Helerštorm 1930. godine, kada je prikazao pacijenta koji je ispoljio kliničku sliku meningoencefalitisa 3 meseca nakon što je uočena pojava migratornog eritema (8).

Ipak, danas je upitno da li su Garin i Budažu zaista opisali slučaj radikuloneuritisa kao manifestaciju neuroborelioze. Njihov prikaz slučaja se danas ne može smatrati tipičnom prezentacijom neuroborelioze. Pored toga, do danas nije zabeležen nijedan slučaj pojave migratornog eritema kod ljudi nakon uboda krpelja vrste *I. hexagonus* (9).

Više od 10 godina nakon publikacije dr Bendžamina Lipšutca, nemački dermatolog dr H. Askani objavljuje rad u kojem navodi da najveći broj pacijenata sa hroničnim migratornim

eritemom prijavljuje ubod krpelja. U radu zaključuje da je hronični migratorni eritem posledica uboda krpelja i da se uzročnik bolesti verovatno nalazi u pljuvački krpelja (5).

Tokom ispitivanja pacijenata sa AHA, dr R. Kale, dermatolog sa Klinike Univerziteta „Martin Luter” u Haleu prijavio je da 6 od 7 pacijenata sa AHA daju pozitivnu reakciju na testu za dokazivanje infekcije sa uzročnikom sifilisa, tj. *Pallida* reakciju. Nekoliko godina nakon te studije, dokazano je da je penicilin efikasan u lečenju AHA, te je sve više istraživača pokušavalo da dokaže uzročnika bolesti. Dr Grunberg sa iste klinike potvrdio je 10 godina kasnije rezultate studije dr Kalea i zaključio da je pozitivna reakcija verovatno rezultat postojanja grupne specifičnosti između spiroheta uzročnika sifilisa i pretpostavljenog uzročnika AHA (10).

Dr Karl Lenhof iz Karolinska instituta u Stokholmu 1948. godine demonstrirao je tehniku vizualizacije spiroheta iz bolesničkog materijala kod više bolesti nepoznatih etiologija. Tehnika se zasnivala na korišćenju živa-hlorida i amonijum-sulfata, tako da je dolazilo do stvaranja depozita živa-sulfata, koji se navodno taložio u spirohetama i omogućio njihovu vizualizaciju. Pored toga, korišćenjem mikroskopije u tamnom polju navodno je uspeo da vizualizuje spirohete u 95% slučajeva tokom ispitivanja uzoraka sa promenama kod pacijenata sa psorijazom. Dve godine kasnije, dr Šupli, dermatolog iz državne bolnice u Bazelu, objavio je da tehnike dr Lenhofa nisu dovoljno specifične da bi se uvele kao dijagnostička metoda, s obzirom na to da je ta tehnika bojila i tkivna vlakna, gljivice i druge bakterije, te se ne mogu pouzdano razlikovati spirohete od nespecifično obojenih struktura. Usled toga, njegove tehnike nisu prihvaćene od strane lekara za rutinsku dijagnostiku (5, 11).

U istom periodu, dr Sven Helerštorf prezentuje pacijente koji su nakon uboda krpelja razvili hronični migratorni eritem i meningitis. Pored toga, prijavljuje i efikasan tretman penicilinom kod obolelih (5).

Nekoliko godina kasnije, tokom 1954. i 1955. godine dr Hans Goc sa Klinike za dermatologiju u Minhenu, dokazuje da je AHA infektivna bolest tako što uspešno transplantira kožu zahvaćenu promenama sa pacijenta na sebe i još 3 dobrovoljca, gde uočava razvoj promena sličan kao i kod primarnog pacijenta. Opisuje razvoj hroničnog zapaljenja koje je trajalo 312 dana i koje je nestalo tek nakon primene penicilina. Hipotetiše da je uzročnik oboljenja virus, ali ne uspeva da obezbedi nikakve dokaze o virusnoj infekciji (12).

Oko 15 godina kasnije, prvi put je zabeleženo uočavanje hroničnog migratornog eritema i u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), na teritoriji centralnog Viskonsina. Ordinirajući lekar dr Rudolf Skrimenti prepoznao je specifičnu promenu na koži pacijenta koji je prijavio ubod krpelja i ordinirao penicilin, koji se i u tom slučaju pokazao kao efikasan (13).

Početakom šezdesetih godina, u mestu Stari Lajm (Konektikat, SAD) registruje se povećanje broja pacijenata sa oboljenjem zglobova, koje je tada označeno kao reumatoidni artritis. Dr Alen Stir je sa saradnicima objavio studiju 15 godina kasnije, u kojoj je ispitao 51 stanovnika Starog Lajma sa nesimetričnim otocima i bolovima u velikim zglobovima, najviše u kolenima. Od ukupnog broja, 13 ispitanika je prijavilo promene koje bi mogle odgovarati evropskoj definiciji hroničnog migratornog eritema. Zaključak studije je da ispitanici boluju od ranije neregistrovanog patološkog entiteta, te su autori poremećaj nazvali lajmska bolest (10, 14, 15).

Tek su 1981. godine Burgdorfer i saradnici nastavili put hipoteze dr Bendžamina Lipšutca i počeli sa mikrobiološkim ispitivanjem crevnog sadržaja krpelja vrste *Ixodes dammini* (danas *Ixodes scapularis*). Uzorkovan je jedan od pulova krpelja i na području gde je lajmska bolest registrovana kao endemska. Ispitivanjem crevnog sadržaja prethodno sakupljenih krpelja mikroskopijom u tamnom polju uočene su spirohete. Crevni sadržaj krpelja je inokulisan u Kelijevu podlogu, gde su na 35° C uspešno izolovane spirohete (5, 16). Burgdorfer je dokazao

prisustvo spiroheta i u krpeljima vrste *Ixodes ricinus* sakupljenim u blizini Nušatela u Švajcarskoj. Od 390 krpelja u razvojnem stadijumu adulta, kod 112 je zabeležen pozitivan nalaz spiroheta (17).

Dokazivanje uzročno-posledične veze između patogenih promena kod stanovnika u Starom Lajmu i opisanih spiroheta u crevnom sadržaju krpelja objavljeno je primenom seroloških metoda uz korišćenje prethodno izdvojenih krvnih seruma obolelih. Metodom indirektno imunofluorescencije, gde je antigen predstavljao izolat spiroheta iz krpelja, dokazano je prisustvo antitela kod obolelih usmerenih protiv spiroheta izolovanih iz krpelja. Od spiroheta izolovanih iz krpelja vrste *I. dammini* uspostavljeno je više klonova, od kojih se jedan, nazvan B31, i danas smatra jednim od referentnih sojeva (18). Upravo zbog doprinosa koji je Burgdorfer načinio, novoizolovani agens je imenovan po njemu – *Borrelia burgdorferi* (19).

S obzirom na to da je termin lajmska bolest korišćen od strane dr Stira i saradnika za naziv oboljenja nepoznate etiologije, smatra se da je nakon otkrića uzročnika ovog infektivnog oboljenja prikladnije koristiti specifičniji – lajmska borelioza (20).

1.2 *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex

Rod *Borrelia* (Svelengrebel, 1907) član je porodice *Spirochetaceae*, koja sadrži i rodove *Clevelandina*, *Cristispira*, *Diplocalyx*, *Hollandina*, *Pillotina*, *Spirochaeta* i *Sphaerochaeta* (21). Trenutno su sukobljeni stavovi da li rod *Borrelia* treba podeliti na 2 roda, na osnovu toga da li spirohete spadaju u grupu blisku izazivačima povratne groznice ili lajmske borelioze (22, 23).

Borrelia burgdorferi sensu lato (*Bb* s. l.) kompleks čine različite vrste spiroheta, od kojih su neke patogene, a neke uslovno patogene za čoveka. Na području Evroazije je trenutno registrovano 11 vrsta borelija iz sensu lato kompleksa: *Borrelia afzelii*, *B. bavariensis*, *B. garinii*, *B. japonica*, *B. lusitaniae*, *B. sinica*, *B. spielmanii*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. valaisiana* i *B. yangtze* (24).

Patogenim vrstama se smatraju *B. burgdorferi sensu stricto* (*Bbss*), *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii*; dok su uslovno patogene *B. bissettii*, *B. lusitaniae* i *B. valaisiana* (20, 25).

Borelije su jednoćelijski, spiralni mikroorganizmi, dužine 10–30 mikrometara i širine od 0,2 do 0,3 mikrometara. Klasifikovane su kao gram-negativne bakterije, s obzirom na to da ne poseduju lipopolisaharide u svojoj spoljašnjoj membrani. Spoljašnja membrana borelija je fragilna i okružuje protoplazmastični cilindar. Protoplazmastični cilindar se sastoji od peptidoglikana, unutrašnje membrane (citoplazmatske membrane) i citoplazmatskog sadržaja.

Sa svakog kraja borelije pruža se 7 do 14 flagela (endoflagela), koje se prostiru unutar periplazmatskog prostora borelije i međusobno se preklapaju krajevima na sredini bakterije, tako da je obmotavaju celom dužinom (26). Zahvaljujući takvom rasporedu one su odgovorne za pokretljivost i specifičan oblik borelija, koji su ključni za njenu patogenezu (20). Postavljanje

flagela unutar periplazmatskog prostora smatra se jednim od pasivnih mehanizama odbrane borelija, s obzirom na to da se time sprečava prepoznavanje flagelarnih antigena od strane imunog sistema domaćina. Za razliku od većine plazmidskih gena, geni koji kodiraju flagelarne proteine (*flaA*, *flaB*, *flgE*, *fliH*, *fliI* i *flgK*) locirani su na hromozomu i homologni su genima za flagelarne proteine prisutne kod biljaka i životinja, što upućuje na to da je kompleks flagela, kao i njihov put sinteze dobro konzerviran (27).

Segmentirani genom borelija se razlikuje od većine bakterija, s obzirom na to da se sastoji od linearnog hromozoma, koji u zavisnosti od soja može sadržati od 906707 do 922801 baznih parova i do 23 linearna plazmida veličine od 5 do 56 kilobaza (28). Genom borelija je izuzetno male veličine u odnosu na druge bakterijske uzročnike bolesti, usled toga borelije su ograničene u pogledu gena namenjenih za kodiranje metabolita, faktora virulencije i aktiviranja mehanizama odbrane. Jedini kompletni metabolički put koji je identifikovan kod borelija jeste glikoliza. Metabolički putevi za generisanje energije, aminokiselina i sintezu lipida odsutni su ili nekompletni. Usled toga, borelije su zavisne od svoje okoline da bi ispunile osnovne potrebe vezane za preživljavanje (26).

Količina plazmida koju poseduju borelije do sada nije registrovana kod drugih bakterija. Smatra se da ni kod jednog prokariotskog organizma plazmidi nemaju toliko ključnih uloga. U skladu s time plazmidi čine 40% ukupnog genoma borelija. Dokazano je da je najmanje jedan plazmid potreban tokom svih faza životnog ciklusa bakterije, dok su ostali potrebni za preživljavanje tokom različitih faza životnog ciklusa (29). Za razliku od hromozoma, plazmidi poseduju veliki broj pseudogena (segmenti koji su verovatno oštećeni usled mutacija i ne kodiraju funkcionalne proteine). Posledica posedovanja malog genoma jeste zavisnost od domaćina i njegovih kompleksnih nutrijenata, za koje borelije ne poseduju gene (masne kiseline dugih

lanaca, nukleozidi, aminokiseline/peptidi i vitamini). Specifična je i zavisnost od N-acetilglukozamina, gradivne komponente peptidoglikana u ćelijskom zidu. Zbog navedenog, borelije nisu sposobne da prežive van svojih domaćina ili složenih hranljivih podloga u laboratorijskim uslovima (29, 30).

Smatra se da borelija eksprimira manje od 1000 proteina tokom životnog ciklusa, od kojih je približno 200 sposobno da izazove imuni odgovor domaćina. Komponente stečenog imuniteta čoveka najčešće razvijaju odgovor usmeren prema 10 proteina borelija. Antitela usmerena protiv tih imunogena mogu se detektovati serološkim dijagnostičkim testovima, gde se kao supstrati koriste lizati bakterija ili antigeni proteini protiv kojih se imuni odgovor ispituje (8).

Imunogeni proteini borelija kodirani genima na hromozomu jesu flagelin (glavni gradivni protein flagele, veličine 41kDa), protein unutrašnje membrane (39 kDa), protein koji ulazi u sastav spoljašnje membrane (66 kDa), proteini nepoznate uloge veličine 58 i 93 kDa (8).

Plazmidi kodiraju sintezu antigenih lipoproteina. koji su ekspimirani na površini borelija i uglavnom služe kao adhezini (*Outer-surface protein – Osp*), *VlsE* protein (*Vmp-like sequence E*) i dekorin, vezujući protein A i B (*decorin-binding proteins – Dbp*). Od *Osp* proteina najznačajniji antigeni su *OspA* (31 kDa), *OspB* (34kDa) i *OspC* (20,7 kDa). Značajni adhezini kodirani na plazmidima koji omogućavaju borelijama da ostvare virulenciju su *BBK32*, *CRASP* i *Erp* proteini, *BgpA*, *RevA*, *RevB*, *BB0347*, *ErpX* i *p66*. Borelija eksprimira ove proteine u različitim fazama životnog ciklusa, u zavisnosti od sredine u kojoj se nalazi (31–34).

Poređenjem zastupljenosti različitih genospecijesa unutar sensu lato kompleksa utvrđeno je da je 95% slučajeva lajmske borelioze u svetu izazvano od strane *B. burgdorferi sensu stricto*,

B. afzelii i *B. garinii*. Na tlu Evrope najčešćim uzročnicima lajmske borelioze smatraju se sva 3 genospecijesa, dok je *B. burgdorferi sensu stricto* genospecijes ubedljivo najčešći u SAD (35).

Pored razlike u učestalosti u izazivanju bolesti kod čoveka, uočene su i razlike u afinitetu borelija ka određenim tkivima (tropizam) i samim tim, uočene su i razlike u izazivanju poremećaja određenih sistema čoveka u kasnijoj fazi bolesti. Smatra se da je uzrok razlika u tropizmu varijacija adhezina *DbpA* između genospecijesa (8, 20, 36).

B. burgdorferi sensu stricto (*Bbss*), kao i ostale patogene borelije, sposobna je da izazove stolitarni migratorni eritem kod čoveka. Pored toga, *Bbss* je izolovana i iz multiplih migratornih eritema, koji nastaju diseminacijom bakterija. U vezi s pitanjem tropizma u kasnijoj fazi bolesti, *Bbss* je izolovana iz likvora i AHA, ipak je najčešće izolovana iz zapaljenskih promena na kolenima, te se smatra glavnim uzročnikom lajmskog artritisa (8, 20, 37, 38).

B. garinii je najčešće izolovana iz likvora kod pacijenata sa neuroboreliozom, te se smatra glavnim uzročnikom neuroborelioze, usled tropizma ka nervnom sistemu. U manjem broju slučajeva izolovana je i iz zglobnih promena i AHA (39–41). U poređenju sa *B. afzelii*, kliničkim ispitivanjima uočeno je da se migratorni eritem koji izaziva *B. garinii* širi dvostruko brže (42, 43). Vrsta *B. garini* je specifična i po tome što sadrži dva supspecijesa (grupa 20047 i grupa NT29) koja su patogena za ljude. Uočene su brojne razlike između ta dva supspecijesa, te su podeljena na 6 serotipova (44). Zapaženo je da *B. afzelii* ima tropizam ka koži, s obzirom na to da je najčešće izolovana iz AHA i benigne limfadenoze kože. Pored toga, opisane su sporadične izolacije iz zglobnih promena kod lajmskog artritisa i likvora kod neuroborelioze (39, 45, 46).

Lajmska boreliozna se ređe može manifestovati zapaljenskim promenama u drugim organima i sistemima. Borelije su izolovane iz zapaljenskih promena u srcu (lajmski karditis) kod

jednog pacijenta, dok su zabeleženi i slučajevi izazivanja zapaljenskih promena u oku i mišićima (47–49).

1.3 Rezervoari borelija sensu lato kompleksa

Održavanje vrsta unutar *B. burgdorferi* sensu lato kompleksa u enozootskim ciklusima ostvaruje se usled transmisije borelija između kičmenjaka i tvrdih krpelja (*Acari: Ixodida*).

Kompetentni rezervoari su kičmenjaci koji su sposobni da razviju održivu infekciju borelijama, da povećaju broj bakterija koje nose u sebi i da ih prenesu vektoru (krpelju) tokom krvnog obroka. Krpelji su kao vektori sposobni da održe infekciju spirohetama kroz razvojne stadijume i tako inficiraju novog kičmenjaka tokom sledećeg krvnog obroka.

Većina genospecijesa sensu lato kompleksa specijalizovana je za određene rezervoare, te svoj enozootski ciklus ostvaruje preko njih. U tom smislu razlikuju se tri klase rezervoara: sisari, ptice i reptili. Zabeleženo je da je *B. bissettii* sposobna da kao rezervoare koristi sisare i ptice, dok jedino *Bbss* koristi sve tri klase rezervoara (50–52).

Još uvek nije u potpunosti razjašnjeno šta određuje specifičnost borelija prema određenom rezervoaru. Ipak, poznato je da značajnu ulogu ima sposobnost spirohete da izbegne urođeni i stečeni imuni odgovor domaćina. Tu sposobnost spiroheta ostvaruje uz pomoć bioaktivnih molekula iz pljuvačke krpelja (31, 53). Smatra se da su upravo krpelji načinili evolutivni pritisak na borelije da izvrše specijalizaciju ka određenim rezervoarima (54).

Istraživanja sa teritorije SAD upućuju na to da se *Bbss* specijalizovala za sledeće rezervoare iz klase sisara: belonogi miš (*Peromyscus leucopus*), severnoamerička veverica (*Tamias striatus*), kratkorepa rovčica (*Blarina brevicauda*), istočna siva veverica (*Sciurus carolinensis*), zapadna

siva veaverica (*Sciurus griseus*); kao i ptice: fazan (*Phasianus colchicus*), crvendać (*Erithacus rubecula*), crni kos (*Turdus merula*) i druge ptice pevačice (*Passeriformes*). U Evropi nije uočena tolika šarenolikost domaćina koje *Bbss* uspeva da iskoristi, te se za sada rezervoarima smatraju ježeви (fam. *Erinaceinae*) i istočne sive veaverice (*Sciurus carolinensis*) (20, 55).

Vrsta *B. garinii* kao rezervoare koristi ptice, što joj omogućava diseminaciju širom sveta. Kao najznačajniji domaćini u Evropi identifikovani su drozdovi (*Turdidae*), zeba (*Fringilla coelebs*), velika senica (*Parus major*), carić (*Troglodytes troglodytes*), crnokapa grmuša (*Sylvia atricapilla*), crvendać (*Erithacus rubecula*), obični popić (*Prunella modularis*), šumska trepteljka (*Anthus trivialis*), batokljun (*Coccothraustes coccothraustes*), obična crvenperka (*Phoenicurus phoenicurus*) i obična grmuša (*Sylvia communis*). Pored toga, efekat ptica kao rezervoara u Evropi prikazan je u radu gde je uočeno da su godišnje varijacije u broju ptica na teritoriji Norveške povezane sa varijacijama u godišnjem broju slučajeva neuroborelioze, čiji je najčešći uzročnik *B. garinii* (56). Studija koju su izvršili Buczek i sar. ukazuje na to da su ptice selice bitan faktor koji utiče na brzo širenje krpelja, kao i bolesti koje oni prenose u Evropi (57).

Vrsta *B. afzelii* spada u najčešće detektovane predstavnike sensu lato kompleksa kod krpelja u Evropi. Kao rezervoare koristi sitne glodare – šumsku voluharicu (*Myodes glareolus*), livadsku voluharicu (*Microtus agrestis*), šumsku rovčicu (*Sorex araneus*), šumskog miša (*Apodemus sylvaticus*) i žutogrlog miša (*Apodemus flavicollis*) (46, 58).

1.4 Vektori borelija sensu lato kompleksa

Sposobnost određene vrste krpelja da zauzme ulogu vektora zavisi od toga da li patogen može da preživi i zaobiđe imunološke barijere unutar samog krpelja. Iako je prijavljen značajan broj vrsta krpelja koji je inficiran borelijama sensu lato kompleksa, postojanje spiroheta u njima ne znači da su sposobni da ih prenesu na novog domaćina. Postoje nesumnjivi dokazi da je samo nekoliko vrsta krpelja sposobno da prenese borelije drugom domaćinu, od kojih svi pripadaju tvrdim krpeljima, rodu *Ixodes* (Latreille, 1795).

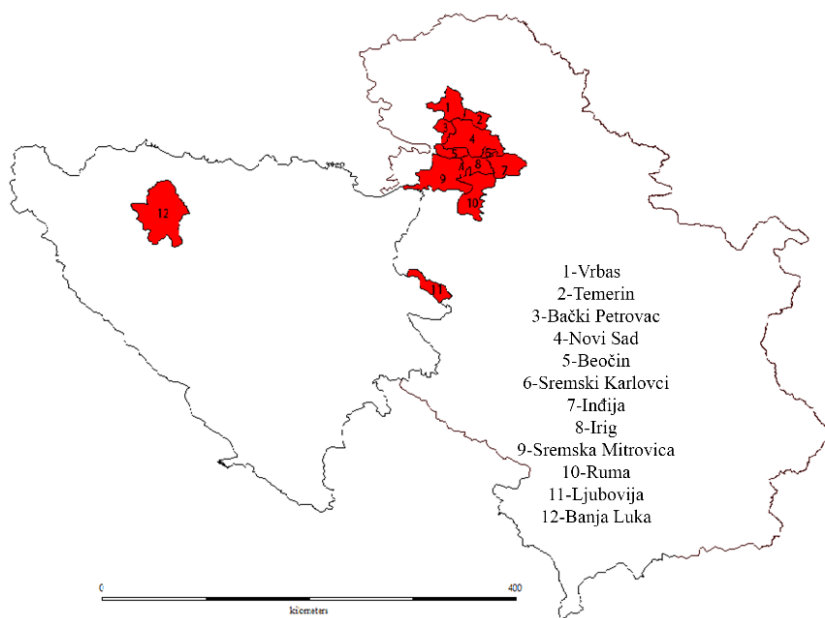
Unutar roda *Ixodes*, četiri vrste su identifikovane kao najznačajniji vektori, kompetentni za prenos borelija sensu lato kompleksa na ljude: *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) i *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930) u Evropi i Aziji, *Ixodes scapularis (dammini)* (Say, 1821) u istočnoj i srednjozapadnoj Severnoj Americi i *Ixodes pacificus* (Cooley, Kohls, 1943) u zapadnoj Severnoj Americi (59, 60).

Ostale vrste za koje je uočeno da su uključeni u enozootski ciklus spiroheta jesu *Ixodes dentatus* (Marx, 1899), *Ixodes neotomae* (Cooley, 1944), *Ixodes spinipalpis* (Hadwen, Nuttall, 1916), *Ixodes hexagonus* (Leach, 1815), *Ixodes uriae* (White, 1852), te se smatra da imaju ulogu u njihovom održavanju u prirodi, ali za sada nije registrovano da mogu da prenesu borelije ljudima (9, 60–64).

Vrsta kod koje je registrovano prisustvo spiroheta, ali nije dokazana kompetencija za transmisiju drugim domaćinima jeste *Ixodes trianguliceps* (Birula, 1895), za koju se smatra da potencijalno može imati efekat u održavanju cirkulacije borelija među glodarima, ali samo uz istovremeno prisustvo krpelja vrste *I. ricinus* na istom terenu (65, 66).

Glavni vektori borelija sensu lato kompleksa u Evropi i Srbiji jesu krpelji vrste *I. ricinus* (67, 68). Ispitivanjem zaraženosti krpelja vrste *I. ricinus* na više lokaliteta Republike Srbije, registrovane su sledeće vrste sensu lato kompleksa: *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia valaisiana* i *Borrelia bavariensis* (69, 70).

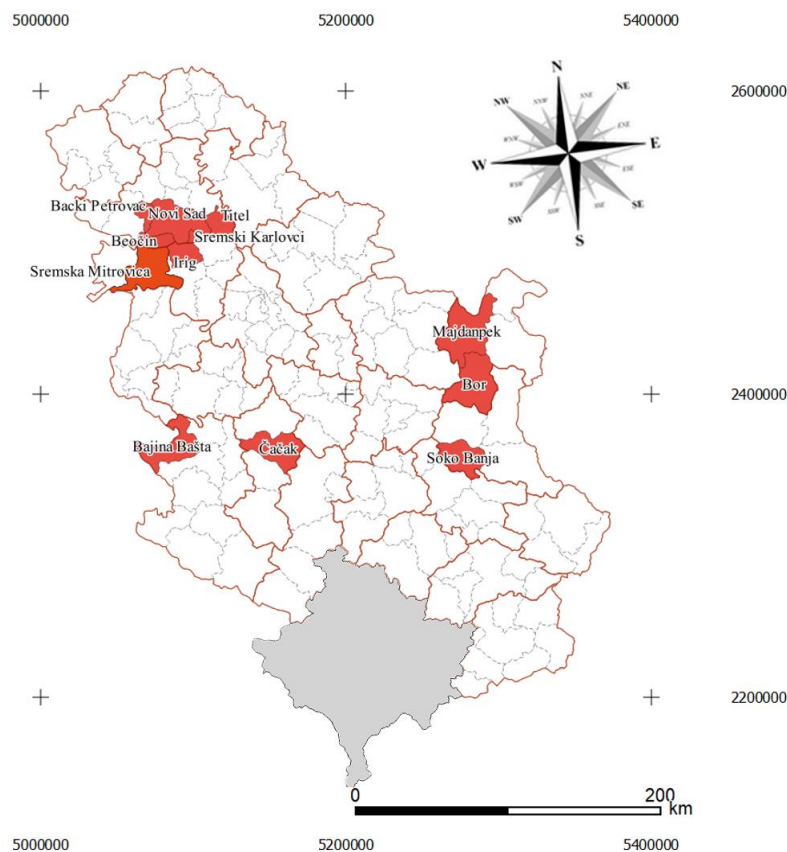
Ispitivanjem krpelja vrste *I. ricinus* uklonjenih sa pacijenata koji su posetili Pasterov zavod radi pružanja zdravstvene zaštite tokom 2018. godine dokazana je infekcija borelijama iz sensu lato kompleksa kod 40,7% krpelja (67). Geografski lokaliteti gde su pacijenti bili infestirani krpeljima nalaze se u najvećem delu unutar regiona Bačke i Srema (Slika 1).



Slika 1 – Prikaz geografskih lokaliteta unutar Srbije i Bosne i Hercegovine, gde su pacijenti bili infestirani krpeljima u 2018. godini (67).

U istom istraživanju je saopšteno da je najveća prevalencija zaraženosti krpelja uzročnikom *B. burgdorferi* bila prisutna u Novom Sadu (66).

Zapaženo je da su stanovnici Republike Srbije koji su infestirani krpeljom vrste *I. ricinus*, usled koinfekcije krpelja, izloženi i drugim patogenim uzročnicima bolesti. Tokom 2019. godine u krpeljima uklonjenih sa ljudi dokazani su sledeći striktno i uslovno patogeni mikroorganizmi: *Rickettsia helvetica*, *Borrelia afzelii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia miyamotoi*, *Francisella like-endosymbiont*, *Borrelia valaisiana*, *Borrelia lusitaniae*, *Rickettsia felis* i *Rickettsia aeschlimannii* (68). Lokaliteta gde su pacijenti bili infestirani krpeljima prikazani su na Slici 2.



Slika 2 – Prikaz geografskih lokaliteta gde su pacijenti ispitivani tokom 2019. godine bili infestirani krpeljima (68).

Iako je registrovan u XVIII veku, ispitivanje krpelja vrste *I. ricinus* počinje tek 1930. godine, tokom proučavanja uzgoja ovaca u Velikoj Britaniji. Kao rezultat tih studija, *I. ricinus* dobija sinonim „ovčiji krpelj”. Tek u drugoj polovini XX veka počinje ispitivanje ovog krpelja

kao vektora mikroorganizama koji izazivaju bolest kod ljudi i životinja. U početku je žiža interesovanja bila usmerena ka virusu krpeljskog encefalitisa, koji je privlačio sve više pažnje u Sovjetskom Savezu i zemljama Centralne i Istočne Evrope usled novodetektovanih žarišta. Tokom osamdesetih godina prošlog veka, krpelji vrste *I. ricinus* označeni su kao vektori uzročnika lajmske borelioze. Zbog sposobnosti prenošenja velikog broja zoonotskih agenasa, danas se *I. ricinus* smatra jednom od najznačajnijih krpeljskih vrsta kako u medicini, tako i u veterini (71).

Životni ciklus krpelja vrste *I. ricinus* sastoji se iz 4 faze – jaje, larva, nimfa i adult. Tokom svake aktivne životne faze (larva, nimfa, adult) potrebno mu je da ostvari jedan krvni obrok. Vreme za koje *I. ricinus* ostvari celokupan životni ciklus varira i može se kretati od 3 do 6 godina, u zavisnosti od klimatskih uslova i prisutnosti njihovih domaćina, koji mogu biti pripadnici više od 300 vrsta kičmenjaka (72).

Kao i većina članova porodice *Ixodidae*, *I. ricinus* provodi od 90 do 99% vremena svog života u slobodnoj prirodi. Usled toga, *I. ricinus* je razvio karakteristike koje mu omogućavaju preživljavanje u spoljašnjoj sredini.

Pored prisustva odgovarajućih domaćina, spoljašnji faktor koji predstavlja najveće ograničenje za ovu vrstu krpelja jeste relativna vlažnost vazduha, koja optimalno ne sme da padne ispod 80% tokom dužeg vremenskog perioda (73). Balans vode u organizmu krpelja pod uticajem je tri parametra – deficita saturacije vazduha vodom (utiče na gubitak vode) i relativne vlažnosti vazduha (utiče na mogućnost dopunjavanja zaliha vode unosom direktno iz vazduha) (74), kao i same temperature vazduha.

Tokom potrage za domaćinom krpelj gubi vodu iz svog organizma. Da bi dopunio zalihe, potrebno mu je da se spusti na niže nivoe gde može da izvrši aktivnu reapsorpciju vode iz vazduha. Nakon rehidracije, krpelj se ponovo penje na vegetaciju (73). U slučaju da se za to pokaže potreba, krpelj može dopuniti svoje rezerve vode tako što će migrirati ka mestima sa pogodnijom mikroklimom, gde je sredina topla i vlažna – npr. pokrivač od opalog lišća.

Dokazano je da *I. ricinus* može imati benefit usled infekcije borelijama u vidu produženja životnog veka (inficirani krpelji poseduju više rezervi masti i otporniji su na isušenje), kao i zbog toga što inficirani krpelji pokazuju duži period čekanja domaćina u zasedi, što posledično povećava mogućnost da krpelj nađe domaćina, ostvari krvni obrok i izvrši dalji prenos borelija (75).

I. ricinus je najčešće prisutan u listopadnim šumama u kojima se nalaze mali sisari i jeleni. Ipak, ukoliko ima dovoljno padavina, velike populacije ovih krpelja mogu se naći na otvorenijim terenima kao što su livade i močvare. U tim slučajevima glavni domaćin najčešće je stoka (76).

Za napadanje domaćina, *I. ricinus* koristi specifičnu strategiju u vidu zasede. Krpelj se tom prilikom penje na vegetaciju i postavlja na vrhove stabiljki ili listova i čeka domaćina, koristeći receptore na svom telu da registruje njegovo približavanje. Krpelj se kači za domaćina tokom njegovog prolaska kroz vegetaciju.

I. ricinus napada domaćina iz nekoliko razloga – radi ostvarivanja krvnog obroka i prelaska u sledeći razvojni stadijum (u slučaju larve i nimfe), radi ostvarivanja krvnog obroka i polaganja jaja (u slučaju adulta ženke) i radi uslovnog uzimanja krvnog obroka i potrage za ženkom radi oplodnje (u slučaju adulta mužjaka). Prednost mužjaka vrste *I. ricinus* jeste to što im nije neophodan krvni obrok da bi izvršili oplodnju, s obzirom na to da poseduju zrele spermatozoide, te su sposobni da oplode ženku na vegetaciji i pre nego što pronađu domaćina (76).

Ukupno vreme uzimanja krvnog obroka krpelja vrste *I. ricinus* relativno je kratko i ne traje duže od 12 do 20 dana. Larva se hrani 2–4 dana, nimfe 4–6 dana, ženke 6–10 dana, dok se mužjaci hrane kratko i uzimaju izuzetno male porcije krvi (20).

Nezrele forme krpelja vrste *I. ricinus* (larve i nimfe) najčešće parazitiraju na glodarima poput žutogrlog miša, šumske voluharice i crvene veverice (*Sciurus vulgaris*), na pticama koje se dominantno hrane na zemlji, gušterima (*Lacertilia*) i papkarima (*Artiodactyla*). Adultne forme se uglavnom hrane na većim sisarima, ali su često nadbrojani od strane larvi i nimfi kada se analizira ukupan broj krpelja koji parazitiraju na jedinki (77).

I. ricinus ne pokazuje specifičnost ka domaćinima i najznačajnije determinante koje utiču na njegov izbor domaćina jesu: sredina u kojoj se domaćin nalazi, ponašanje domaćina, mikroklimatski uslovi, kao i visina na kojoj određena razvojna faza krpelja pokušava da napadne svog domaćina (76).

Larve i nimfe se postavljaju bliže zemlji, larve se najčešće uočavaju na visinama između 0 i 30 cm, dok se nimfe uočavaju na visini od 30 do 70 cm. Smatra se da je razlog njihovog niskog postavljanja veća osetljivost prema oscilaciji vlažnosti vazduha naspram adultnih formi, usled većih vrednosti odnosa površine tela i ukupne zapremine krpelja. Adulti (mužjaci i ženke) uočavaju se u visokoj vegetaciji, najčešće od 60 do 80 cm iznad zemlje, ali se mogu uočiti i na visini do 1,5 m u zavisnosti od vegetacije na određenom terenu (75).

Sa završetkom hranjenja *I. ricinus* se odvaja od domaćina i pada na zemlju. Nakon toga će biti potrebno nekoliko meseci da se razvije u sledeću fazu ili, u slučaju ženki, da položi na hiljade jaja i uquine. Uočeno je da samo mali deo krpelja vrste *I. ricinus* uspeva da završi ceo životni ciklus. Oko 10% larvi će se razviti u nimfe, dok se od 1 do 10% nimfi razvija u adulte (76).

Ukoliko se neinficiran *I. ricinus* hrani na inficiranom domaćinu, koji je kompetentni rezervoar za borelije sensu lato kompleksa, ili ukoliko se hrani uporedo sa drugim inficiranim krpeljom, koji je kompetentni vektor, u ranije nezaraženom krpelju doći će do uspostavljanja infekcije, koja će u velikom broju slučajeva održati i tokom kasnijih razvojnih stadijuma, ukoliko se prvi kontakt sa borelijama desio tokom stadijuma larve ili nimfe (transstadijalni prenos) (78).

Pored toga, moguće je inficiranje krpelja različitim sojevima borelija tokom životnog ciklusa i stvaranje mešovutih infekcija ukoliko i sledeći domaćini budu kompetentni rezervoari borelija sensu lato kompleksa, ili ukoliko se budu hranili na istom domaćinu uporedo sa drugim inficiranim krpeljima.

Prikazano je da ukupno opterećenje krpelja borelijama sensu lato kompleksa varira tokom različitih faza životnog ciklusa, kao i tokom različitih faza hranjenja. Na modelu *B. afzelii* uočeno je da prilikom prelaska inficirane larve u stadijum nimfe kod vrste *I. ricinus* dolazi do rasta populacije borelija unutar krpelja (79). Uočeno je i da kod inficiranih nimfi dolazi do drastičnog opadanja opterećenja borelijama tokom uzimanja krvnog obroka (79) i ukoliko ne ostvare krvni obrok unutar 3 do 6 meseci od transformacije (80). Pored toga, krpelji sa sobom nose sinbiote, koji mogu ostvariti uticaj na održavanje broja bakterija u krpelju i njihov dalji prenos tokom uzimanja krvnog obroka (81).

U slučajevima mešovitih infekcija sa više sojeva borelija sensu lato kompleksa postoji kompeticija spiroheta unutar krpelja. Smatra se da je broj borelija koji krpelj izlučuje preko svoje pljuvačke tokom hranjenja delom zavisano od rezultata te kompeticije (82).

Transovarijalni prenos borelija sensu lato kompleksa (prenos sa inficirane ženke na jaja) izuzetno se retko uočava u laboratorijskim uslovima i praktično se smatra nemogućim (20).

1.5 Ukrštanje tri sveta: krpelj, borelija i čovek – koncept *jednog zdravlja*

Momenat u kojem se ukrštaju sva tri sveta – krpelj, borelija i čovek predstavlja trenutak prodora rilice krpelja kroz epiderm čoveka i laceracija dermalnih krvnih sudova. Glavna odbrana čoveka u slučaju uboda krpelja ogleda se u mehanizmu hemostaze i pokretanju akutnog inflamatornog procesa, s aktivacijom komponenti urođenog imunog odgovora.

Tokom pripremne faze, *I. ricinus*, kao i mnogi krpelji iz porodice *Ixodidae*, proizvode cement, koji im pomaže da se na mestu parazitiranja zadrže i preko nedelju dana (83). U takvim slučajevima se krpelj mora suočiti i sa humoralnim i ćelijskim imunim odgovorom, kako bi uspešno završio proces hranjenja.

Kao kontraodgovor na odbrambene mehanizme domaćina, krpelj od trenutka pripreme za proboj kože počinje da luči svoju pljuvačku, u početku radi anesteziranja mesta uboda, a zatim u cilju ostvarivanja imunosupresornog, imunomodulatornog, vazodilatacionog, antiagregacionog, antikoagulacionog i antireparatornog efekta. Finalni rezultat dejstva pljuvačke krpelja jeste stvaranje imunoprivilegovane sredine na mestu insercije rilice (84–86).

Pljuvačka krpelja je izuzetno kompleksna mešavina koja se sastoji od bioaktivnih proteina, lipida i nukleozida. Proteini pljuvačke krpelja se smatraju lošim imunogenima kod ljudi. Nasuprot tome, opisani su slučajevi razvoja specifičnih imunih odgovora na ugljenohidratnu strukturu galaktoza-alfa-1,3-galaktoze (α -Gal), koja se nalazi u rilici krpelja. Generalno je α -Gal prisutan u ćelijskoj membrani većine sisara, ali ne i primata, koji su tokom evolucije izgubili *ggTA-1* gen. Usled toga, imuni sistem ljudi α -Gal prepoznaje kao strano telo i razvija specifična antitela usmerena protiv njega. Osobe koje su razvile specifična anti- α -Gal antitela postaju alergične na

namirnice poreklom od sisara (crveno meso), te dolazi do razvoja gastrointestinalnih tegoba i kožnih reakcija prilikom konzumiranja tih namirnica (87, 88).

Jedan od glavnih faktora koji utiče na preživljavanje patogenih uzročnika koje prenose krpelji u novom domaćinu jeste sposobnost iskorišćavanja farmakoloških efekata koje ostvaruju molekuli pljuvačke krpelja. Fenomen olakšavanja prenosa patogenih uzročnika dejstvom pljuvačke krpelja na organizam domaćina nazvan je prenos aktiviran pljuvačkom (PAP), i prvi put je definisan na primeru prenosa *Thogoto* virusa uz pomoć ekstrakta pljuvačnih žlezda krpelja vrste *Rhipicephalus appendiculatus* (89). Slični fenomeni su opisani i kod drugih patogenih uzročnika, pre svega virusa krpeljskog encefalitisa i spiroheta uzročnika lajmske borelioze – *B. afzelii*, *Bbss* i *B. lusitaniae* (90).

Fenomen PAP je detektovan i kod ostvarivanja transmisije patogenih uzročnika između zaraženog i nezaraženog krpelja koji parazitiraju na jednom domaćinu istovremeno, bez indukcije viremije/bakterijemije kod te jedinke, tj. prodora agensa u sistemsku cirkulaciju. Transmisija bez detektovane viremije dokazana je kod nekoliko agenasa: virus krpeljskog encefalitisa, virusa kongo-krimске hemoragične groznice, *Louping ill* virusa i virusa Zapadnog Nila. Takođe, posredstvom PAP fenomena uočen je prenos *Bbss*, *B. garinii* i *B. afzelii* sa zaraženog krpelja na nezaraženog, bez izazivanja bakterijemije. Laboratorijskim ispitivanjima na glodarima podržana je hipoteza fenomena PAP, gde je ostvarena transmisija virusa krpeljskog encefalitisa sa jednog krpelja na drugog, čak i u prisustvu virus-neutralizacionih antitela u cirkulaciji domaćina (91, 92).

Krpelji se u odnosu na čoveka mogu posmatrati dvojako, kao deo prirode ili kao deo životinjskog sveta. Ovakva uloga krpelja daje lajmskoj boreliozi jednozdravstveni značaj. Lajmska borelioza je odličan primer za prikaz koncepta *jednog zdravlja*, jer obuhvata sve tri komponente – zdravlje ljudi, zdravlje životinja i životnu sredinu. Lajmska borelioza je oboljenje koje se može

javiti sa kliničkim simptomima i kod ljudi i kod životinja, a neke životinje, kao što je već pomenuto, mogu biti rezervoari oboljenja (sitni glodari). U ovom slučaju se krpelji pojavljuju kao deo životne sredine, bez čije vektorske uloge nije moguće širenje ove bolesti. Upravo zbog toga lajmska borelioza u epidemiološkom smislu pripada grupi prirodno žarišnih zoonoza.

Međutim, čak i ako gledamo samo odnos između krpelja i ljudi, bez davanja značaja glodarima kao rezervoarima oboljenja, krpelji, životna sredina i ljudi opet čine značajan trougao s aspekta *jednog zdravlja*. U tom slučaju su krpelji kao predstavnici životinjske populacije direktno odgovorni za širenje bolesti, a njihov opstanak opet direktno zavisi od uslova u životnoj sredini.

Životna sredina takođe dvojako utiče na pojavu lajmske borelioze. Životna sredina je neminovan ambijent za opstanak krpelja kao vektora i direktno utiče na njihovu pojavu, razvoj, razmnožavanje i mogućnost uzimanja krvnih obroka na životinjama ili ljudima. Međutim, ako opet posmatramo samo kontakt/odnos krpelja i ljudi – životna sredina osim što utiče na razvoj krpelja, značajno utiče i na kontakt krpelja i ljudi, tj. utiče na to da uopšte dođe do kontakta ljudi i krpelja. Mnogo je veća mogućnost kontakta i kačenja krpelja na ljude u sredinama gde je spoljašnja temperatura preko 20° C, blago vlažna sredina, sa dosta vegetacije na kojoj krpelji mogu da čekaju u zasedi, a sve to na mestima koja su atraktivna za izlazak ljudi u prirodu (parkovi, livade, šumarci, igrališta za decu i sl.). Životna sredina direktno omogućava kontakt krpelja i ljudi baš u vreme kada kreće aktivnost krpelja (proleće, lepo vreme posle duge zime, toplije vreme) i kada ljudi počinju da provode više vremena u prirodi.

1.6 Faktori rizika za kontakt čoveka sa krpeljima

Iako se globalno zagrevanje ne smatra glavnim faktorom koji utiče na povećanje incidencije bolesti koje prenose krpelji širom sveta, u proteklim godinama sve je jasniji njegov uticaj na distribuciju tih bolesti (93–95).

Sociodemografski i agrokulturalni faktori, seča šuma i pošumljavanje, upravljanje divljim životinjama od strane čoveka smatraju se velikim induktorima promene biotopa, te posledično utiču na odnose krpelja i domaćina, kao i na prevalenciju infekcije (71).

Više od polovine svetske populacije trenutno živi u urbanom tipu naselja, te se očekuje da do 2050. godine taj udeo poraste do 70% (96). Više od 75% teritorije Zemlje koja nije pod ledom na neki način je izmenjeno usled prisustva čoveka i korišćenja tih prostora, te se samo 25% ili manje navedene teritorije može smatrati divljinom. Najveći stepen urbanizacije je prisutan u Evropi, što je usled smanjenja prirodnih staništa divljači dovelo do značajnih promena u njihovim zajednicama, pa samim tim i do promena u populaciji krpelja, koji ih koriste kao domaćine (71).

Parkovi, bašte, prigradska mesta i groblja postala su izuzetno bitna mesta u današnjim urbanim sredinama, gde ljudi i domaće životinje mogu doći u kontakt sa potencijalno inficiranim krpeljima. Urbana područja su generalno isparcelisana i podeljena na sredine različitih tipova vegetacije i namene, koje imaju manji biodiverzitet divljih životinja, u odnosu na prirodne ekosisteme. Pored toga, urbanizacija određene sredine može uticati i na uvođenje novih vrsta koje će posledično dovesti do eradikcije autohtonih vrsta za to stanovište. Prigradska područja uglavnom okupiraju predatori srednje veličine, kao i ptice koje su uglavnom stalna populacija u tim delovima (71, 97, 98).

U ranijim istraživanjima, identifikovane su aktivnosti (lov, ribolov, kampovanje, drugi vidovi rekreacije u prirodi i na zelenim površinama u urbanim sredinama) kao i profesije (šumari, ribočuvari, lovočuvari, poljoprivrednici, veterinari, terenski istraživači iz oblasti prirodnih nauka) koje zbog svoje prirode podrazumevaju povišen rizik za kontakt sa krpeljima i posledično izlaganje borelijama. Ipak, uočeno je i postojanje mikrožarišta unutar jedne sredine, gde je populacija krpelja značajno veća nego u ostatku ukupne teritorske jedinice (npr. pojedini parkovi u gradovima, pojedini delovi šuma i sl.) (76, 99–103).

Tokom ispitivanja u Holandiji, uočeno je da su klasteri visokog rizika za izlaganje ljudi krpeljima koncentrisani duž rubova šuma i mesta za rekreaciju. Rubovi šuma su identifikovani s obzirom na to da je uočeno da ljudi imaju tendenciju da održavaju aktivnosti uglavnom duž rubova šume radije nego što to čine unutar nje. U tim slučajevima promenljiva vegetacija prikazana je kao najrizičniji teren, a prisustvo ljudi je odredilo gde će se krpelji najviše kretati (104).

Demografske karakteristike poput pola i starosti kao faktora rizika za izlaganje krpeljima ispitivane su u nekoliko studija. Iako se sporadično prijavljuje blago veća zastupljenost ženskog pola, nema značajne razlike u zastupljenosti određenog pola u smislu infestacije krpeljima (105–107). Ipak, temeljna analiza prikazana u tezi Mladenovića pokazala je da su na teritoriji Beograda ubodu krpelja češće izloženi muškarci vojne profesije i žene civilne profesije (107).

S druge strane, starost pacijenata je prikazana kao značajan faktor za izlaganje krpeljima. U ispitivanju u Nju Hempširu(SAD) najveći broj pacijenata je spadao u grupu starosti do 9 godina, kao i preko 65 godina, dok je grupa autora iz Istanbula (Turska) prijavila da je odnos pedijatrijskih pacijenata naspram odraslih bio 2 : 1 (105, 106). S druge strane, ispitivanje u Belgiji je prikazalo da je starosna grupacija koju najčešće napadaju krpelji od 45 do 64 godina. Mladenović prijavljuje prosečnu starost pacijenata sa ubodom krpelja u Beogradu od $39,23 \pm 17,95$ godina (107).

Uočeno je da učestalost infestacije ljudi krpeljima varira u skladu sa godišnjim dobom, pa je tako u studiji sprovedenoj u Istanbulu najveći broj pacijenata prijavljen u leto i odgovara unimodalnoj krivi (106), u Nju Hempširu je pik prijavljivanja registrovan u proleće, ali su zabeležene učestale infestacije krpeljima i tokom jeseni, što odgovara bimodalnoj krivi aktivnosti krpelja (105). Bimodalna kriva infestacije ljudi krpeljima uočena je i na severu Evrope (108). Mladenović prijavljuje unimodalnu krivu u Beogradu, sa pikom infestacija u proleće (107).

1.7 Demografske karakteristike kao faktori rizika za obolevanje od lajmske borelioze

Godišnja distribucija slučajeva lajmske borelioze zavisna je od distribucije aktivnosti krpelja i njihove infestacije. Godišnji pik slučajeva lajmske borelioze obično prati pik aktivnosti krpelja sa zakašnjenjem od 1 do 4 nedelje, koliki je inkubacioni period potreban za razvoj prve faze bolesti – migratornog eritema (109).

Pik slučajeva rane neuroborelioze obično prati pik infestacije krpeljima sa zakašnjenjem od 3 do 9 nedelja, dok lajmski artritis pokazuje kašnjenje od 1,5 do 8 meseci. Kasna neuroborelioza se obično javlja 6–12 meseci nakon pika sezonske aktivnosti krpelja koji infestiraju ljude (20, 109, 110). Istraživanja na populaciji Severnobačkog okruga i Beograda ukazala su na to da je pik obolevanja na tim teritorijama tokom letnjih meseci (107, 111).

Iako od lajmske borelioze mogu oboleti ljudi svih starosnih kategorija, distribucija starosti kod obolelih od lajmske borelioze odgovara distribuciji starosti pacijenata infestiranih od strane krpelja. Kriva koja opisuje distribuciju starosnih kategorija najčešće pokazuje dva pika, u starosnoj dobi od 5 do 9 godina i od 50 do 64 godina (109, 112).

Demografska analiza pola obolelih pacijenata ukazuje na to da postoji razlika u različitim delovima sveta. U SAD su blago brojniji pacijenti muškog pola oboleli od lajmske borelioze (51,9%). U Evropi je uočeno da osobe ženskog pola češće obolevaju (55–60%). Ispitivanje na teritoriji Severnobačkog okruga ukazalo je na slične rezultate, gde većinu obolelih čine osobe ženskog pola (111). Dosadašnjim ispitivanjima nije utvrđena povećana učestalost opšteg obolevanja stanovništva u ruralnim naspram urbanih sredina i obrnuto (109, 113). Ipak, istraživanja na nivou pojedinih administrativnih zona u Evropi pokazala su da stanovnici pojedinih

gradova u Finskoj, Rusiji i Bugarskoj imaju veću incidencu obolevanja nego njihovi sugrađani u ruralnim sredinama (109).

1.8 Patogeneza lajmske borelioze

Nakon uboda zaraženog krpelja, i ostvarivanja prenosa borelija u organizam čoveka preko pljuvačke, koju luči tokom celog krvnog obroka, faktori koji utiču na to da li će se bolest razviti jesu količina prenetih borelija, njihova virulencija i imunitet domaćina (čoveka).

Spoljašnji omotač borelija iz sensu lato kompleksa razlikuje se od većine proteobakterija, s obzirom na to da ne poseduje lipopolisaharide, već mnogo lipoproteina. Ekspresija tih lipoproteina varira u zavisnosti od uslova spoljašnje sredine. Neki su lipoproteini eksprimirani isključivo tokom boravka u krpelju, a neki tokom boravka u kičmenjaku. Sposobnost borelija da modifikuje antigenu strukturu svog spoljašnjeg omotača omogućuje im da izbegnu dejstvo imunog sistema domaćina (114).

Nakon što krpelj započne uzimanje prvih porcija krvi, dolazi do promena u genskoj ekspresiji strukturnih proteina borelija, koje se u tom trenutku nalaze u srednjem crevu krpelja. Borelije zatim migriraju ka pljuvačnim žlezdama i počinju da eksprimiraju *OspC* protein, koji je neophodan za ostvarivanje patogenosti kod sisara. Uporedo s tim, manje se eksprimiraju *OspA* i *OspB* proteini, koji su ključni za adheriranje za *TROSPA* receptore na ćelijama krpelja koje se nalaze u srednjem crevu i pljuvačnim žlezdama (115–117).

Neophodnost *OspC* proteina za ostvarivanje infekcije kod sisara dokazano je na animalnim modelima – borelije nisu uspele da izazovu infekciju kod jedinki koje su zaštićene anti-*OspC* antitelima (117, 118).

Povišenje temperature unutar krpelja tokom ingestije krvi jedan je od ključnih momenata koji dovodi do započinjanja procesa ekspimiranja novih setova proteina na površini borelije (117). Borelija se u domaćina izlučuje najčešće vezana za pljuvačni protein *SALP 15* (*Salivary protein 15*), koji inhibira aktivaciju CD4+ limfocita (117).

Protein *SALP 25D* (*Salivary protein 25*), takođe prisutan u pljuvački krpelja, neutrališe oksidativni stres koji nastaje reakcijom neutrofilnih granulocita domaćina i ometa njihovu hemotaksiju, dok protein *Sialostatin L* ometa aktivaciju mastocita inhibicijom interleukina 9. Borelije tokom istog perioda ekspimiraju *OspE*, *p21*, kao i *CRASP* proteine, kojima adheriraju za faktor H i blokiraju aktivaciju C3b komponente sistema komplemenata čoveka (119–122).

Kao posledica nedostatka gena za sintezu toksina i enzima za razgradnju ekstraćelijske supstancije domaćina, smatra se da patogeni sojevi borelija dovode do infekcije i daljeg širenja posredstvom ćelija domaćina i njihovih enzima, kako u ranoj, tako i u kasnijim fazama oboljenja. U zavisnosti od organskog sistema u kojem se nalaze i od pritiska imunog odgovora domaćina, spirohete ekspiruju niz lipoproteinskih struktura na svojoj ćelijskoj membrani u različitim vremenskim intervalima. Najvažniji antigeni specifični za borelije među njima jesu *DbpA*, *OspC*, *BBf01* i *VlsE* (122, 123). Smatra se da oni stimulišu imuni odgovor domaćina posredstvom *Toll-like* receptora 1 i 2 (*TLR 1* i *2*). Pored mehanizama za izbegavanje *TLR* aktivacije imunog odgovora, sposobnost kretanja borelije kroz tkivo domaćina (oko 4 $\mu\text{m/s}$) obezbeđuje dodatnu zaštitu od fagocitoze (124).

1.9 Faze lajmske borelioze

Najčešće se opisuju 3 faze lajmske borelioze:

- Faza I – rana/lokalizovana infekcija (migratorni eritem)
- Faza II – rana diseminovana infekcija (multipli migratorni eritem, borelijski limfocitom, rana neuroborelioza, lajmski karditis)
- Faza III – kasna/perzistentna infekcija (lajmski artritis, hronični atrofični akrodermatitis, hronična neuroborelioza)

1.9.1 Rana (I) faza lajmske borelioze (migratorni eritem)

Migratorni eritem predstavlja prvu fazu i najčešću manifestaciju lajmske borelioze. Definisane migratornog eritema izvišili su Evropska konzensusna akcija za lajmsku boreliozu (*European Concerted Action on Lyme Borreliosis – EUCALB*), Američki centar za kontrolu i prevenciju bolesti (*Center for Disease Control and Prevention – CDC*), kao i Radna grupa za lajmsku boreliozu Evropskog udruženja za kliničku mikrobiologiju i infektivne bolesti (*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Study Group for Lyme Borreliosis – ESCMID: ESGBOR*).

Definicija CDC glasi (125):

Migratorni eritem je kožna lezija koja tipično počinje kao crvena makula ili papula i širi se tokom nekoliko dana do nedelja formirajući veliku kružnu leziju, često sa delimičnim centralnim rasvetljenjem. Primarna lezija mora da dostigne veličinu od 5 centimetara ili više.

Sekundarne lezije se mogu javiti. Kružne eritematozne lezije koje se javljaju unutar nekoliko sati nakon uboda krpelja posledica su reakcije hipersenzitivnosti i ne smatraju se migratornim eritemom.

Kod većine pacijenata, migratorni eritem je praćen drugim akutnim simptomima koji se javljaju povremeno, kao što su zamor, groznica, glavobolja, blaga ukočenost vrata, bolovi u zglobovima i mišićima.

Definicija EUCALB glasi (126):

Migratorni eritem (ranije zvan hronični migratorni eritem) najčešće se razvija iz makule ili papule i širi se tokom nekoliko dana do nedelja formirajući crvenu ili plavo-crvenu promenu, često sa centralnim rasvetljenjem.

Front promene je često izražen, intenzivno obojen, ali nije uočljivo izdignut od ostatka kože. Većina migratornih eritema je većeg prečnika od 5 cm, ali se dijagnoza može postaviti iako je prečnik manji.

Sekundarne lezije se mogu javiti. Pacijenti sa migratornim eritemom često imaju nespecifične simptome, koji su često povremeni i uključuju zamor, groznicu, glavobolju, blagu ukočenost vrata, bolove u zglobovima i mišićima.

Sve navedene manifestacije mogu da budu samoograničavajuće, ali u odsustvu adekvatne terapije mogu perzistirati, ponovo se javiti ili napredovati.

Definicija ESCMID: ESGBOR glasi (127):

Inicijalna prezentacija lajmske borelioze predstavlja leziju kože – migratorni eritem, patognomonični znak koji je povezan sa 3 vrste borelija, koji se javlja na mestu uboda krpelja u obliku crvene lezije koja se postepeno širi i često pokazuje centralno rasvetljenje.

Front promene je često izražen, intenzivno obojen, nije izdignut od ostatka kože. Migratorni eritem je retko diseminovan, i najčešće se uočava na mestu inokulacije borelija.

Tim infektologa i mikrobiologa Univerzitetskog kliničkog centra u Ljubljani u Sloveniji, primenjuje modifikovanu definiciju CDC-a (20):

Migratorni eritem se definiše kao eritematozna kožna lezija koja se razvija unutar nekoliko dana ili nedelja nakon infekcije na mestu uboda krpelja, gde su borelije inokulisane u kožu. Tipično počinje da se javlja kao crvena makula ili papula i širi se tokom nekoliko dana ili nedelja u obliku ovalne ili okrugle lezije sa centralnim rasvetljenjem ili bez njega.

Za pouzdanu dijagnozu, primarna lezija mora dostignuti prečnik od 5 cm ili veći. Lezija manja od 5 cm kvalifikuje se za dijagnozu migratornog eritema ako ispuni sve sledeće uslove: razvija se na mestu uboda, postoji vremenski interval između uboda krpelja i pojave lezije, kao i da se lezija uvećava.

Multipli migratorni eritem se definiše kao prisustvo 2 ili više kožne lezije, od kojih najmanje jedna ispunjava kriterijum veličine za solitarni migratorni eritem.

Migratorni eritem se najčešće javlja nakon inkubacionog perioda od 1 do 4 nedelje (prosečno 7 do 12 dana) od uboda krpelja, ipak navedeni su i slučajevi duže inkubacije (20). Pri davanju odgovarajuće antibiotske terapije, promena se najčešće povlači u roku od nekoliko dana. Kod nelečenih pacijenata zabeleženo je perzistiranje lezije i do 6 meseci. Pored toga, i nakon

povlačenja lezije na koži, kod nelečenih su iz bioptata sa mesta uboda krpelja uspešno kultivisane borelije iz sensu lato kompleksa (128).

Tačan mehanizam nastanka migratornog eritema još uvek nije razjašnjen. Smatra se da značajne uloge u lokalnoj diseminaciji borelija imaju produkti fibroblasta i zapaljenskih ćelija koji razgrađuju ekstracelularni matriks domaćina na mestu infekcije, kao i sposobnost borelija da se kreću u različitim medijumima (117, 129).

1.9.2 Faza II lajmske borelioze (multipli migratorni eritem, borelijski limfocitom, rana neuroborelioza, lajmski karditis)

Borelijski limfocitom je solitarna promena u vidu edema prečnika do nekoliko centimetara, koja se sastoji od gustog limfocitnog infiltrata kože i potkožnog tkiva, što je posledica infekcije borelijama. Infiltrat limfocita je poliklonalni, gde su dominantna komponenta B limfociti, koji mogu formirati germinativne centre. Kod dece se borelijski limfocitom najčešće uočava u predelu ušne školjke, a kod odraslih u predelu bradavica dojki.

Rana neuroborelioza se može javiti unutar nekoliko nedelja ili meseci od uboda krpelja. Najčešće se sastoji od limfocitnog meningitisa i zahvatanja kranijalnih i perifernih nerava. Najizraženiji klinički simptom najčešće je bol, kao posledica radikuloneuritisa. Bol je najčešće intenzivan i najizraženiji tokom noći, usled čega pacijenti ne mogu adekvatno spavati nedeljama. Ukoliko je bol lokalizovan u predelu abdomena i grudnog koša, pacijenti najčešće navode pojasni tip bola.

Zahvatanje motornih nerava može dovesti do pareze, koja je najčešće asimetrična i koja nije uvek klinički uočljiva. Kod evropske rane neuroborelioze najčešće nema povišenja temperature, mučnina je blaga do odsutna, dok je povraćanje redovno odsutno, te klinička slika podseća na blagi i atipično protrahovani virusni meningitis sa povremenim poboljšanjima i deterioracijama. Meningealni znaci su blagi ili odsutni, dok je nalaz likvora patološki i sastoji se od limfocitne pleocitoze, normalne ili blago povišene koncentracije proteina i normalne ili umereno snižene koncentracije glukoze (101, 42).

Iako se rana neuroborelioza može manifestovati na bilo kojem kranijalnom nervu, *n. facialis* je najčešće zahvaćen, što rezultuje unilateralnom ili bilateralnom parezom *n. facialis* (8).

Lajmski karditis se najčešće javlja unutar 2 meseca od početka infekcije, i to češće kod muškaraca nego kod žena. Zahvatanje srca infekcijom može biti asimptomatsko. Ukoliko se simptomi jave, najčešće tegobe su slabost, sinkope, dispneja, palpitacije i bol u grudima. Pacijenti sa simptomatskim lajmskim karditisom najčešće ispoljavaju u akutnoj formi različit stepen povremenih A-V blokova kao posledica poremećaja sprovodnog sistema srca, koji su ponekad u vezi sa dokazanim mioperikarditisom. Tok bolesti je najčešće povoljan, s obzirom na to da i kod lečenih i kod nelečenih antibioticima kompletni A-V blok nestaje unutar 7 dana, dok abnormalnosti u nalazu EKG-a nestaju u roku od 3 do 6 nedelja (8, 46).

1.9.3 Kasna (III) faza lajmske borelioze (lajmski artritis, hronični atrofični akrodermatitis, kasna neuroborelioza)

Lajmski artritis je glavna zglobna manifestacija u sklopu lajmske borelioze. Predstavlja zapaljenski proces zglobova povezan sa infekcijom borelijama iz sensu lato kompleksa. Dominantno je monoartikularne ili oligoartikularne forme i tipično zahvata koleno. Spektar zglobnih manifestacija kod lajmskog artritisa može se podeliti na (8):

- Atralgijske (koštano-mišićni bol) bez objektivnog nalaza na zglobovima;
- Artritis (akutni ili hronični) sa objektivnim kliničkim nalazima;
- Hronično zahvatanje zglobova i kostiju ispod kože zahvaćene sa AHA.

Glavna i najvažnija reumatska manifestacija lajmske borelioze jeste artritis, koji se najčešće prezentuje atralgijama koje prethode artritisu ili se javljaju zajedno sa njim ili nakon njega.

AHA je kožna manifestacija hronične infekcije borelijama. Najčešće je locirana na akralnim delovima tela, na ekstenzornim delovima šaka i stopala. U početku je lezija jednostrana, dok kasnije postaje manje-više simetrična. Lezija počinje da se manifestuje nekoliko meseci ili godina nakon inokulacije borelija u telo čoveka. Manji deo pacijenata navodi da je imalo i druge znake lajmske borelioze, poput migratornog eritema, zahvatanje nervnog sistema, srčanih tegoba ili artritisa pre početka AHA. Asbrink je uočio da je 18% pacijenata sa migratornim eritemima koji su se spontano povukli razvilo AHA nakon 6 meseci do 8 godina (26, 109).

Iako se periferni neuritis razvija kod više od polovine osoba sa AHA lezijama, kasna neuroborelioza kao zaseban entitet smatra se veoma retkom. Do 10% pacijenata sa nelečenim

Garin-Budažu-Banvart sindromom razvija karakteristike diseminovanog encefalomijelitisa koji mogu podsećati na procese koji se javljaju kod multiple skleroze (26, 109).

1.10 Dijagnostika i terapija tokom prve faze lajmske borelioze

U kontekstu dijagnostike lajmske borelioze, evidentna je neinformisanost lekara u vezi s pravilnom upotrebom dijagnostičkih metoda (130–132). Jedan od gorućih problema jeste stav da je pozitivan serološki nalaz (nalaz IgM i/ili IgG antitela protiv antigena borelija putem ELISA/IFA i *Western Blot* testa) dovoljan za postavljanje dijagnoze lajmske borelioze kod pacijenata sa nespecifičnim tegobama ili kod pacijenata koji uopšte ne prijavljuju tegobe, ali se sećaju da ih je infestirao krpelj (133).

U Republici Srbiji trenutno ne postoje sveobuhvatni vodiči vezani za dijagnostiku i lečenje bolesti koje prenose krpelji. U službenom obaveštenju Ministarstva zdravlja Republike Srbije od 7. 5. 2018. navedene su mere koje treba da se primenjuju u zdravstvenim ustanovama prilikom zbrinjavanja pacijenta sa ubodom krpelja. Preporuke vezane za dijagnostičko-terapijski tretman pacijenta jesu sledeće:

- Potrebno je posmatrati mesto uboda, te ako se u peridou od 5 do 30 dana javi okruglo pečatasto crvenilo promera preko 5 cm, tada je potrebno da se pacijent javi nadležnom infektologu radi određivanja terapije.
- U slučaju da nakon mesec dana nema promena na koži, može se uraditi serološko testiranje ELISA testom na IgM i IgG antitela.
- U slučaju pozitivnog nalaza (IgM) može se dati terapija doksiciklin 2 x 100 mg za odrasle, ili amoksicilin za decu u trajanju od 21 dan ili se pacijent može uputiti infektologu.

Zvaničan stav ECDC i CDC jeste da su simptomi i znaci centralni elementi dijagnostike lajmske borelioze, dok je serološka analiza opravdana samo u slučaju potvrde kliničke hipoteze (14, 15). Utvrđeno je da je prediktivna vrednost seroloških testova u oblastima sa niskom

incidencijom nezadovoljavajuća i niža od 20% (134). Stav ECDC jeste da je tipični migratorni eritem jedini znak koji omogućava pouzdanu kliničku dijagnostiku lajmske borelioze. Ipak, u skladu sa trenutnim saznanjima to pravilo važi samo za Evropu, s obzirom na to da na teritoriji SAD slične lezije nastaju kod Mastersove bolesti (*Southern tick-associated rash illness* – STARI). Veliki deo ostalih tegoba i znakova, pogotovu kada se jave zasebno imaju minimalnu dijagnostičku značajnost. Laboratorijska dijagnostika borelijske infekcije potrebna je kod svih manifestacija lajmske borelioze, osim kod tipičnih kožnih promena (20).

Pored toga, PCR analiza krpelja na prisustvo DNK borelija kao brzi skrining test postaje sve popularnija metoda koja se koristi pri dijagnostici (135, 136). Usled toga, radna grupa za lajmsku boreliozu Evropskog udruženja kliničkih mikrobiologa i infektologa (ESCMID: ESGBOR) zatražila je ukidanje takvih analiza u cilju postavljanja dijagnoze, pre svega ukidanje brzih PCR testova krpelja zbog loše standardizacije reagensa, kao i potencijalne mogućnosti izdavanja lažno negativnih rezultata (137). S druge strane, ECDC preporučuje rutinsku zoološku identifikaciju krpelja uklonjenog sa čoveka radi dobijanja uvida u moguće bolesti koje se mogu razviti, kao i radi procene rizika za obolevanja pacijenata (127). Detekcija DNK borelija u krpelju (pozitivan PCR nalaz) ne garantuje infekciju pacijenta, s obzirom na to da se retko dobija uvid u patogenost genospecijesa borelije i uspostavljanje transmisije sa krpelja na pacijenta (138). Zvanični vodiči više zemalja ne preporučuju rutinsku primenu takvih analiza krpelja (137, 139–141), dok u našoj zemlji ne postoje jasne smernice u vezi s korišćenjem ove analize za postavljanje dijagnoze lajmske borelioze.

Iako je incidencija lajmske borelioze u Republici Srbiji u porastu (5,44/100.000 stanov. 2000. god.; 9,84/100.000 stanov. 2010. god.; 13,08/100.000 stanov. 2013. god.) (142), prisutno je pitanje koliko je dijagnoza postavljeno u skladu sa trenutnim evropskim standardima usled česte

neusaglašenosti primenjivanih dijagnostičkih protokola na našim prostorima sa onima koje trenutno preporučuje ECDC (143).

Usled aktivnog širenja patogenih uzročnika bolesti prenosivih krpeljima, tokom 2020. godine u R. Srbiji detektovan je pacijent (Slika 3) sa bolešću izazvanom od strane rikecija iz grupe pegavih groznica (*Rickettsia helvetica*), čiji je vektor *I. ricinus*, a čija je klinička slika delila više karakteristika sa prvom fazom lajmske borelioze – lokalno crvenilo, odsustvo sistemskih tegoba i mirovanje akutnih laboratorijskih markera inflamacije (144). U takvim slučajevima, jedini način za postavljanje adekvatne dijagnoze jeste strogo poštovanje dijagnostičkih priručnika, koji su adaptirani za aktuelnu epidemiološku situaciju u našoj zemlji.

Lekovi izbora za lečenje rane faze lajmske borelioze jesu doksiciklin i amoksicilin. Terapijski režim podrazumeva *per os* primenu terapije i ne zahteva hospitalizaciju pacijenta. Iako je u Srbiji aktuelna preporuka da antibiotski terapijski režim treba trajati 21 dan, u većini zemalja Evrope terapijski protokol je revidiran, te je redukovan na 14 dana (110, 141, 145).



Slika 3 – Lokalna infekcija izazvana uzročnikom *Rickettsia helvetica*. Crne strelice pokazuju rubove lezije. Crvena strelica pokazuje mesto prethodne infestacije (144).

1.11 Prevencija lajmske borelioze

Smatra se da je najbolja prevencija lajmske borelioze sprečavanje infestacije krpeljima, pre svega nošenjem zaštitne odeće. Preporučuje se nošenje dugih rukava, dok duge pantalone treba da budu uvučene u čarapu. Odeća treba biti svetlih boja kako bi se lakše uočio krpelj na njoj.

Danas je poznato da postoje supstancije u vidu repelenata koje ometaju olfaktorni sistem krpelja, oni ometaju krpelja pri detekciji domaćina i ne mogu ih ubiti. Repelente treba koristiti samo kao dodatnu zaštitu pored zaštitne odeće. Supstancije koje se smatraju efikasnim repelentima jesu DEET (N,N-dietil-meta-toluamid), IR35/35 i eterično ulje limunovog eukaliptusa (76).

Sekundarna prevencija uključuje mere koje se primenjuju nakon uboda krpelja. To podrazumeva mehaničku ekstrakciju krpelja pomoću pincete, bez korišćenja supstanci poput etra, ulja i/ili laka za nokte. Nakon uklanjanja krpelja, mesto prodora rilice se treba dezinfikovati korišćenjem antiseptika (141).

Stav više priručnika za dijagnostiku i lečenje lajmske borelioze, kao i ECDC-a jeste da se započinjanje preventivne antibiotske terapije ne preporučuje, bez obzira na starost pacijenata, perioda parazitiranja i razvojne faze uklonjenog krpelja (127, 140, 141).

Najvažnija mera prevencije zapravo je edukacija stanovništva o svemu gorenavedenom. Edukacija o vremenu u kojem treba ukloniti krpelja, načinu na koji ga ukloniti, dijagnostičkim metodama koje postoje, o tome šta posmatrati nakon uboda, i što je najvažnije, objasniti da se ne mogu svi krpelji ukloniti, već da su ljudi dužni da vode računa o prevenciji.

2. PROBLEM

Uprkos naporima da se poboljša kontrola lajmske borelioze, u poslednjim decenijama ova zoonoza je i dalje najrasprostranjenija bolest koju prenose artropode u velikom broju regiona severne hemisfere. Računanje incidencije lajmske borelioze u Evropi predstavlja izazov, s obzirom na to da u više zemalja lajmska borelioza ne podleže prijavljivanju, što je slučaj i u R. Srbiji u poslednjih nekoliko godina.

Smatra se da će lajmska borelioza verovatno postati sve relevantniji zdravstveni problem u bliskoj budućnosti zbog složenih interakcija između različitih uslova spoljašnje sredine i socio-ekonomskih faktora, koji će uticati na različite aspekte epidemiologije bolesti, kao i ekologije rezervoara i vektora borelija.

Kliničke manifestacije lajmske borelioze predstavljaju jasno definisane simptome i znakove od kojih su mnogi prolazni, usled čega može doći do razvoja hroničnih i teških, napredujućih i nepovratnih promena usled neblagovremenog reagovanja. Od težih komplikacija koje se razvijaju usled dugotrajne infekcije patogenim borelijama ističu se oštećenja na zglobovima, teška kožna oštećenja, gubitak vida, razvoj simptoma sličnih multiploj sklerozi i sifilisu. Ne sme se izostaviti ni psihička patnja pacijenta usled konstantnog straha od daljeg razvoja bolesti i pogoršanja tegoba.

U određenim slučajevima lajmske borelioze, rani simptomi se ne pojavljuju, već se tegobe razvijaju kroz nekoliko meseci, kada više ni pacijent, a ni izabrani lekar bolest ne povezuju sa ubodom krpelja. Kao rezultat neprepoznavanja lajmske borelioze nad pacijentom sprovodi se spektar dijagnostičkih procedura, koje predstavljaju ekonomsko opterećenje, a retko upućuju na pravu etiologiju.

U poslednjih nekoliko godina učinjeni su značajni napori u cilju standardizacije dijagnostičkih protokola lajmske borelioze u Evropi. S obzirom na to da u Republici Srbiji još uvek ne postoji zvanični vodič za dijagnostiku i lečenje lajmske borelioze, niti smernice koje su kompatibilne sa preporukama Evropskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti, prisutan je dvostruki rizik: da je upitna validnost mnogih dijagnoza lajmske borelioze postavljenih na osnovu pozitivnih laboratorijskih nalaza i nejasne kliničke slike u proteklim godinama, kao i mogućnost da postoje oboleli pacijenti kod kojih nije blagovremeno dokazana lajmska borelioza usled negativnih laboratorijskih nalaza.

Da bi se olakšalo postavljanje radne dijagnoze lajmske borelioze lekarima opšte prakse i specijalistima koji ordiniraju u ambulantama, gde se pacijenti sa ranom fazom lajmske borelioze prvo javljaju, potrebno je identifikovati faktore rizika za kontakt stanovništva sa krpeljima. Potrebno je ispitati prediktivne vrednosti najčešće korišćenih skrining testova za obolevanje od prve faze lajmske borelioze radi ispitivanja njihove efikasnosti da predvide da li će osoba koju je infestirao krpelj oboleti od lajmske borelioze, kako bi se stvorila osnova koja bi omogućila početak procesa standardizacije smernica za dijagnostiku i lečenje lajmske borelioze u našoj zemlji.

3. HIPOTEZE

1) Broj ispitanika koje je infestirao krpelj, kao i broj obolelih od prve faze lajmske borelioze značajno je veći u starosnim kategorijama od 5 do 9 i od 50 do 64 godina naspram ostalih starosnih kategorija, a učestalost infestacije krpelja je značajno veća u proleće i leto naspram ostalih godišnjih doba, pol ispitanika i tip naselja ne utiču značajno na infestaciju krpelja i obolevanje od prve faze lajmske borelioze.

2) Pozitivna prediktivna vrednost seroloških (ELISA, IFA) i molekularnih (PCR analiza krpelja na DNK *B. burgdorferi* sensu lato kompleksa) skrining testova u dijagnostici prve faze lajmske borelioze kod osoba infestiranih krpeljima manja je od 20%, te se ne mogu koristiti kao zamena za fizikalni pregled pacijenata za postavljanje dijagnoze prve faze lajmske borelioze.

4. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja su:

- 1) Utvrditi efekat pola i starosti stanovništva Južnobačkog okruga i efekat godišnjeg doba i tipa naselja na izlaganje ubodu krpelja i obolevanje od rane faze lajmske borelioze.
- 2) Ispitati pozitivnu i negativnu prediktivnu vrednost seroloških (ELISA, IFA) i molekularnih (PCR analiza krpelja na DNK *B. burgdorferi* sensu lato kompleksa) skrining testova u dijagnostici rane faze lajmske borelioze kod osoba koje je infestirao krpelj naspram fizikalnog pregleda kao zlatnog standarda za postavljanje dijagnoze rane faze lajmske borelioze.

5. METODE I ISPITANICI

Pacijenti infestirani krpeljima

U istraživanju su obrađeni podaci pacijenata kojima je zdravstvena zaštita pružena u Ambulanti za lajmsku boreliozu Pasterovog zavoda u Novom Sadu (Služba za prevenciju i sprečavanje širenja besnila i drugih zaraznih bolesti) tokom 2018. i 2019. godine. U istraživanje su uključeni pacijenti sa prebivalištem u Južnobačkom okrugu koji su se javili sa krpeljom već uklonjenim ili sa pričvršćenim krpeljom, koji je uklonjen u Pasterovom zavodu.

Na prvom pregledu uzimana je epidemiološka anketa vezana za suspektne geografske lokalitete za nastanak infestacije krpeljom, kao i osnovni anamnestički podaci (generalije, ranije bolesti, trenutna primena medikamenata, alergije, trenutne tegobe). Pacijenti su na osnovu starosti podeljeni u 4 starosne kategorije: od 0 do 10, od 11 do 19, od 20 do 65 i > 65 godina.

Pacijenti su praćeni od strane lekara u skladu sa zvaničnim preporukama ECDC, gde je zlatni standard za postavljanje dijagnoze prve faze lajmske borelioze prisustvo migratornog eritema. Za definisanje kriterijuma za postavljanje dijagnoze migratornog eritema korišćena je definicija CDC-a modifikovana od strane infektologa i mikrobiologa Univerzitetskog kliničkog centra u Ljubljani u Sloveniji, u skladu sa istraživanjima ranije objavljenim (68, 129, 146).

U periodu od 6 meseci nakon uboda krpelja vršene su kontrole od strane lekara u vidu fizikalnog pregleda i uzimanja anamnestičkih podataka orijentisanih ka simptomima lajmske borelioze.

U slučaju postavljanja dijagnoze migratornog eritema pacijentima se ordinirala terapija doksiciklinom 2 x 100 mg dnevno kod odraslih ili amoksicilinom za decu u trajanju od 14 dana.

Svi podaci vezani za pružanje zdravstvene zaštite pacijentima (opšte informacije o pacijentima, rezultati analize krpelja, rezultati laboratorijskih analiza, podaci sa kontrolnih pregleda) pohranjeni su u bazi podataka *Access (Microsoft Office 2013)*, dizajniranoj isključivo za potrebe rada Ambulante za lajmsku borelizu Pasterovog zavoda.

Zoološki pregled krpelja

Identifikacija vrste, razvojnog stadijuma i perioda parazitiranja krpelja sprovedena je u Laboratoriji za parazitologiju (Služba za mikrobiološku i drugu dijagnostiku Pasterovog zavoda). Ispitivanje krpelja je vršeno pomoću stereo-mikroskopa (ST-30-2LR Bino Stereo, Optika, Italija), pod uveličanjem 20–40x. Identifikacija vrste razvojne faze vršena je na osnovu odgovarajućih ključeva (147). Nakon zoološke analize krpelji su stavljeni u pojedinačne epruvete (Eppendorf, Nemačka, Cat. EP0030124537) sa 70% etanola na sobnoj temperaturi.

Ispitivanje zaraženosti krpelja spirohetama *B. burgdorferi* sensu lato kompleksa primenom metode *Real-Time PCR*

Nakon dobijanja saglasnosti, formirani su nasumični pojedinačni uzorci od 90 krpelja za molekularno ispitivanje, koji su upareni sa podacima dobijenim kliničkim praćenjem pacijenata na kojima su parazitirali. Ekstrakcija DNK iz krpelja izvršena je korišćenjem *NucleoSpin® Tissue*

kompleta za ekstrakciju genomske DNK (*Macherey-Nagel*, Nemačka) manuelnom metodom. Svaki krpelj uklonjen sa pacijenata homogenisan je korišćenjem sterilnih štapića u 180 µL Lysis pufera (T1 *buffer*) i 25 µL Proteinaze K. Homogenati su inkubirani 3 sata na 56° C, nakon čega je ekstrakcija DNK izvršena u skladu sa preporukama proizvođača. Pročišćena DNK je isprana sa spin koloma korišćenjem 50 µL pufera za ispiranje. Mastermiks je pripremljen u skladu sa preporukama proizvođača (*Bioron*, Nemačka, Cat. VBD1499).

Real-Time PCR analiza je izvršena na *Applied Biosystems StepOne* aparatu (*Applied Biosystems*, SAD) korišćenjem kompleta *RealLine Borrelia burgdorferi* s.l. (*Fla-format*), sa *Taqman* probama i kanalima za detekciju FAM (495-520 nm) i ROX (575-602 nm) (*Bioron*, Nemačka, Cat. VBD1499). Program PCR analize je imao 3 faze, od kojih je poslednja amplifikacija. Prva faza predstavlja ciklus od 2 minuta na 50° C, druga faza ciklus od 2 minuta na 95° C, dok je fazu elongacije činilo od 50 ciklusa, i to 10 sekundi na 95° C i 40 sekundi na 60° C. Očitavanje rezultata je izvršeno u skladu sa preporukama proizvođača.

Molekularna PCR analiza korišćena u Pasterovom zavodu za detekciju DNK *B. burgdorferi* s. l. kompleksa u krpeljima pokazala je 100% senzitivnost i 100% specifičnost prilikom spoljašnjeg međulaboratorijskog testiranja (*proficiency testing – external quality assessment*) pod koordinacijom organizacije *Quality Control for Molecular Diagnostics – QCMD* (Glazgov, Ujedinjeno Kraljevstvo).

Uzorkovanje krvi za serološke analize

Uzorkovanje pune venske krvi, iz koje je izdvajan krvni serum, vršeno je venepunkcijom tokom kliničkog praćenja pacijenata sa kojih su uklonjeni krpelji korišćenjem epruveta BD *Vacutainer*® *Serum Separation* epruveta i *Safety-Lok*™ sistema (Becton, Dickinson and Company, Oakville, SAD). Krvni serum za detekciju IgM i IgG izotopa protiv *B. burgdorferi* s.l. uzorkovan je od asimptomatskih pacijenata u skladu sa preporukama Ministarstva zdravlja Republike Srbije 4 nedelje nakon uklanjanja krpelja. Pored toga, serološko ispitivanje je indikovao ordinirajući lekar u slučaju da pacijent razvije prvu fazu lajmske borelioze u 30 dana od uklanjanja krpelja, kada su ispitivane IgM i IgG klase antitela istovremeno. Za studiju su prihvaćeni i rezultati ELISA testova koje je pacijent izvršio i u drugim državnim javnozdravstvenim ustanovama sa uputom svog lekara i poneo sa sobom na kontrolni pregled.

Serološke analize

Test indirektne imunofluorescencije (IFA test)

IFA test je serološka analiza za detektovanje IgM i IgG antitela protiv borelija sensu lato kompleksa. Za potrebe ovog istraživanja korišćen je komercijalni IFA test (Euroimmun AG, Nemačka, kat. broj: FI 2136-1010-1 G i FI 2136-1010-1 M), koji je validiran od strane proizvođača. Razmazi poreklom od borelija iz sensu lato kompleksa inkubiraju se sa razređenim serumom ispitanika. Radno razređenje seruma za koje je seroreaktivnost beležena kao pozitivan ili negativan nalaz iznosilo je 1 : 100. Ukoliko je reakcija pozitivna, IgG antitela se vezuju za antigen borelija na pločici. Na vezana antitela se zatim nanose sekundarna antihumana antitela

vezana sa fluoroforom, te se postojanje antiborelijskih antitela kod pacijenata beleži kod uočavanja spiroheta zelene boje pod fluorescentnim mikroskopom. Prilikom svakog postavljanja testa korišćene su pozitivna i negativna kontrola, koju je obezbedio proizvođač testa.

Nakon vezivanja sekundarnih antitela preparat je ispiran fosfatnim puferom (pH 7,4) i analiziran na mikroskopu (Leica DM 3000, Nemačka) sa izvorom svetlosti od živine sijalice i N2.1 filterom (Leica, Nemačka) sa talasnom dužinom ekscitacije 515–560 nm.

ELISA test

ELISA test je serološka analiza za detektovanje IgM i IgG antitela protiv borelija sensu lato kompleksa. Analiza se vrši korišćenjem automatskog ELISA čitača i *washer*-a i komercijalnog dijagnostičkog kompleta i očitava prema uputstvu proizvođača.

ELISA test je izveden tako što su se kalibratori, pozitivne i negativne kontrole i razređeni uzorak krvnog seruma ispitanika naneli u bunare mikrotitar-ploče, u kojima se već nalaze antigeni borelija iz sensu lato kompleksa ((Euroimmun AG, Nemačka, kat. broj EI 2132-9601-2 G i EI 2132-9601-2 M). Nakon inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperaturi, bunari su isprani fosfatnim puferom u tri ciklusa. Nakon ispiranja, sva tečnost je uklonjena iz bunara mikrotitar-ploča i dodat je radni konjugat (antihumani IgG obeležen peroksidazom), nakon čega je vršena inkubacija od 30 minuta na sobnoj temperaturi. Po završetku inkubacije, bunari su ponovo isprani po ranije opisanoj proceduri. U isprane bunare je nanesen hromogen i inkubiran 15 minuta na sobnoj temperaturi zaštićen od dejstva sunčevih zraka. Po isteku inkubacije izvršeno je stopiranje nanošenjem stop-rastvora u sve bunare gde je hromogen ranije nanesen. Očitavanje je vršeno na

talasnoj dužini od 450 nm i referentnoj talasnoj dužini između 620 nm i 650 nm u roku od 30 minuta nakon nanošenja stop-rastvora.

Ispitivanje senzitivnosti, specifičnosti, preciznosti i prediktivnih vrednosti PCR analize krpelja i seroloških analiza

Senzitivnost testa predstavlja verovatnoću da će test dati pozitivan rezultat kod pacijenata kod kojih je bolest prisutna. Senzitivnost testa se računa po sledećoj formuli:

$$\text{Senzitivnost} = \frac{\text{broj stvarno pozitivnih pacijenata (SP)}}{\text{SP} + \text{broj lažno negativnih pacijenata (LN)}}$$

Specifičnost testa predstavlja verovatnoću da će test dati negativan rezultat kod pacijenata kod kojih bolest nije prisutna. Specifičnost se računa po sledećoj formuli:

$$\text{Specifičnost} = \frac{\text{broj stvarno negativnih pacijenata (SN)}}{\text{broj stvarno negativnih pacijenata (SN)} + \text{broj lažno pozitivnih (LP)}}$$

Odnos pozitivne verodostojnosti testa predstavlja odnos između verovatnoća pozitivnog očitavanja testa kod stvarno obolelih i pozitivnog očitavanja testa kod osoba koje nisu obolele.

Odnos pozitivne verovatnoće testa računa se po sledećoj formuli:

$$\text{Odnos pozitivne verodostojnosti testa} = \frac{\text{stopa SP}}{\text{stopa LP}} = \frac{\text{senzitivnost testa}}{1 - \text{specifičnost testa}}$$

Odnos negativne verodostojnosti testa predstavlja odnos između verovatnoća negativnog nalaza testa kod stvarno obolelih i negativnog nalaza testa kod osoba koje nisu obolele. Odnos negativne verovatnoće testa računa se po sledećoj formuli:

$$\text{Odnos negativne verodostojnosti testa} = \frac{\text{stopa LN}}{\text{stopa SN}} = \frac{1 - \text{senzitivnost testa}}{\text{specifičnost testa}}$$

Preciznost testa predstavlja sveukupnu verovatnoću da je pacijent tačno klasifikovan kao oboleo ili neboleo. Preciznost testa se računa po sledećoj formuli:

Preciznost testa

= senzitivnost testa x prevalencija bolesti

+ specifičnost testa x (1 – prevalencija bolesti)

Prediktivna vrednost testa se smatra najkorisnijim pokazateljem dijagnostičke vrednosti funkcionalnog ispitivanja, jer ukazuje na to kolika je verovatnoća da bolest stvarno postoji ako je test pozitivan odnosno ne postoji ako je test negativan.

Prediktivna vrednost pozitivnog testa (PVNT) računata je po formuli:

$$PVNT(x) = \frac{SP}{SP+LP}$$

gde je

x – tip testa (IFA, ELISA, PCR)

SP – stvarno pozitivni (nalaz pozitivan, pacijent oboleo)

LP – lažno pozitivni (nalaz pozitivan, pacijent nije oboleo)

Prediktivna vrednost negativnog testa (PVNT) računata je po formuli:

$$PVNT(x) = \frac{SN}{SN+LN}$$

gde je

x – tip testa (IFA, ELISA, PCR)

SN – stvarno negativni (nalaz negativan, pacijent nije oboleo)

LN – lažno negativni (nalaz negativan, pacijent oboleo)

Statistička obrada podataka

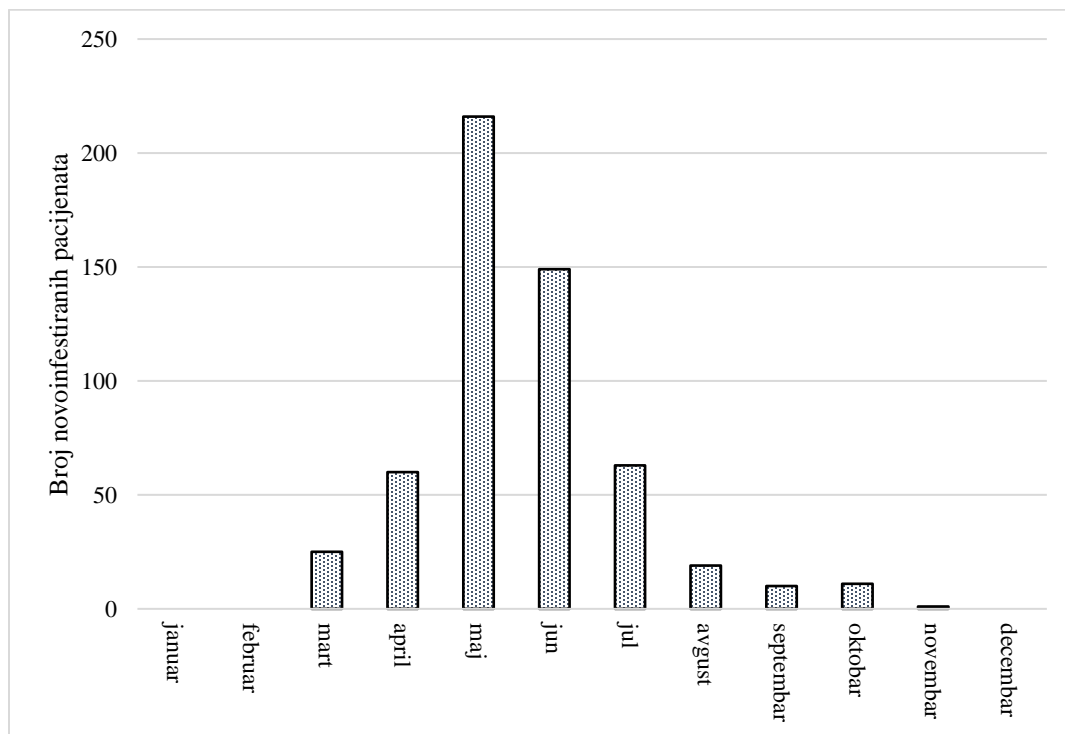
Kompletna statistička analiza podataka urađena je u programu za statističku analizu SPSS 21 (IBM, SAD). Sve atributivne varijable su predstavljene u obliku frekvenci pojedinih kategorija, a statistička značajnost učestalosti između pojedinih kategorija testirana je kombinovanim χ^2 testom sa *post hoc* analizom. Analize učestalosti parametara su procenjene na nivou statističke značajnosti od $p < 0,05$.

6. REZULTATI

6.1 Karakteristike osoba infestiranih krpeljima sa prebivalištem u Južnobačkom okrugu

6.1.1 Distribucija infestacije pacijenata krpeljima po mesecima

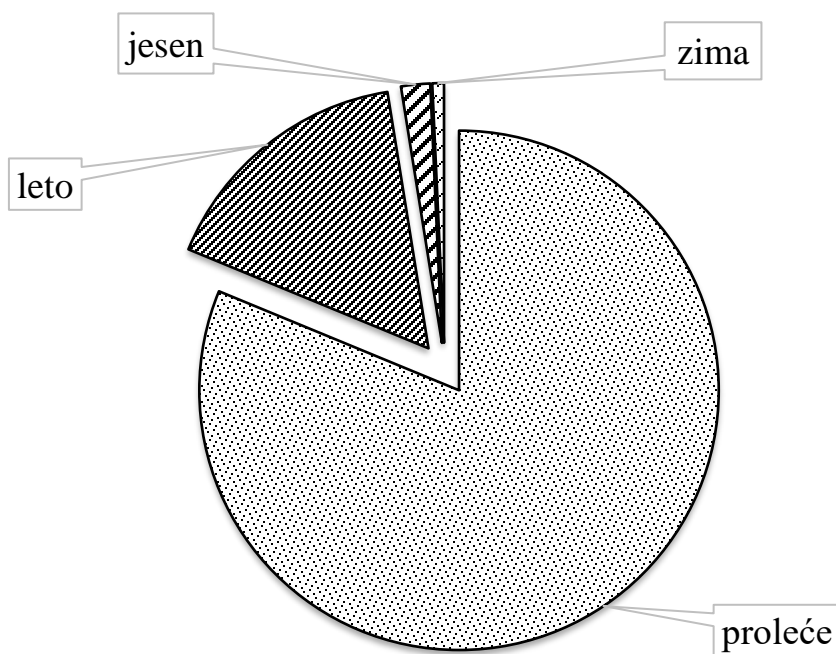
Tokom 2018. i 2019. godine, u Pasterovom zavodu je primljeno ukupno 554 novoinfestirana pacijenta sa kojih je ranije uklonjen krpelj ili koji su se javili lekaru radi uklanjanja krpelja i daljeg pružanja zdravstvene zaštite. Na godišnjem nivou, prvi slučajevi infestacije detektovani su u 3. mesecu, dok su poslednji slučajevi detektovani u 11. mesecu. Uočena je različita učestalost infestacije pacijenata tokom godine sa pikom u 5. mesecu (216 novoregistrovanih infestacija), te se grafičkim prikazom broja primljenih pacijenata po mesecima dobija unimodalna distribucija (Grafik 1).



Grafik 1 – Distribucija prijema novoregistrovanih pacijenata infestiranih od strane krpelja sa prebivalištem u Južnobačkom okrugu tokom 2018. i 2019. godine u Pasterovom zavodu.

6.1.2 Učestalost infestacije pacijenata krpeljima naspram godišnjeg doba

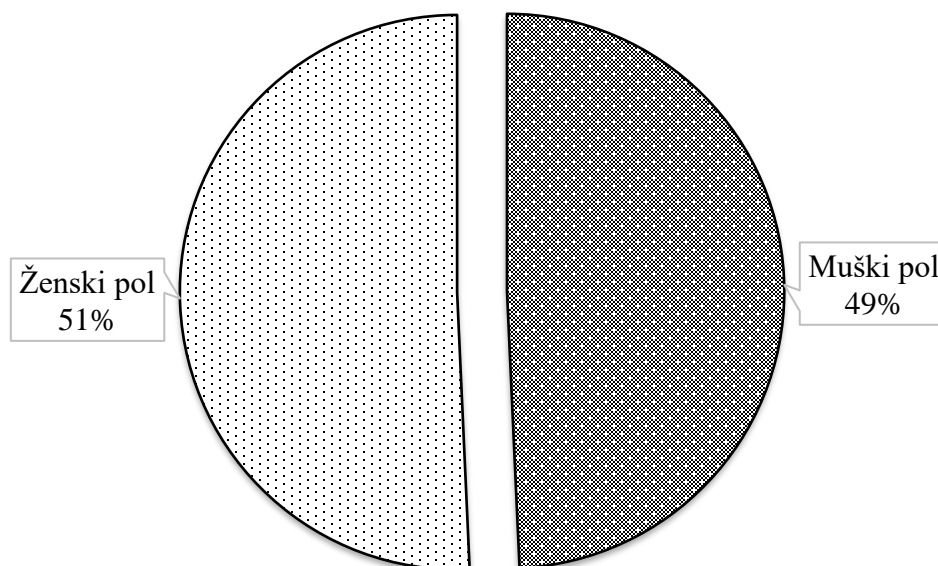
Tokom 2018. i 2019. godine najveći broj slučajeva infestacije krpeljima detektovan je u prolećnom (450/554; 81,22%) i letnjem periodu (90/554; 16,24%), dok je tokom jeseni (10/554; 1,80%) i zime (4/554; 0,72%) infestacija krpeljima bila najređa (Grafik 2). Testom χ^2 uočena je statistički značajna razlika u učestalosti infestacija po godišnjim dobima ($\chi^2(3) = 412,80$; $p < 0,00001$). Poređenjem učestalosti infestacije krpeljima tokom proleća i leta takođe je uočena statistički značajna razlika ($\chi^2(1) = 135$; $p < 0,00001$).



Grafik 2 – Distribucija novih slučajeva infestacije krpeljima u odnosu na godišnje doba tokom 2018. i 2019. godine.

6.1.3 Učestalost infestacije krpeljima u odnosu na pol pacijenata

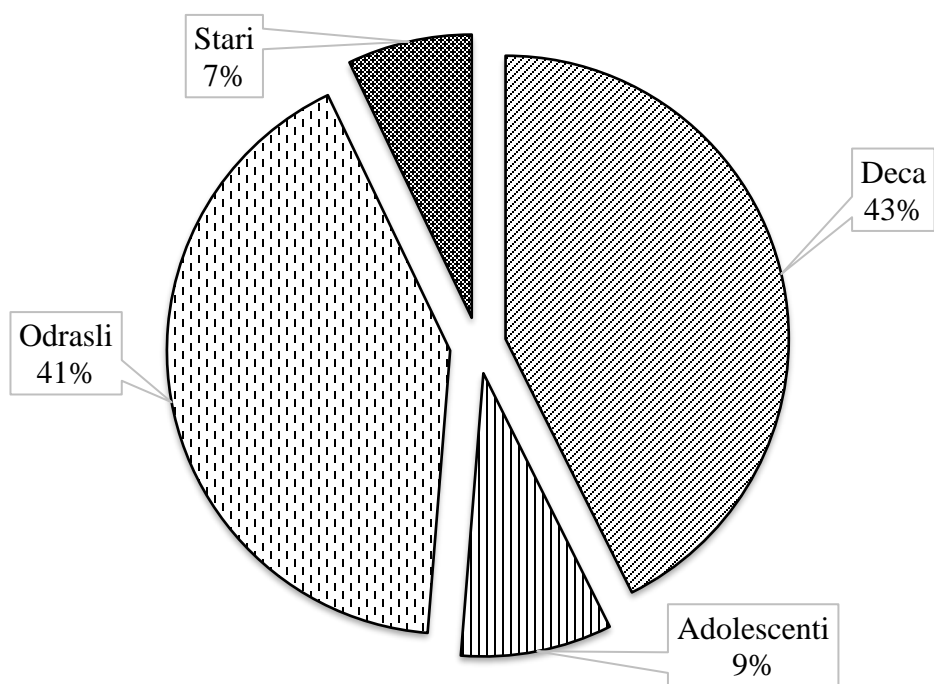
Od ukupno 554 pacijenta sa prebivalištem u Južnobačkom okrugu koji su se javili u Pasterov zavod zbog infestacije krpeljima, 273 pacijenta bila su muškog pola, dok je 281 bio ženskog pola (Grafik 3). Iako je ženski pol blago učestaliji, nije uočena statistički značajna razlika prilikom poređenja učestalosti muškaraca i žena infestiranih krpeljima ($\chi^2(1) = 0,057$; $p = 0,81$).



Grafik 3 – Prikaz učestalosti infestacije krpeljima između osoba muškog i ženskog pola sa prebivalištem u Južnobačkom okrugu.

6.1.4 Razlika u infestaciji krpeljima u odnosu na starost pacijenata

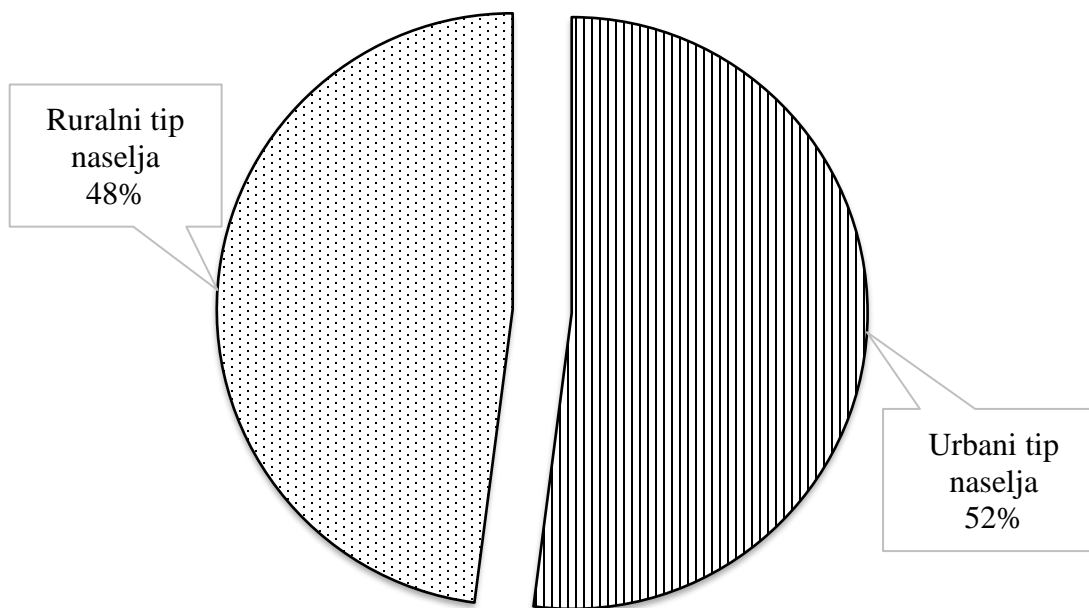
Infestacija krpeljima je uočena u svim ranije definisanim starosnim kategorijama (Grafik 4). Analizom χ^2 uočena je statistički značajna razlika u zapaženim učestalostima infestacije među starosnim grupama ($\chi^2(3) = 146.48$; $p < 0,00001$). Najveća učestalost infestacije je zapažena u starosnim kategorijama dece (0–10 godine) – 239/554; 43% i odraslih (20–65 godina) – 227/554; 41%. Poređenjem te dve starosne kategorije nije pokazana statistički značajna razlika u zapaženoj učestalosti infestacije krpeljima ($\chi^2(1) = 0.15$; $p = 0,69$). Kod adolescenata (49/554; 9%) i seniora (39/554; 7%) učestalost infestacije krpeljima bila je najmanja u odnosu na ukupan uzorak.



Grafik 4 – Učestalost infestacije krpeljima kod starosnih kategorija dece (od 0 do 10 godina), adolescenata (od 11 do 19 godina), odraslih (od 20 do 65 godina) i starih (> 65 godina).

6.1.5 Učestalost infestacije krpeljima u odnosu na tip prebivališta pacijenata

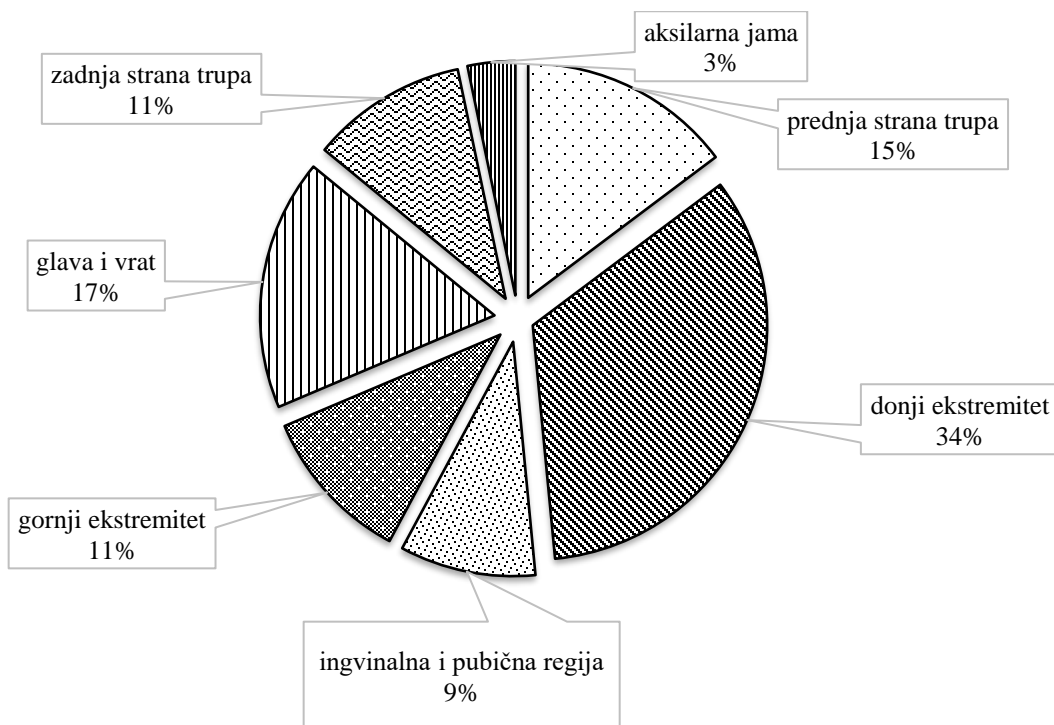
Pacijenti koji su se javljali u vezi s pitanjem infestacije krpeljima podeljeni su na osnovu tipa naselja u kojem žive na pacijente iz urbane i pacijente iz ruralne sredine (Grafik 5). Iako su pacijenti sa prebivalištem iz urbanog tipa naselja (288/554; 52%) u blagoj većini naspram pacijenata iz ruralnog tipa naselja (266/554; 48%), nije uočena statistički značajna razlika na osnovu učestalosti infestacije krpeljima uzimajući u obzir ova dva paramtera ($\chi^2(1) = 0,43$; $p = 0,51$)



Grafik 5 – Prikaz odnosa učestalosti infestacije ljudi krpeljima na osnovu tipa njihovog prebivališta unutar Južnobačkog okruga.

6.1.6 Razlika u infestiranosti različitih delova tela pacijenata svih starosnih kategorija sa prebivalištem u Južnobačkom okrugu

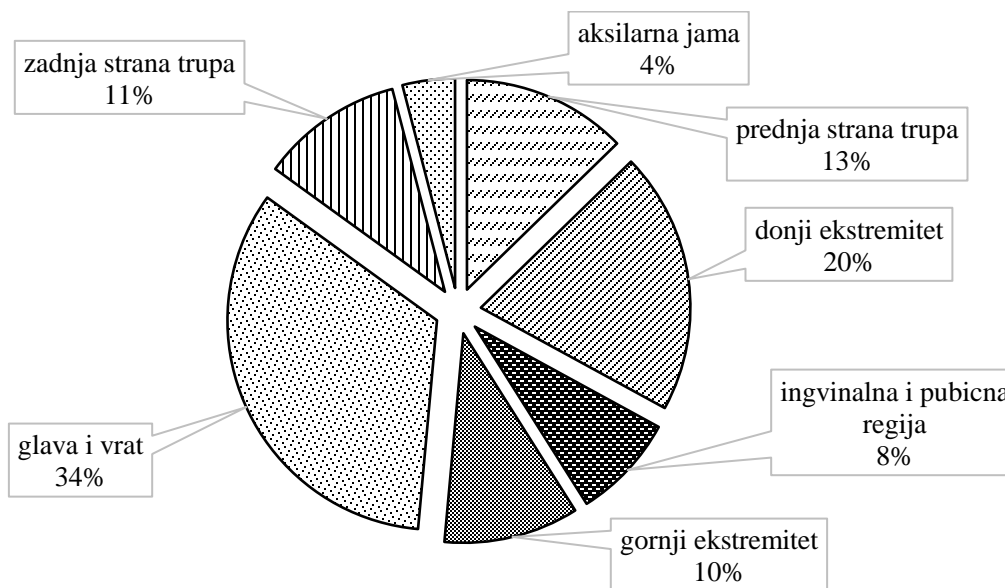
U ukupnom uzorku pacijenata krpelji su najčešće parazitirali u predelu donjih ekstremiteta (potkolenica, natkolenica, stopalo – 188/554; 34%), glave i vrata (94/554; 17%) i prednje strane trupa (prednja strana abdomena, prednja strana toraksa – 83/554; 15%) (Grafik 6). Krpelji su najređe uklanjani sa predela aksilarne jame (16/554; 3%), predela prepona i pubične regije (50/554; 9%). Testom χ^2 dokazana je značajna razlika u frekvenciji zahvatanja različitih delova tela infestacijom ($\chi^2(6) = 17,56; p = 0,0074$). Naknadnim upoređivanjem je detektovana statistički značajna razlika u zahvatanju donjih ekstremiteta i glave i vrata infestacijom ($\chi^2(1) = 16; p = 0,000063$), kao i u učestalosti infestacije donjih ekstremiteta naspram prednje strane trupa ($\chi^2(1) = 21,09; p < 0,00001$).



Grafik 6 – Učestalost zahvatanja specifičnog dela tela pacijenta infestacijom kod svih starosnih kategorija.

6.1.7 Razlika u infestiranosti različitih delova tela pacijenata dečje dobi

U dečjoj populaciji pacijenata krpelji su najčešće parazitirali u predelu glave i vrata, dok su se donji ekstremiteti našli na drugom mestu po učestalosti (Grafik 7). Krpelji su kod dece najređe uklanjani sa predela aksilarne jame, predela prepona i pubične regije. Testom χ^2 dokazana je značajna razlika u frekvenciji zahvatanja različitih delova tela infestacijom ($\chi^2(6) = 17.62$; $p = 0,0072$). Naknadnim upoređivanjem nije detektovana statistički značajna razlika u zahvatanju donjih ekstremiteta i glave i vrata infestacijom ($\chi^2(1) = 1,84$; $p = 0,17$), kao ni učestalosti infestacije glave i vrata naspram prednje strane trupa ($\chi^2(1) = 2,54$; $p = 0,11$). Ipak, statistički značajna razlika je uočena poređenjem učestalosti infestacije glave i vrata i zadnje strane trupa ($\chi^2(1) = 6.22$; $p = 0,012$).

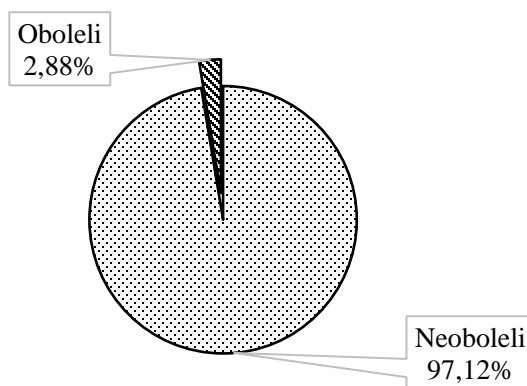


Grafik 7 – Učestalost zahvatanja specifičnog dela tela pacijenta infestacijom kod dečje starosne kategorije (0–10 godina).

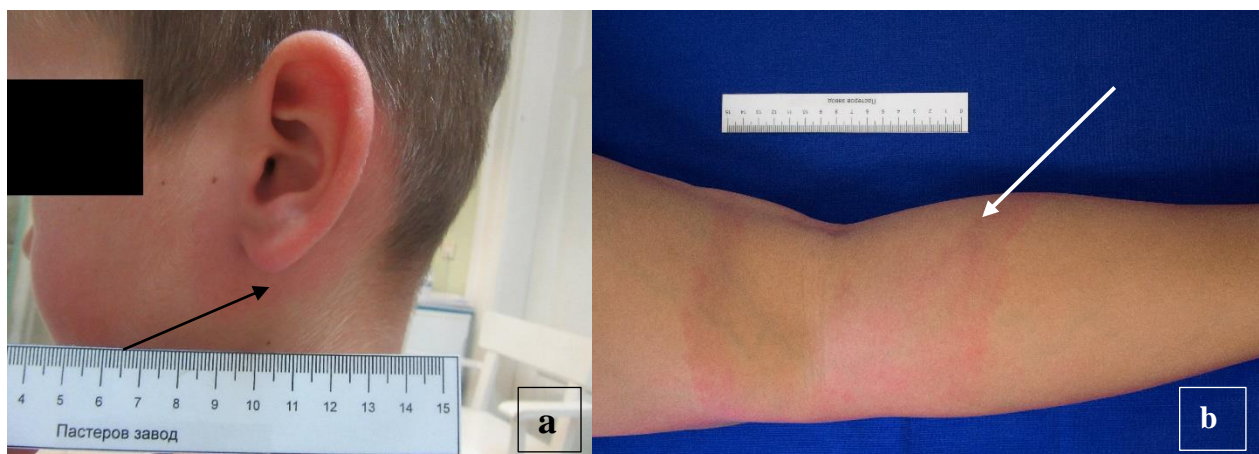
6.2 Karakteristike pacijenata obolelih od rane faze lajmske borelioze

6.2.1 Učestalost obolelih pacijenata od rane faze lajmske borelioze

Od ukupno 554 pacijenata primljenih tokom 2018. i 2019. godine u Pasterovom zavodu detektovano je 16 slučajeva (16/554; 2,88%) rane faze lajmske borelioze, tj. prisustvo migratornog eritema (Grafik 8; Slika 4). Poređenjem učestalosti pacijenata infestiranih krpeljima koji su oboleli od lajmske borelioze naspram onih koji nisu oboleli uočena je statistički značajna razlika ($\chi^2(1) = 316,07; p < 0,00001$).



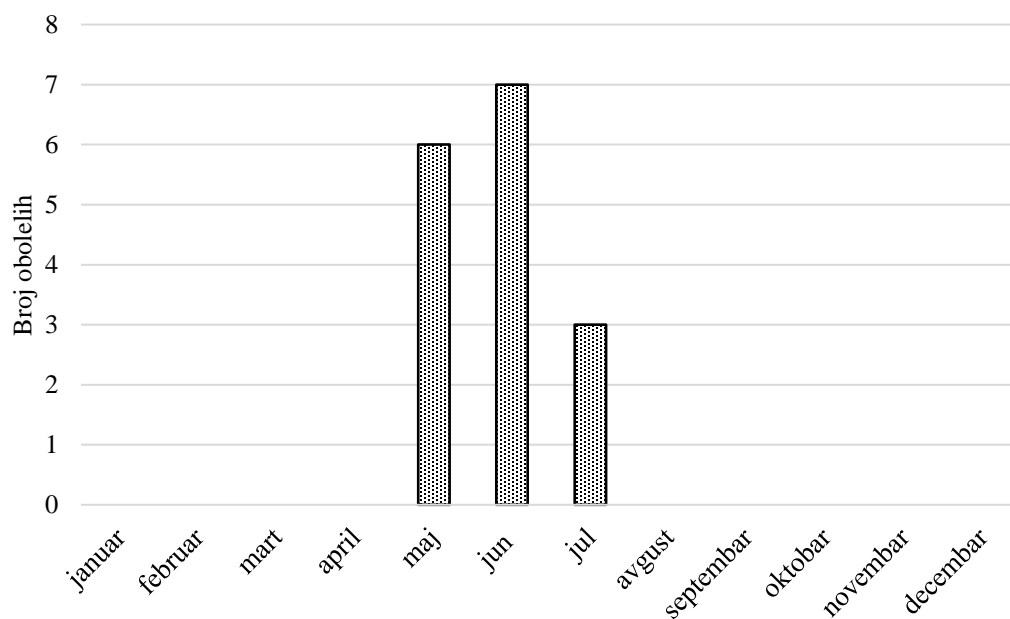
Grafik 8 – Udeo pacijenata infestiranih krpeljima koji je oboleo od rane faze lajmske borelioze.



Slika 4 – Rana faza lajmske borelioze. 3a – Migratorni eritem bez centralnog rasvetljenja u retroaurikularnom prostoru petogodišnjeg dečaka izazvan genospecijesom *B. afzelii*; 3b – Migratorni eritem sa centralnim rasvetljenjem, u predelu zakolene jame i potkolenice izazvan genospecijesom *B. spielmanii* (129).

6.2.2. Distribucija pacijenata obolelih od rane faze lajmske borelioze po mesecima

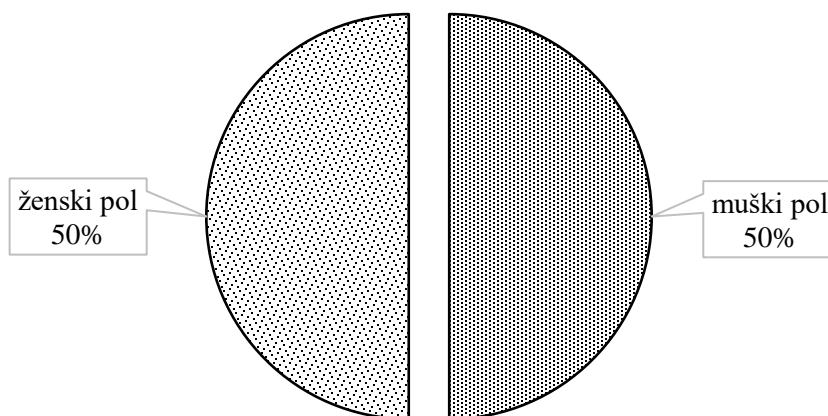
Iako je infestacija krpeljima beležena od 3. do 11. meseca, slučajevi lajmske borelioze 2018. i 2019. godine bili su grupisani u 3 meseca (Grafik 9), sa najvećim brojem slučajeva u junu (7/16; 43,75%), dok su preostali meseci gde je rana faza lajmske borelioze detektovana maj (6/16; 37,5%) i jul (3/16; 18,75%). Testom χ^2 nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti obolevanja u navedenom tromesečnom periodu ($\chi^2(2) = 0,89$; $p = 0,639$).



Grafik 9 – Distribucija novoobolelih pacijenata sa prebivalištem u Južnobačkom okrugu 2018–2019. godine po mesecima.

6.2.3 Učestalost pola pacijenata obolelih od rane faze lajmske borelioze

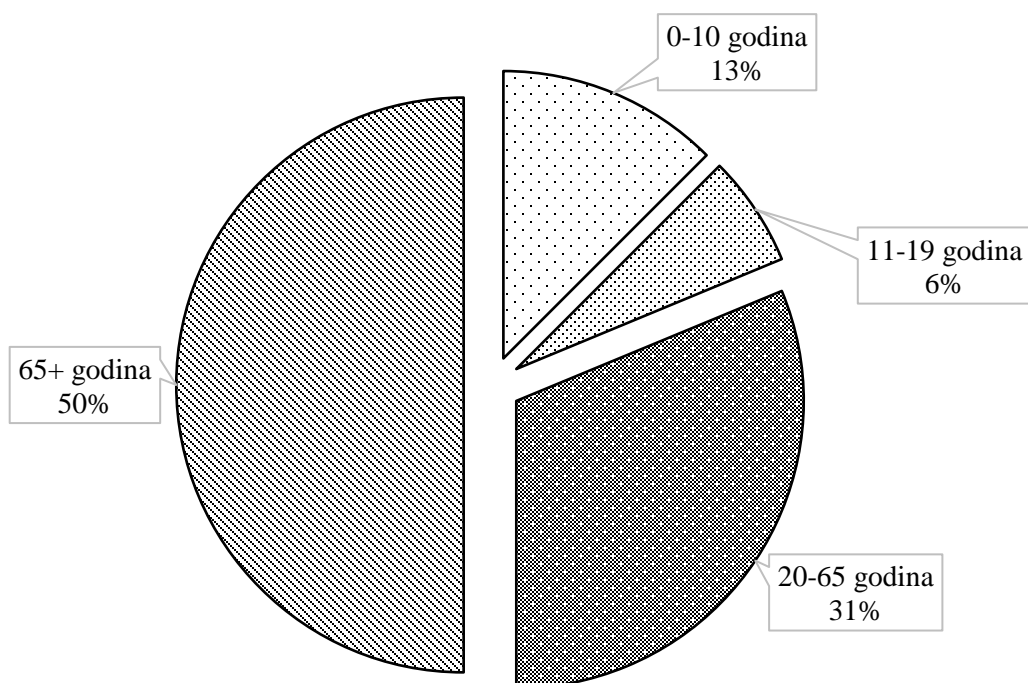
Od ukupno 16 obolelih 2018–2019. godine, 8 osoba je bilo muškog pola, dok je 8 osoba bilo ženskog pola (Grafik 10). U skladu sa učestalosti pola kod osoba infestiranih krpeljima, isti trend se uočava i kod pacijenata koji su oboleli. Nije uočena povećana učestalost jednog pola naspram drugog u kontekstu obolevanja od lajmske borelioze nakon infestacije krpeljima.



Grafik 10 – Prikaz odnosa muškaraca i žena među pacijentima obolelim od rane faze lajmske borelioze nakon infestacije krpeljima.

6.2.4 Razlika u obolevanju od rane faze lajmske borelioze u odnosu na starost pacijenata

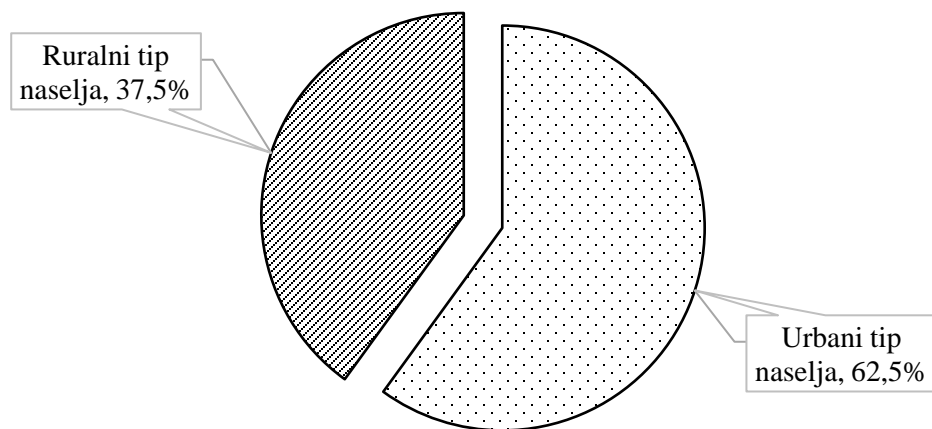
Od ukupno 16 obolelih, 2 pacijenta (2/16; 13%) pripadala su dečjem starosnom uzrastu (0–10 godina), 1 pacijent (1/16; 6%) bio je u kategoriji adolescenata (11–19 godina), 5 pacijenata (5/16; 31%) pripadalo je kategoriji odraslih (20–65 godina), dok je udeo pacijenata starosti 65 i više godina bio najveći – 8/16; 50% (Grafik 11). Testom χ^2 nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti obolevanja jedne od navedenih starosnih kategorija ($\chi^2(3) = 3,91; p = 0,271$).



Grafik 11 – Prikaz učestalosti obolevanja specifičnih starosnih kategorija od rane faze lajmske borelioze kod osoba infestiranih krpeljima 2018–2019. godine.

6.2.5 Učestalost obolevanja od rane faze lajmske borelioze u odnosu na tip prebivališta pacijenata infestiranih krpeljima

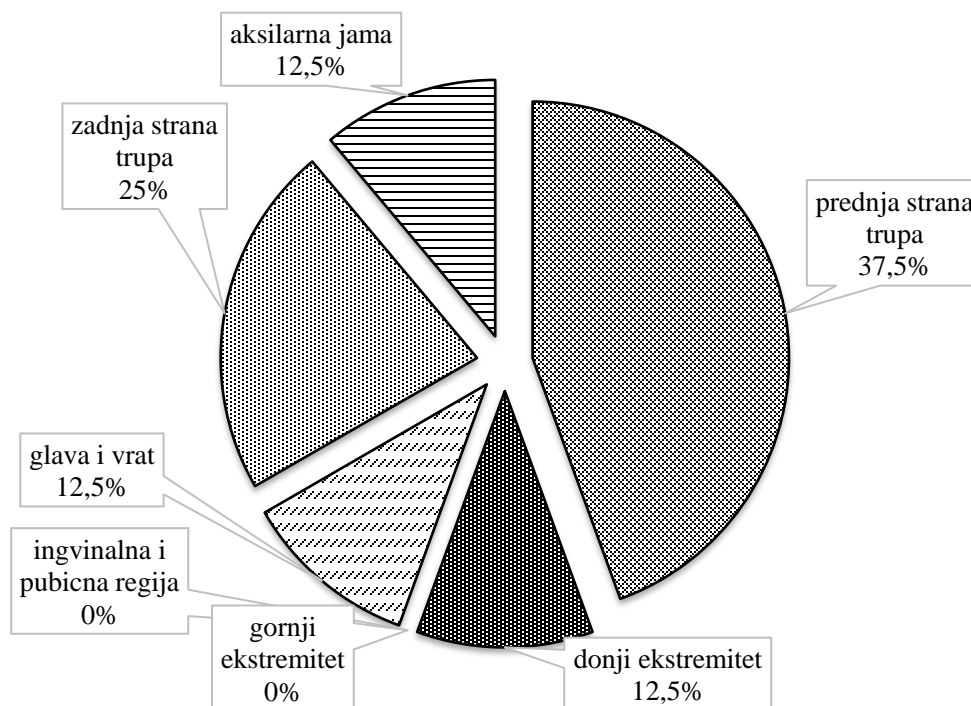
Od ukupno 16 pacijenata obolelih od prve faze lajmske borelioze 6 osoba (6/16; 37,5%) prijavilo je prebivalište koje odgovara ruralnom tipu naselja, dok su ostali (10/16; 62,5%) prijavili prebivalište u urbanom tipu naselja. Iako je uočena veća učestalost obolevanja pacijenata sa prebivalištem u urbanim sredinama (Grafik 12), χ^2 testom nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti obolevanja naspram tipa prebivališta pacijenta ($\chi^2(1) = 0,50; p = 0,476$).



Grafik 12 – Prikaz učestalosti obolevanja od prve faze lajmske borelioze nakon infestacije krpeljima naspram tipa prebivališta.

6.2.6 Učestalost zahvatanja različitih delova tela migratornim eritemom kod pacijenata infestiranih krpeljima

Od ukupno 16 obolelih pacijenata, po 2 (2/16; 12,5%) je razvilo migratorni eritem u predelu aksilarne jame, glave i vrata i donjeg ekstremiteta, dok su 4 pacijenta (4/16; 25%) razvila migratorni eritem u predelu zadnje strane trupa. Najveći broj pacijenata je razvio migratorni eritem u predelu prednje strane trupa (6/16; 37,5%). U predelu ingvinalne i pubične regije i gornjih ekstremiteta migratorni eritem nije uočen (Grafik 13). Testom χ^2 sa Jejtsovom korekcijom nije uočena statistički značajna razlika u učestalosti pojave migratornog eritema na opisanim delovima tela ($\chi^2(4) = 0,348; p = 0,98$).

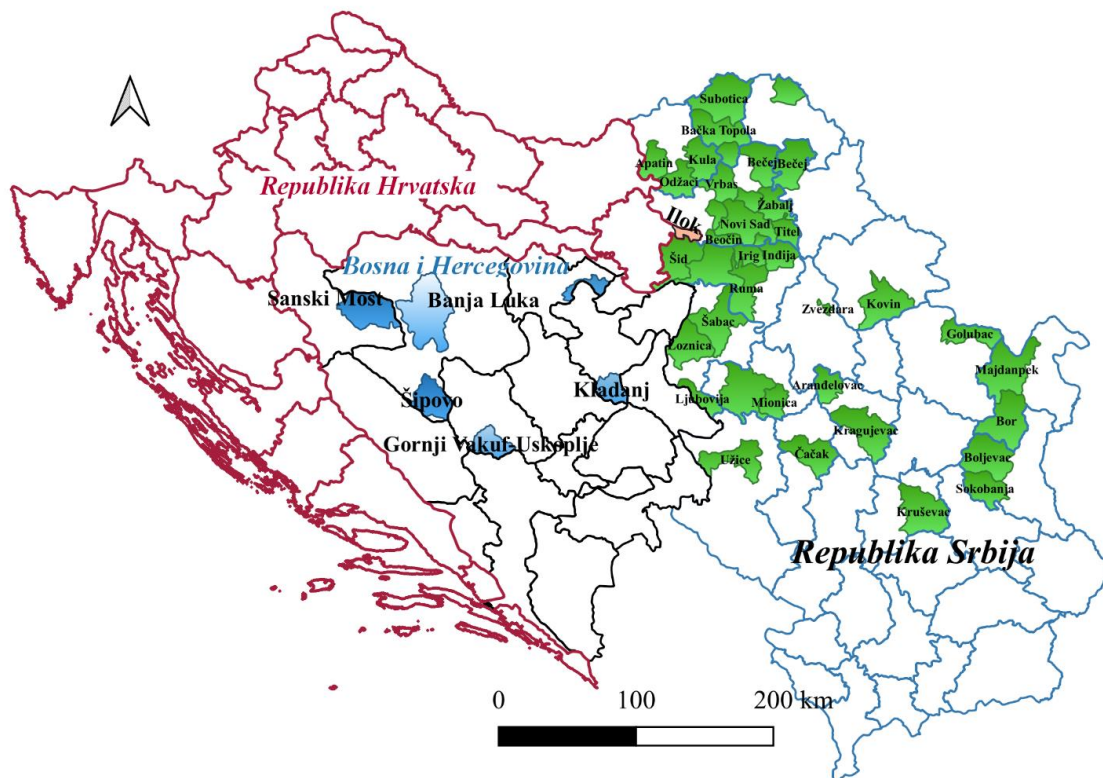


Grafik 13 – Učestalost zahvatanja specifičnih delova tela migratornim eritemom kod pacijenata infestiranih krpeljima 2018–2019. godine.

6.3 Karakteristike krpelja uklonjenih sa pacijenata

6.3.1 Pregled geografskih lokaliteta na kojima su pacijenti sa prebivalištem u Južnobačkom okrugu bili infestirani krpeljima

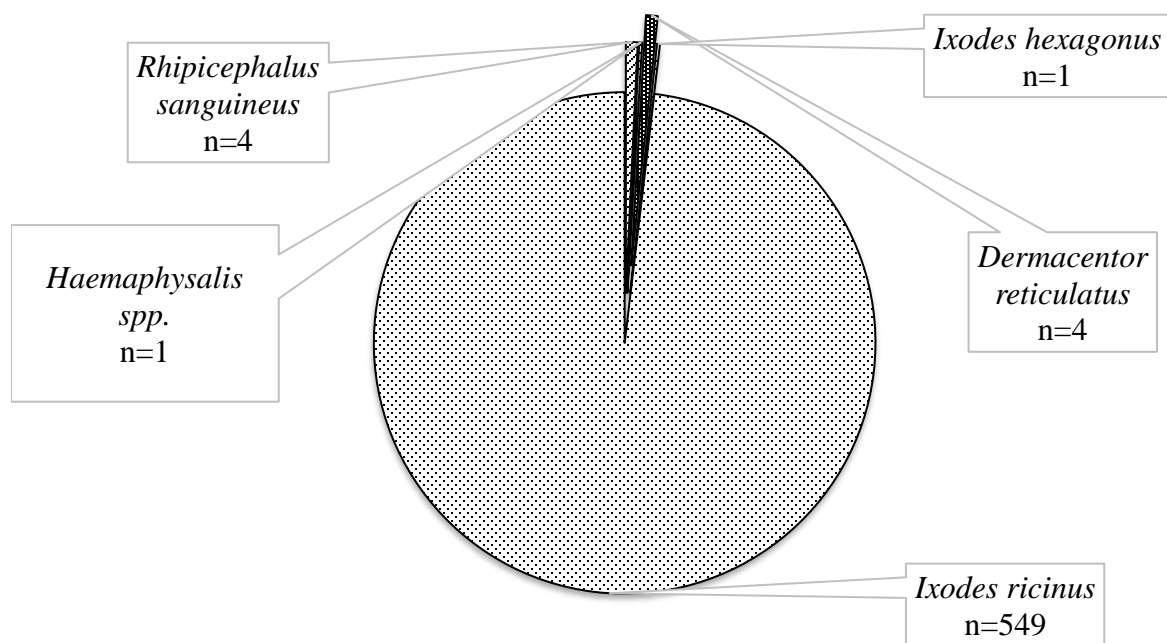
U periodu 2018–2019. godine, pacijenti sa prebivalištem u Južnobačkom okrugu prijavili su infestaciju krpeljima na lokalitetima unutar 3 države – Republike Srbije, Bosne i Hercegovine i Republike Hrvatske (Slika 5). Infestacije su se u najvećem broju slučajeva desile na teritoriji Republike Srbije tokom slobodnog vremena, boravka u prirodi ili zelenim urbanim sredinama. Najveći broj lokaliteta gde su krpelji započeli infestaciju nalazi se na prostoru Autonomne Pokrajine Vojvodine, nakon koje po učestalosti sledi teren Centralne Srbije.



Slika 5 – Geografski lokaliteti infestacije krpeljima kod ispitivanih pacijenata. Administrativne jedinice gde je zabeležen napad krpelja u Republici Srbiji obeležene su zelenom bojom, u Bosni i Hercegovini plavom bojom i Republici Hrvatskoj roze bojom.

6.3.2 Vrste krpelja uklonjenih sa pacijenata

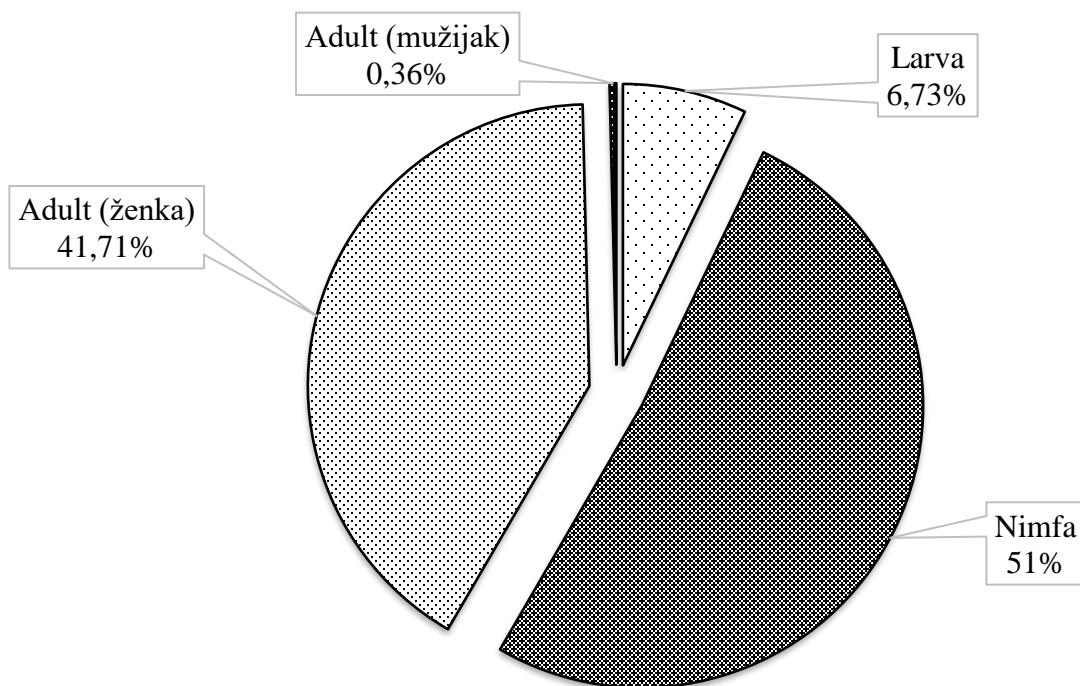
U periodu 2018–2019. godine sa pacijenata je uklonjeno ukupno 559 krpelja (Grafik 14). Najveći deo uklonjenih krpelja pripadao je vrsti *I. ricinus* (549/559; 98,21%), dok su ostali krpelji identifikovani kao *Dermacentor reticulatus* (4/559; 0,71%), *Rhipicephalus sanguineus* (4/559; 0,71%), *Ixodes hexagonus* (1/559; 0,17%) i *Haemaphysalis spp.* (1/559; 0,17%). Testom χ^2 sa Jejtsovom korekcijom uočena je statistički značajna razlika u učestalosti krpelja *I. ricinus* u infestiranju pacijenata naspram ostalih identifikovanih krpelja ($\chi^2(4) = 699,14; p = 0$).



Grafik 14 – Prikaz učestalosti infestacije pacijenata od strane identifikovanih vrsta krpelja 2018–2019. godine.

6.3.3 Razvojni stadijumi krpelja vrste *I. ricinus* uklonjenih sa pacijenata

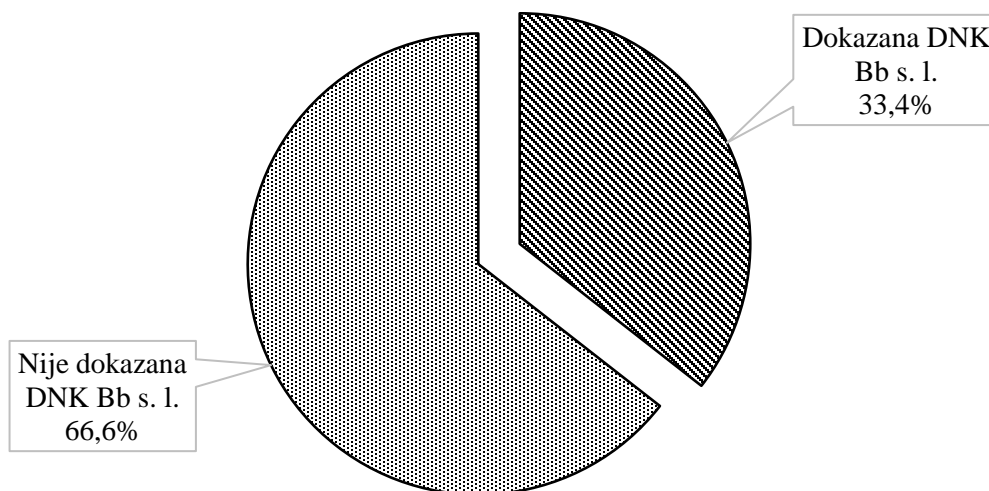
Od ukupno 549 uklonjenih krpelja vrste *I. ricinus*, najučestalije su identifikovane nimfe (281/549; 51,18%) i adulti ženke (229/549; 41,71%), dok su larve (37/549; 6,73%) i adulti mužjaci (2/549; 0,36%) ređe uočavani (Grafik 15). Testom χ^2 uz Jejtsovu korekciju uočena je statistički značajna razlika u učestalosti identifikacije razvojnih stadijuma ($\chi^2(3) = 257,05; p = 0$).



Grafik 15 – Prikaz učestalosti razvojnih stadijuma krpelja vrste *I. ricinus* uklonjenih sa pacijenata 2018–2019. godine.

6.3.4 Zaraženost krpelja vrste *I. ricinus* uklonjenih sa pacijenata uzročnikom iz *B. burgdorferi* sensu lato kompleksa

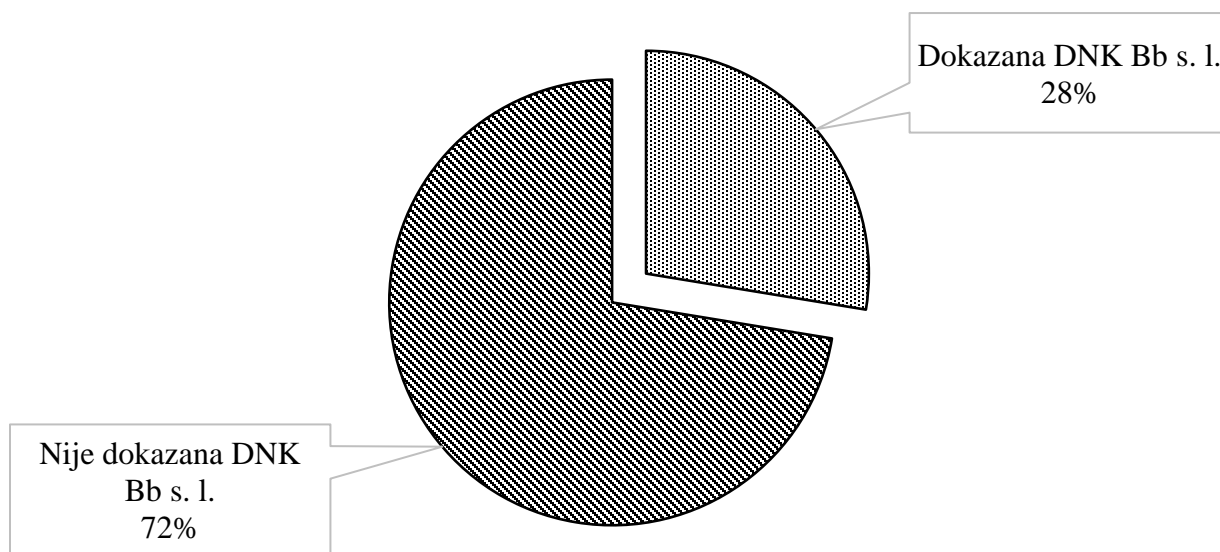
U uzorku od 90 nasumično odabranih krpelja vrste *I. ricinus*, prisustvo DNK *Borrelia burgdorferi* sensu lato kompleksa dokazano je kod 30 krpelja (30/90; 33,4%), dok kod ostalih 60 (60/90; 66,6%) genetski materijal *Borrelia burgdorferi* sensu lato kompleksa nije bio prisutan (Grafik 16). Testom χ^2 je dokazana statistički značajna razlika u učestalosti infekcije borelijama kod krpelja vrste *I. ricinus* uklonjenih sa ljudi ($\chi^2(1) = 5,14; p = 0,023$).



Grafik 16 – Prikaz učestalosti infekcije borelijama sensu lato kompleksa kod krpelja vrste *I. ricinus* uklonjenih sa ispitivanih pacijenata.

6.3.5 Učestalost infekcije krpelja vrste *I. ricinus* uzročnikom *B. burgdorferi* s. l. u urbanim područjima

U ukupnom uzorku od 90 krpelja ispitanih na prisustvo infekcije sa *B. burgdorferi* s. l., 29 krpelja ($n = 29$) infestiralo je pacijente u urbanom lokalitetu ($29/90$; 32,22%). Od tog broja, zaraženost sa *B. burgdorferi* s. l. dokazana je kod 8 krpelja ($8/29$; 27,58%), dok je preostali 21 krpelj ($21/29$; 72,41%) bio negativan na DNK *B. burgdorferi* s. l. (Grafik 17). Testom χ^2 nije detektovana statistički značajna razlika u opserviranim trendovima infekcije kod krpelja koji su infestaciju započeli u urbanim sredinama ($\chi^2(1) = 3,11$; $p = 0,077$).

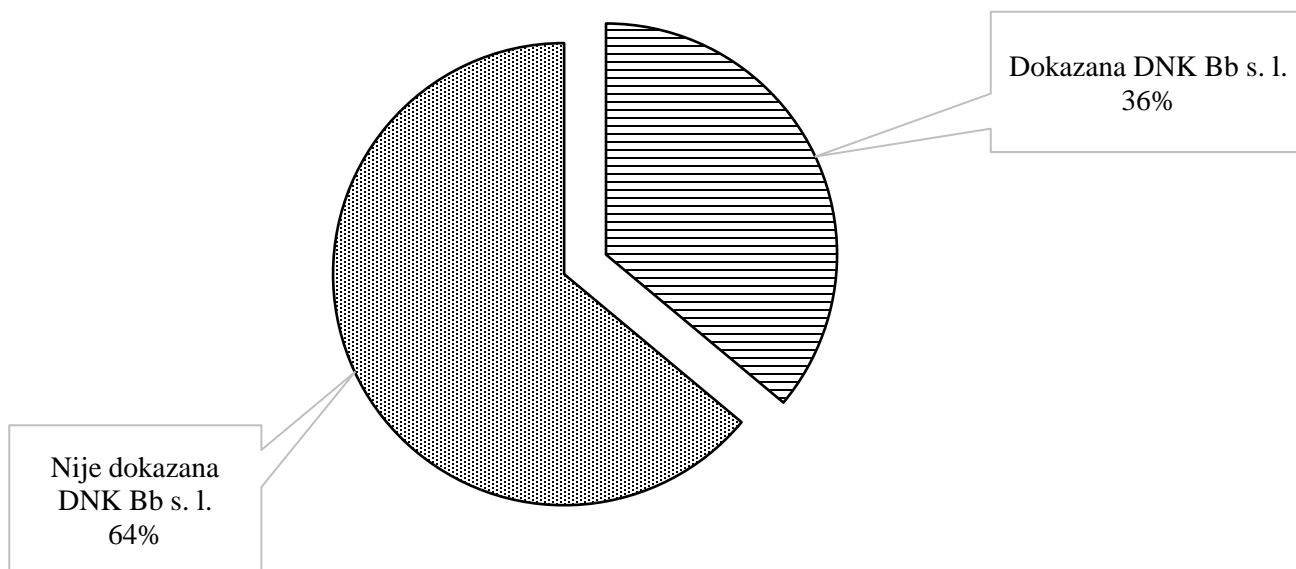


Grafik 17 – Prikaz učestalosti infekcije sa *B. burgdorferi* s. l. kod krpelja koji su infestirali pacijente u urbanim sredinama.

6.3.6 Učestalost infekcije krpelja vrste *I. ricinus* sa *B. burgdorferi* s. l. u ruralnim područjima

U ukupnom uzorku od 90 krpelja ispitanih na prisustvo infekcije sa *B. burgdorferi* s. l., 61 krpelj ($n = 61$) je infestirao pacijente na ruralnom lokalitetu (61/90; 56,67%). Od tog broja, zaraženost sa *B. burgdorferi* s. l. dokazana je kod 22 krpelja (22/61; 36,06%), dok je kod preostalih 39 krpelja (39/61; 63,93%) koji su infestaciju započeli na ruralnoj nalaz bio negativan (Grafik 18). Testom χ^2 nije dokazana statistički značajna razlika u opaženim trendovima infekcije sa *B. burgdorferi* s. l. kod krpelja koji su infestaciju započeli u ruralnim sredinama ($\chi^2(1) = 2,39$; $p = 0,121$).

Upoređivanjem broja inficiranih i neinficiranih krpelja u urbanim i ruralnim sredinama uz pomoć Fišerovog preciznog testa nije uočena statistički značajna razlika u trendovima inficiranosti u navedene dve sredine ($p = 0,356$).



Grafik 18 – Prikaz prevalencije infekcije sa *B. burgdorferi* s. l. kod krpelja koji su infestirali pacijente u ruralnoj sredini.

6.4 Prediktivna vrednost i druge karakteristike seroloških analiza koje detektuju antitela usmerena protiv *Borrelia* spp. kod osoba infestiranih krpeljima

Za ispitivanje prediktivnih vrednosti ispitivanja nivoa antiborelijskih antitela klase IgM ELISA/IFA metodom (prvostepena serološka ispitivanja) iskorišćena su ukupno 123 (n = 123) rezultata analize osoba infestiranih krpeljima. Od toga je stvarno pozitivnih nalaza bilo 9 (SP = 9), lažno negativnih nalaza je bilo 3 (LN = 3), lažno pozitivnih nalaza je bilo 66 (LP = 66) i stvarno negativnih nalaza je bilo 45 (SN = 45).

Senzitivnost seroloških testova za IgM klasu antiborelijskih antitela iznosi 75,00% (95% CI: 42,81–94,51%), specifičnost 40,54% (95% CI: 31,32–50,27%), odnos pozitivne verodostojnosti (*Positive Likelihood Ratio*) 1,26 (95% CI: 0,88–1,81), odnos negativne verodostojnosti (*Negative Likelihood Ratio*) 0,62 (95% CI: 0,23–1,69).

Preciznost testa u odnosu na incidenciju lajmske borelioze kod osoba infestiranih krpeljima iznosi 41,53% (95% CI: 32,72–50,76%).

Pozitivna prediktivna vrednost prvostepenih seroloških ispitivanja antiborelijskih antitela klase IgM kod osoba infestiranih krpeljima iznosi 3,61% (95% CI: 2,54–5,09%), dok je negativna prediktivna vrednost 98,20% (95% CI: 95,24–99,34%).

Za ispitivanje prediktivnih vrednosti ispitivanja nivoa antiborelijskih antitela klase IgG ELISA/IFA metodom (prvostepena serološka ispitivanja) iskorićena su ukupno 135 (n = 135) rezultata analize osoba infestiranih krpeljima. Od toga je stvarno pozitivnih nalaza bilo 7 (SP = 7), lažno negativnih nalaza 9 (LN = 9), lažno pozitivnih nalaza 28 (LP = 28) i stvarno negativnih nalaza 91 (SN = 91).

Senzitivnost seroloških testova za IgG klasu antiborelijskih antitela jeste 43,75% (95% CI: 19,75–70,12%), specifičnost 76,47% (95% CI: 67,82–83,76%), odnos pozitivne verodostojnosti (*Positive Likelihood Ratio*) 1,86 (95% CI: 0,98–3,54), odnos negativne verodostojnosti (*Negative Likelihood Ratio*) 0,74 (95% CI: 0,47–1,15).

Preciznost testa u odnosu na incidenciju lajmske borelioze kod osoba infestiranih krpeljima iznosi 75,53% (95% CI: 67,39–82,51%).

Pozitivna prediktivna vrednost prvostepenih seroloških ispitivanja antiborelijskih antitela klase IgG kod osoba infestiranih krpeljima iznosi 5,23% (95% CI: 2,82–9,49%), dok je negativna prediktivna vrednost 97,87% (95% CI: 96,71–98,62%).

6.5 Prediktivna vrednost i druge dijagnostičke karakteristike molekularne PCR analize koja detektuje DNK *Borrelia burgdorferi* s. l. kompleksa u krpeljima uklonjenih sa ljudi

Za ispitivanje prediktivnih vrednosti molekularne PCR analize krpelja uklonjenih sa ljudi na prisustvo DNK *B. burgdorferi* s. l. iskorišćeno je ukupno 90 (n = 90) krpelja uklonjenih sa osoba sa prebivalištem u Južnobačkom okrugu. Od toga je stvarno pozitivnih nalaza bilo 4 (SP = 4), lažno negativnih nalaza 0 (LN = 0), lažno pozitivnih 22 (LP = 22) i stvarno negativnih nalaza 64 (SN = 64).

Senzitivnost molekularne PCR analize krpelja uklonjenih sa ljudi na prisustvo DNK *B. burgdorferi* s. l. predstavlja 100,00% (95% CI: 39,76–100,00%), specifičnost 74,42% (95% CI: 63,87–83,22%), odnos pozitivne verodostojnosti (*Positive Likelihood Ratio*) 3,92 (95% CI: 2,73–5,61%), odnos negativne verodostojnosti (*Negative Likelihood Ratio*) 0,0%.

Preciznost testa u odnosu na incidenciju lajmske borelioze kod osoba infestiranih krpeljima iznosi 75,16% (95% CI: 64,93–83,66%).

Pozitivna prediktivna vrednost molekularne PCR analize krpelja uklonjenih sa ljudi na prisustvo DNK *B. burgdorferi* s. l. predstavlja 10,39% (95% CI: 7,48–14,25%), dok je negativna prediktivna vrednost 100,00%.

7. DISKUSIJA

U kontekstu demografskih karakteristika uočeno je da su stanovnici Južnobačkog okruga oba pola i svih starosnih kategorija izloženi infestaciji krpeljima. U ovoj studiji nije uočena statistička značajnost u pogledu infestacije krpeljima kod žena naspram muškaraca, iako je infestacija krpeljima kod žena bila blago učestalija (51% naspram 49%). Trend infestacije krpeljima u kontekstu pola opšte populacije Južnobačkog okruga u skladu je sa trendovima prikazanim kod opšte populacije u Nju Hempširu (SAD), Istanbulu (Turska) i Beogradu (105–107). U skladu s time, pol nije identifikovan kao specifičan faktor rizika za izlaganje krpeljima kod populacije Južnobačkog okruga.

S aspekta učestalosti infestacije krpeljima tokom različitih perioda godine, uočeno je da su ubodi krpelja na teritoriji Srbije najčešći u proleće i rano leto; preciznije, tokom 5. i 6. meseca. Poređenjem učestalosti infestacije krpeljima tokom proleća sa infestacijama tokom ostalih godišnjih doba uočena je statistički značajna razlika, te je proleće identifikovano kao doba godine sa najvišim rizikom za infestaciju krpeljima kod stanovnika Južnobačkog okruga. Rezultati ove studije u saglasnosti su sa rezultatima koje su prijavili Deجلي i sar. kod populacije u Nju Hempširu, kao i Mladenović kod populacije u Beogradu (105, 107). S druge strane, grupa autora iz Istanbula i Ujedinjenog Kraljevstva prijavila je najveći broj infestacija u letnjem periodu (106, 148). Razlog za to može biti u karakteristikama prolećnih i letnjih meseci na terenu Britanskog ostrva, kao i na terenu između Mramornog i Crnog mora i specifičnoj klimi, koja se razlikuje od umerenokontinentalne klime prisutne u najvećem delu Srbije. Na severu Evrope je prijavljen trend infestacije stanovništva krpeljima koji pokazuje krivu sa dva pika – u 6. i 8. mesecu (108). Sličan fenomen se retko uočava na teritoriji Centralne i Jugoistočne Evrope i smatra se zavisnim od klime,

tj. hladnijih letnjih temperatura naspram onih u Zapadnoj, Centralnoj i Južnoj Evropi tokom istih meseci.

U ovoj studiji starosne kategorije dece (0–10 godina) i odraslih (20–65 godina) identifikovane su kao grupe stanovništva sa najčešćim izlaganjem krpeljima. Rezultati prikazani u ovom istraživanju pokazuju delimična poklapanja sa više studija. Metaanaliza koju su sprovedi Nasirian i Zahirinia iznosi zaključke slične rezultatima ove studije, tj. da su najčešće starosne kategorije identifikovane kao rizične grupe 0–9, 20–39, i 40–59 godina (149). Grupa autora iz Turske ukazuje na duplo veću učestalost dece naspram ostalih pacijenata (106), dok su Dejli i sar. naveli da najveći broj pacijenata sa infestacijom krpelja u Nju Hempširu spada u grupu starosti do 9 i preko 65 godina (105). S druge strane, u Belgiji je kao starosna kategorija sa najvećim rizikom od infestacije krpeljima identifikovana ona između 45 i 64 godina (150). Rezultati ove studije upućuju na to da je rizik za infestaciju krpeljima kod dece sa prebivalištem u Južnobačkom okrugu sličan riziku identifikovanom kod dece u SAD i Turskoj. S druge strane, rizik za infestaciju krpeljima kod odraslih i dece sa prebivalištem u Južnobačkom okrugu mogao bi biti sličan riziku uočenom kod stanovnika Belgije (150). Smatra se da je jedan od glavnih razloga zbog kojeg su deca identifikovana kao rizična kategorija pre svega to što više slobodnog vremena provode u prirodi, dok bi u slučaju odraslih u Južnobačkom okrugu razlog mogao biti blizina Nacionalnog parka Fruška Gora, koji sadrži brojne zelene površine na kojima pojedinci i porodice provode slobodno vreme. U skladu s time, smatra se da adolescenti usled redovnih obaveza provode manje vremena u prirodi i na urbanim zelenim površinama. Treba napomenuti da je nedostatak ove studije izostanak finije podele ispitanika unutar grupe starosti 20 do 65 godina. Dodatna stratifikacija uzorka po starosnim grupama u budućim istraživanjima omogućiće preciznije sagledavanje

učestalosti infestacije krpeljima i obolevanje od lajmske borelioze u kontekstu starosti stanovnika Južnobačkog okruga.

Tip naselja u kojem pacijenti žive nije pokazan kao značajan faktor za infestaciju krpeljima kod stanovnika Južnobačkog okruga. Za razliku od lokaliteta infestacije, koji je u najvećem broju slučajeva bio u ruralnim sredinama, a u manjem broju slučajeva u zelenim zonama urbane sredine, broj pacijenata sa prebivalištem u ruralnom tipu naselja skoro je identičan broju pacijenata sa prebivalištem u urbanom tipu naselja. Navedeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Jora i sar., koji su ispitali faktore rizika za izlaganje krpeljima kod stanovnika Skandinavije (151), kao i sa zaključcima Hubaleka u njegovoj metaanalizi na temu epidemiologije lajmske borelioze (109).

Analizom ispitanika svih starosnih kategorija utvrđeno je postojanje različite učestalosti infestacije u odnosu na delove tela. U tom smislu, najučestalije infestacije jesu u predelu nogu, nakon čega slede infestacije glave i vrata, kao i prednje strane trupa. Predeo aksilarne jame i pubične regije su identifikovani kao delovi tela sa najređe uočenom infestacijom. Vilhelmson i sar., kao i Kul i sar., sproveli su studije u kojima su prikazali slične podatke u vezi s delovima tela gde se infestacija krpeljima najčešće uočava. U njihovom istraživanju, kod stanovnika Ujedinjenog Kraljevstva, Švedske i Olandskih Ostrva (autonomna oblast Finske), infestacije se najčešće uočavaju u predelu donjih ekstremiteta, nakon čega po učestalosti sledi predeo glave. Kao deo tela gde se infestacije krpeljima najređe uočavaju takođe je prijavljen pubični region (108, 148).

Ispitivanjem učestalosti infestacije različitih delova tela kod pacijenata dečje dobi sa prebivalištem u Južnobačkom okrugu utvrđeno je da su najčešće infestacijom zahvaćeni region glave i vrata, nakon kojeg slede donji ekstremiteti i prednja strana trupa. Aksilarni i pubični region su se i kod dece pokazali kao delovi tela gde se infestacije krpeljima najređe uočava.

U studiji Kula i sar. region sa najviše infestacija kod dece u Ujedinjenom Kraljevstvu takođe je bio predeo glave i vrata (148). Ipak, u toj populaciji na sledećem mestu po učestalosti jeste prednja strana trupa, nakon čega slede donji ekstremiteti. Sličnost dečje populacije Južnobačkog okruga i dečje populacije u Ujedinjenom Kraljevstvu jeste i identifikacija pubične regije kao dela tela sa najmanjom učestalošću infestacije krpeljima (148). Navedenu specifičnost bi trebalo da ordinirajući lekari imaju na umu tokom fizikalnog pregleda dece.

Incidencija lajmske borelioze kod stanovnika Južnobačkog okruga infestiranih krpeljima iznosi 2,88%. Najpribližniju incidenciju (2,6%) prijavili su Hofhojs i sar. kod stanovništva infestiranog krpeljima u Holandiji (152). Sličnu incidenciju (2,13%) indentifikovali su Vilhelmson i sar. kod populacije koja živi u oblasti endemskoj za lajmsku boreliozu (jug Švedske i Olandska Ostrva) (153). Slična incidencija lajmske borelioze (2,6%) nakon infestacije krpeljima identifikovana je i od strane Majvalda i sar. kod populacije u jugozapadnoj Nemačkoj – teritoriji koja se smatra endemskom za lajmsku boreliozu (154). Hjugli i sar. su prijavili najvišu incidenciju lajmske borelioze (5,2%) kod pacijenata infestiranih krpeljima na teritoriji Nušatela u Švajcarskoj (155). Teritorija Nušatela se smatra visoko endemskim područjem za lajmsku boreliozu. S druge strane, Fould i sar. su prijavili incidenciju lajmske borelioze od samo 0,7% kod osoba profesionalno izloženih krpeljima na vojnom poligonu *Seedorf* u severozapadnoj Nemačkoj (156). Takođe, Mladenović je u Beogradu registrovao nižu incidenciju rane faze lajmske borelioze od 0,5%, a što je znatno manje nego vrednost incidencije registrovane u ovom istraživanju, kao i kod drugih populacija u endemskim područjima (107). Kao primer razlike u primeni starih doktrina u dijagnostici lajmske borelioze, u odsustvu zvaničnih priručnika, može se pomenuti istraživanje Begović Kuprešanin i sar. gde je lajmska boreliozu uočena kod 36,30% ispitanika u Beogradu (157).

Iz navedenog se uočava da je incidencija lajmske borelioze kod stanovnika Južnobačkog okruga približna incidenciji lajmske borelioze kod stanovništva endemskih regija za lajmsku boreliozu u Evropi, te da se može očekivati da od 100 osoba infestiranih krpeljima približno 3 osobe razviju ranu fazu lajmske borelioze.

Slučajevi obolevanja od lajmske borelioze u Južnobačkom okrugu 2018–2019. godine grupisani su u 3 meseca – maj, jun i jul. Sličan set podataka prikazala je i Kovačević Berić kod pacijenata obolelih od lajmske borelioze u Severnobačkom okrugu 2006–2015. godine (111). Mladenović ipak prijavljuje grupisanje najvećeg broja novih slučajeva lajmske borelioze tokom aprila, maja i juna u Beogradu (107). U SAD, Dejli i sar. registrovali su najveći broj obolevanja kod stanovništva Nju Hempšira tokom jula i avgusta (105). Što se tiče stanovništva Evrope, Enkelman i sar. prijavili su unimodalnu distribuciju novodijagnostikovanih pacijenata sa lajmskom boreliozom u Nemačkoj, sa pikom u junu, julu i avgustu (158), što se poklapa sa stavom da su jun, jul i avgust meseci tokom kojih se lajmska boreliozna generalno najviše dijagnostifikuje u Evropi (109). U skladu s time, nisu uočena odstupanja u vremenskom periodu obolevanja od rane faze lajmske borelioze kod stanovništva Južnobačkog okruga naspram stanovništva Severnobačkog okruga, kao i ostatka evropske populacije, te se tokom kasnih prolećnih i ranih letnjih meseci može očekivati najveći broj novoobolelih slučajeva lajmske borelioze.

Kod obolelih osoba u Južnobačkom okrugu nije uočena razlika u obolevanju naspram pola, niti naspram starosti pacijenta. Da pol i starost nisu značajni faktori pri obolevanju od lajmske borelioze, zaključili su i ostali autori na osnovu uzoraka iz Srbije (107, 111) i drugih zemalja Evrope i Amerike (8, 20, 109).

U aktuelnoj studiji nije dokazana značajna razlika u trendovima obolevanja od rane faze lajmske borelioze naspram tipa prebivališta pacijenta iz Južnobačkog okruga, iako je većina

obolelih prijavila prebivalište u urbanoj sredini. Sa ovim rezultatom saglasna je studija sprovedena u Francuskoj (113). Ipak, nekoliko autora je pokazalo da je incidencija obolevanja veća u urbanim sredinama u Finskoj, Rusiji i Bugarskoj (159–161).

Kao deo tela sa najčešćom infestacijom kod ispitanika svih starosnih dobi identifikovani su donji ekstremiteti, pa glava i vrat, a zatim prednji deo trupa. U slučaju obolelih pacijenata učestalost je drugačija, te se kao deo tela gde se migratorni eritem najčešće uočava pokazala prednja strana trupa. Razlog za to može biti što je prednja strana trupa uglavnom prekrivena odećom, te se krpelj teško uočava tokom rane faze infestacije. Pacijenti najčešće postaju svesni prisustva krpelja tek nakon nekoliko dana, kada se njegove dimenzije uvećaju, nakon čega ih skidaju. U skladu s time, mogući faktor ovakve učestalosti pojave migratornog eritema na prednjoj strani trupa jeste potencijalna duža infestacija krpeljom u tom predelu.

U kontekstu geografskog lokaliteta infestacije krpeljima, uočeno je da su stanovnici Južnobačkog okruga izloženi infestaciji krpelja na teritoriji koja višestruko premašuje površinu samog okruga. Najveći broj infestacija koji je prijavljen odigrao se tokom boravka u prirodi u slobodno vreme (ruralni tip naselja), dok je manji broj pacijenata prijavio infestaciju krpelja usled rada u bašti, poseti groblju ili tokom rada. Do istih podataka su došli Rizoli i sar. u svojoj metaanalizi za Evropu (71). Metaanaliza koju su sproveli Nasirian i Zahirnia takođe ukazuje na to da je incidencija infestacije krpeljima u ruralnoj sredini veća nego u urbanim sredinama (149).

Na osnovu dvogodišnjeg uzorka, najveći broj infestacija ljudi izazvan je krpeljom *I. ricinus*. Krpelji vrste *R. sanguineus*, *D. reticulatus*, *Haemaphysalis spp.* i *I. hexagonus* znatno su ređi i sporadično parazitiraju na stanovnicima Južnobačkog okruga, sa čim je saglasna i studija

Simin i sar. (67). Pored toga, u studiji sprovedenoj u Pasterovom zavodu tokom 2020. godine koja se bavila izlaganju stanovništva virusu krpeljskog encefalitisa, prijavljeno je da su svi pacijenti uključeni u studiju prethodno infestirani od strane krpelja vrste *I. ricinus* (162). Dominantna infestacija ljudi krpeljom vrste *I. ricinus* prisutna je u više regiona Evrope, te se područjem njegove aktivnosti smatraju Zapadna, Centralna, Severna, Južna i Jugoistočna Evropa (68, 156, 163, 164).

Većina krpelja vrste *I. ricinus* koja je uklonjena sa stanovnika Južnobačkog okruga bila je u razvojnom stadijumu nimfi i adulta (ženke), dok su se larve i adulti mužjaci sporadično uočavali. Trend infestacije nimfi i adulta ženki zapažen u ovom istraživanju u saglasnosti je sa drugim istraživanjima u Srbiji i Evropi, koja uočavaju dominaciju nimfi i adulta ženki pri infestaciji ljudi i krupne divljači (20, 107, 108, 165). Razlozi zbog kojih se razvojni stadijumi larvi i adulta mužjaka ređe uočavaju kod ljudi mogu biti pre svega to što se i larve i mužjaci generalno kraće hrane na domaćinu od adulta ženke i nimfe, te osoba ima manje vremena da ih uoči. S druge strane, dimenzije larve su značajno manje od dimenzija nimfe i adulta ženke, čak i nakon 2 dana parazitiranja, što je čini teže uočljivom na telu čoveka (166). Što se tiče adulta mužjaka, poznato je da uzima izuzetno male porcije krvi, te infestira domaćina pre svega zbog potrage za ženkom, a ne zbog uzimanja krvnog obroka (76).

Prevalencija infekcije borelijama u krpeljima uklonjenih sa ljudi u ovom istraživanju iznosi 33,4%. S obzirom na to da je infekcija krpelja borelijama za potrebe ovog istraživanja ispitana PCR tehnikom, rezultati će biti poređeni samo sa studijama koje su koristile istu tehniku direktne detekcije borelija u krpeljima.

Rauter i Hartung su u svojoj metaanalizi podataka objavljenih na nivou 24 evropske zemlje prijavili generalnu prevalenciju infekcije borelijama kod krpelja od 13,7% (167). Na nivou pojedinačnih zemalja mogu se uočiti oscilacije u prevalenci infekcije tokom različitih godina, pa

je tako u Irskoj 1995. godine prijavljena prevalencija od 18% (168), dok je 1997–1989. prevalencija bila 12% (169). Na teritoriji Italije infekcija krpelja borelijama detektovana je znatno učestalije, te je 1994. godine prijavljen pozitivan nalaz u 40% krpelja (170), dok je 1998. registrovana infekcija u 11,4% ispitanih krpelja (171). Slične varijacije u prevalenciji infekcije uočavaju se i u Slovačkoj i Švajcarskoj (167).

U centralnoj i istočnoj Poljskoj prevalencija infekcije borelijama kod krpelja sakupljenih na terenu 2008–2009. godine iznosi 12,3% (172). U Helsinkiju je učestalost inficiranosti krpelja varirala u skladu sa ispitivanim terenima grada od 19% do 55%, te je kao prosek prijavljena prevalencija od 32% (159). Tokom 2001, 2003. i 2004. godine Milutinović i sar. detektovali su prevalenciju infekcije borelijama od 42,5% kod krpelja uzorkovanih u Srbiji (173). U Beogradu su Milutinović i sar. detektovali prevalenciju infekcije borelijama od 19,96% u sakupljenim krpeljima vrste *I. ricinus* (174).

S druge strane, ova studija se prevashodno bavila analizom krpelja koji su uklonjeni sa ljudi, a ne sakupljenih u slobodnoj prirodi, te bi možda prikladnije bilo izvršiti upoređivanje sa rezultatima studija koje su koristile sličan pristup za sakupljanje krpelja.

Analiza prevalencije infekcije borelijama kod krpelja uklonjenih sa ljudi koji žive u visoko endemskom području za lajmsku boreliozu u Švajcarskoj (Nušatel) pokazala je zaraženost borelijama kod 32,8% krpelja (155). Na severu Evrope (Švedska i Finska) prijavljena je prevalencija infekcije borelijama kod krpelja uklonjenih sa ljudi od 27,68% (153). U Italiji je 2017–2019. infekcija borelijama prijavljena u 23% krpelja vrste *I. ricinus* uklonjenih sa ljudi (175). Interesantno je napomenuti da u uzorku od 128 krpelja uklonjenih sa stanovnika severozapadne Italije april–oktobar 2018. godine, infekcija sa *B. burgdorferi* s. l. nije detektovana ni u jednom krpelju (176). S druge strane, grupa autora iz Holandije prijavila je infekciju

borelijama kod 50% ispitivanih krpelja uklonjenih sa ljudi (177). Autori iz Nemačke (širi region Hanovera, Severna Nemačka) prijavili su fluktuaciju u prevalenciji infekcije borelijama sensu lato kompleksa, te je infekcija sa *B. burgdorferi* sensu lato kompleksa u krpeljima uklonjenih sa ljudi bila 23,1% tokom 2006. godine, da bi do 2010. godine opala na 17,1%. Na istom terenu prevalencija infekcije borelijama sensu lato kompleksa krpelja uklonjenih sa ljudi iznosila je 26,0% tokom 2011. godine, te je i zabeležen i dalji rast tokom 2012. godine kada je zabeležena prevalencija od 23,4% (178). Od 2013. do 2017. godine na prostoru Hanovera prevalencije infekcije borelijama sensu lato kompleksa kod krpelja uklonjenih sa ljudi bila je 20,02% (179). Istraživači iz Slovačke prijavili su prevalenciju infekcije borelijama sensu lato kompleksa od 20,5% kod krpelja uklonjenih sa ljudi od 2008. do 2018. godine (180).

Prevalencija infekcije borelijama kod krpelja uklonjenih sa stanovnika Južnobačkog okruga (33,4%) u skladu je sa prethodnim studijama u Evropi i ne pokazuje veća odstupanja, iako se zna da je prevalencija infekcije krpelja borelijama zavisna od više faktora poput klimatskih uslova, tipa terena i vrsta životinja koje krpelji koriste za krvni obrok, a borelije koriste kao rezervoare (76).

U ovom je istraživanju ispitana i prevalencija infekcije krpelja uzročnikom *B. burgdorferi* s. l. u urbanim i ruralnim sredinama. Iako je nalaz infekcije borelijama bio češći u krpeljima iz ruralnih sredina, značajne razlike u prevalenciji infekcije nisu dokazane (28% u urbanoj sredini naspram 36% u ruralnoj sredini). Iz toga se može pretpostaviti da je rizik za kontakt sa zaraženim krpeljom u urbanoj i ruralnoj sredini približno jednak, sa čim je saglasna i studija iz Skandinavije (151). S druge strane, autori iz Škotske prijavljuju da je na njihovoj teritoriji rizik za kontakt sa inficiranim krpeljima i rizik za obolevanje od lajmske borelioze povećan u ruralnim sredinama, kao i da se povećava sa smanjenjem distance između doma ispitanika i ruba šume (181).

Istraživanje koje je obuhvatilo 18 lokaliteta širom Švajcarske pokazalo je podjednak rizik od kontakta sa krpeljom inficiranim borelijama u urbanim i ruralnim sredinama (182).

Postoje dve vrste laboratorijskih testova koji se koriste za procenu zdravlja ljudi: dijagnostički testovi i skrining testovi. Smatra se da dijagnostički testovi pružaju konačne informacije o prisustvu ili odsustvu ispitivane bolesti ili stanja. Suprotno tome, skrining testovi obično imaju prednosti nad dijagnostičkim testovima, poput manjih tehničkih zahteva ustanovi zdravstvene zaštite, lakše pristupačnosti, manje invazivnosti, manje opasnosti, niže cene, manje vremena koje zahtevaju za izvođenje, kao i izazivanje manje fizičke i psihološke nelagodnosti kod pacijenata. Skrining testovi su poznati po tome što su nesavršeni i ponekad dvosmisleni. Zbog toga je važno da se utvrdi u kojoj su meri ovi testovi u stanju da identifikuju verovatno prisustvo ili odsustvo ispitivane bolesti tako da njihovi nalazi podstiču odgovarajuće donošenje odluka (183).

Implikacije serološkog skining testa prisustva antitela protiv *Borrelia* spp. na kliničku praksu zavise od uloge koju testovi ispunjavaju u praksi i okruženja u kojem se testovi koriste. U analizi ECDC-a, prosečna senzitivnost komercijalnog serološkog testa (ELISA) kod pacijenata sa ranom fazom lajmske boreliozе bila je 0,54 (95% CI: 0,44 –0,65). To znači da od svih testiranih ljudi koji imaju EM, u proseku 46% slučajeva neće biti otkriveno. Specifičnost od 0,93 (95% CI: 0,90–0,95) znači da će kod ljudi bez EM 7% imati pozitivan test i smatrati se da imaju lajmsku boreliozu. Autori smatraju da u kliničkoj praksi ovaj skrining test ne daje dodatnu vrednost, jer je detektovana prediktivna vrednost testa preniska da bi bila korisna (184). Ovi rezultati su u skladu sa trenutnim smernicama koje ne preporučuju serološko testiranje i sugerišu da se pacijenti sa EM leče odmah (185).

Pored toga, pri korišćenju skrining testova (ELISA, IFA) za detekciju antitela protiv *Borrelia* spp. laboratorija uvek treba uzeti u obzir prevalenciju oboljenja među populacijom koja

može da generiše antitela koja daju i unakrsnu reaktivnost s antigenima borelija. Kao agensi takve vrste najčešće se pominju *Treponema pallidum*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori* i *Epstein Barr* virus. U skladu sa time, laboratorija treba da odredi specifične granične vrednosti za skrining serološke testove koje su odgovarajuće za specifičnu populaciju koja dostavlja uzorke za testiranje, tako da se uzme u obzir prevalencija oboljenja koja mogu dati antitela sa unakrsnom reakcijom, kao i prevalencija oboljenja koja se ciljano ispituje – u ovom slučaju lajmska borelioza.

Iz istog razloga, Zeler i sar. su prijavili manju heterogenost u rezultatima kod laboratorija koje su koristile *in house* testove za skrining na prisustvo antiborelija antitela, naspram laboratorija koje su koristile komercijalne testove sa unapred određenim/graničnim vrednostima (184).

U kontekstu specifičnih imunoglobulina, u studiji Zelera i sar., u vezi s pitanjem antitela IgM klase prijavljena je specifičnost skrining testova na nivou Evrope od 42% (95% CI: 31–54%) i senzitivnost od 90% (95% CI: 90–97%) prilikom testiranja pacijenata u prvoj fazi lajmske borelioze. Specifičnost skrining testova za IgM klasu antitela u ovoj studiji kod stanovništva Južnobačkog okruga iznosi 40,54% (95% CI: 31,32–50,27%), dok je senzitivnost 75% (95% CI: 42,85–94,51%). To zapravo znači da će od 100 stanovnika Južnobačkog okruga koje je infestirao krpelj oko 60% osoba dobiti lažno pozitivan nalaz na IgM, dok će od prve faze lajmske borelioze oboleti 2 do 3 osobe.

S druge strane, senzitivnost od 75% upućuje na to da 25% osoba sa prebivalištem u Južnobačkom okrugu koje razviju EM neće imati pozitivan nalaz u IgM klasi antitela protiv *Borrelia* spp. Niska senzitivnost je u ovom slučaju razumljiva s obzirom na to da se lezija (EM) u ranoj fazi lajmske borelioze češće razvija pre nego što se postigne titar IgM antitela koji odgovara graničnim vrednostima serološkog testa (184).

Studija sprovedena u Nacionalnom zdravstvenom institutu u SAD (*National Institutes of Health*) (NIH – *National Eye Institute*; SAD) prijavila je pozitivnu prediktivnu vrednost seroloških testova za detekciju antiborelijskih antitela od 7,41% kod skrininga pacijenata sa uveitisom. Sa naglaskom na trošak rutinskog skrininga, autori su zaključili nesvršishodnost serološkog ispitivanja na antiborelijska antitela kod pacijenata sa uveitisom, te predlažu detaljnu procenu faktora rizika poput prebivališta, izlaganja ubodu krpelja i postojanju specifičnih rizičnih aktivnosti (186). Pozitivna prediktivna vrednost prvostepenog serološkog ispitivanja antiborelijskih antitela klase IgM kod stanovništva Južnobačkog okruga još je niža od one koje su prijavili istraživači iz SAD – 3,61% (95% CI: 2,54–5,09%), dok je negativna prediktivna vrednost značajno viša – 98,20% (95% CI: 95,24–99,34%).

U skladu sa time, serološko testiranje pacijenata na IgM klasu antitela kod populacije Južnobačkog okruga nema svrsishodnost pri dokazivanju ili predikciji obolevanja kod pacijenata infestiranih krpeljima, te nasuprot preporukama Ministarstva zdravlja R. Srbije nije dovoljan kriterijum za ordiniranje antibiotske terapije. Ipak bi negativan serološki nalaz u IgM klasi antitela mogao biti od diferencijalno-dijagnostičke koristi prilikom otpisivanja mogućeg obolevanja od prve faze lajmske borelioze.

Zbog velike zavisnosti od specifičnih faktora koji mogu dovesti do unakrsne reaktivnosti antitela s antigenima *Borrelia* spp. i zbog mogućeg kašnjenja pri generisanju IgM klase antitela protiv *Borrelia* spp., mnogi vodiči za dijagnostiku lajmske borelioze lekarima preporučuju veliki oprez prilikom tumačenja nalaza IgM antitela tokom skrining testiranja (127, 140, 141).

U vezi s pitanjem IgG klase antitela usmerenih protiv *Borrelia* spp. Zeler i sar. prijavljuju senzitivnost prvostepenih seroloških testova za detekciju obolelih od rane faze lajmske borelioze na nivou Evrope od 36% (95% CI: 29–43%) i specifičnost od 96% (95% CI: 94–98%) (184). Kod

stanovnika Južnobačkog okruga sa infestacijom krpelja senzitivnost testova za detekciju IgG antitela protiv *Borrelia* spp. iznosi 43,75% (95% CI: 19,75–70,12%), dok je specifičnost 76,47 % (95% CI: 67,82–83,76%). To znači da će od 100 stanovnika Južnobačkog okruga koje je infestirao krpelj oko 20 osoba dobiti lažno pozitivan nalaz na IgG antitela, dok će od prve faze lajmske borelioze oboleti 2 do 3 osobe.

Senzitivnost od oko 44% upućuje na to da 56% osoba sa prebivalištem u Južnobačkom okrugu koje razviju EM neće imati pozitivan nalaz u IgG klasi antitela protiv *Borrelia* spp. Postoji nekoliko razloga zbog kojih je senzitivnost seroloških testova na IgG klasu antitela protiv *Borrelia* spp. veća kod ispitivane populacije nego kod proseka izvedenog u studiji ECDC-a. Na prvom mestu, ovde su ispitivani uzorci pacijenata kod kojih je dokazana ranije infestacija krpeljima, dok se isti kriterijum nije koristio u analizi ECDC-a (184). Uključivanjem ispitanika koji su dokazano infestirani krpeljima povećava se mogućnost stvarno pozitivnog nalaza. Pored toga, lokalne varijacije u prevalenciji infekcije sa *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Epstein Barr virusom* i dr. mogu uticati na senzitivnost testova koje detektuju IgG antitela reaktivna s antigenima *Borrelia* spp. (8,187).

Molekularne PCR analize krpelja uklonjenih sa ljudi na prisustvo DNK *B. burgdorferi* s. l. pokazale su senzitivnost od 100,00% (95% CI: 39,76–100,00%), specifičnost 74,42% (95% CI: 63,87–83,22%). Preciznost testa je 75,16% (95% CI: 64,93–83,66%), dok je pozitivna prediktivna vrednost 10,39% (95% CI: 7,48–4,25%), a negativna 100,00%.

Rezultati dobijeni tokom ovog ispitivanja u skladu su sa istraživanjima sprovedenim u Pasterovom zavodu tokom prethodnih godina, gde je pokazano da molekularna detekcija patogenih uzročnika u krpeljima ne omogućava preciznu predikciju oboljenja pacijenata, s obzirom na to da je infekcija krpelja patogenim genospecijesima borelija detektovana u 29%

slučajeva, dok je migratorni eritem uočen kod samo jednog pacijenta (67). Dalje, Vilhemson i sar. su prijavili da od 78 pacijenata koji su razvili infekciju borelijama (detektovan EM ili serokonverzija), kod samo 45% uklonjenih krpelja dokazana je DNK borelija, dok PCR analizom prisustvo borelija u krpeljima nije dokazano (107). Hofhojs i sar. su u svom modelu pokazali da detekcija DNK borelija u krpelju koji se dugo hranio daje rizik od obolevanja kod čoveka od 14,4% (177).

Ipak, visoka negativna prediktivna vrednost ove analize mogla bi da omogući trijažiranje pacijenata i praktičniju raspodelu ljudskih i laboratorijskih resursa u skladu sa rizikom od obolevanja od lajmske borelioze. Potrebno je izvršiti dodatna ispitivanja radi finalnog utvrđivanja da li se ova analiza može koristiti kao rutinska skrining metoda u cilju otpisivanja rizika od obolevanja od rane faze lajmske borelioze.

8. ZAKLJUČAK

Na osnovu sprovedenog istraživanja, može da se zaključi sledeće:

1. Pol ne predstavlja faktor rizika za izlaganje krpeljima i obolevanje od rane faze lajmske borelioze kod stanovništva Južnobačkog okruga.
2. Starosne kategorije dece (0–10 godine) i odraslih (20–65 godina) sa prebivalištem u Južnobačkom okrugu češće su izlagane napadima krpelja i mogu se smatrati rizičnim kategorijama za infestaciju krpeljima naspram adolescenata i starijih osoba.
3. Starost ne predstavlja faktor rizika za obolevanje od rane faze lajmske borelioze kod stanovništva Južnobačkog okruga.
4. Kao godišnje doba sa najvećim rizikom za infestaciju krpeljima kod stanovništva Južnobačkog okruga identifikovano je proleće.
5. Meseci sa najvećim rizikom za obolevanje od rane faze lajmske borelioze kod stanovništva Južnobačkog okruga jesu maj, jun i jul.
6. Tip naselja u kojem osoba živi ne predstavlja faktor rizika za izlaganje krpeljima i obolevanje od rane faze lajmske borelioze kod stanovništva Južnobačkog okruga.
7. Pozitivna prediktivna vrednost seroloških (ELISA, IFA) skrining testova u dijagnostici prve faze lajmske borelioze kod stanovnika Južnobačkog okruga infestiranih krpeljima je niska i ne treba se koristiti kao zamena za fizikalni pregled, koji je zlatni standard.
8. Negativna prediktivna vrednost seroloških (ELISA, IFA) skrining testova kod stanovnika Južnobačkog okruga infestiranih krpeljima je visoka. Serološki skrining testovi mogu imati koristi prilikom diferencijalno-dijagnostičkog otpisivanja mogućeg obolevanja od rane faze lajmske borelioze kod stanovnika Južnobačkog okruga.

9. Pozitivna prediktivna vrednost molekularnih skrining testova krpelja na prisustvo DNK *B. burgdorferi* s. l. u dijagnostici rane faze lajmske borelioze kod stanovnika Južnobačkog okruga infestiranih krpeljima viša je od pozitivnih prediktivnih vrednosti seroloških skrining testova, ali nedovoljno visoka da bi se analiza mogla koristiti kao zamena za fizikalni pregled, koji je zlatni standard.
10. Negativna prediktivna vrednost molekularnih PCR skrining testova krpelja na prisustvo DNK *B. burgdorferi* s. l. u dijagnostici rane faze lajmske borelioze kod stanovnika Južnobačkog okruga infestiranih krpeljima viša je od negativnih prediktivnih vrednosti seroloških skrining testova i može se koristiti tokom diferencijalno-dijagnostičkog otpisivanja mogućeg obolevanja od rane faze lajmske borelioze kod stanovnika Južnobačkog okuga.

9. REFERENCE

1. Buchwald A. Ein Fall von diffuser idiopathischer Haut-Atrophie. Vierteljahresschr Für Dermatol Syph. 1883 Dec 1;10(1):553–6.
2. Leven L. Acrodermatitis chronica atrophicans. (Herxheimer-Hartmann). Arch Für Dermatol Syph. 1903 Jun 1;65(2):247–54.
3. Dammin GJ. Erythema Migrans: A Chronicle. Rev Infect Dis. 1989;11(1):142–51.
4. Holubar K. Erythema chronicum migrans: Afzelius and Lipschütz. J Am Acad Dermatol. 1985 Oct;13(4):663–4.
5. Burgdorfer W. The Historical Road to the Discovery of *Borrelia burgdorferi*. In: Weber K, Burgdorfer W, Schierz G, editors. Aspects of Lyme Borreliosis [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 1993 [cited 2020 Mar 18]. p. 21–8. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-642-77614-4_2
6. Garin C, Bujadoux A. Paralysis by ticks. 1922. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1993 Jan;16(1):168–9.
7. Felz MW, Smith CD, Swift TR. A Six-Year-Old Girl with Tick Paralysis. N Engl J Med. 2000 Jan 13;342(2):90–4.
8. Halperin JJ. Lyme Disease, 2nd Edition: An Evidence-based Approach. CABI; 2018. 301 p.

9. Wormser GP, Wormser V. Did Garin and Bujadoux Actually Report a Case of Lyme Radiculoneuritis? *Open Forum Infect Dis* [Internet]. 2016 Apr 26 [cited 2020 Mar 17];3(2). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4943566/>
10. Åsbrink E, Hovmark A. Cutaneous Manifestations in Ixodes-borne *Borrelia Spirochetosis*. *Int J Dermatol*. 1987 May;26(4):215–23.
11. Schuppli R. Erythrodermien, Atrophien, Sklerosen, Induratio penis plastica, Elephantiasis. *Dermatology*. 1950;100(3):196–200.
12. Gotz H, Nasemann T. [The problem of viral etiology of Herxheimer's acrodermatitis chronica atrophicans]. *Hautarzt Z Dermatol Venerol Verwandte Geb*. 1956 Aug;7(8):349–53.
13. Scrimenti RJ. Erythema chronicum migrans. *Arch Dermatol*. 1970 Jul;102(1):104–5.
14. Malawista SE. Pathogenesis of Lyme disease. *Rheumatol Int*. 1989 Nov 1;9(3):233–5.
15. Steere AC, Malawista SE. Cases of Lyme disease in the United States: locations correlated with distribution of *Ixodes dammini*. *Ann Intern Med*. 1979 Nov;91(5):730–3.
16. Barbour AG, Benach JL. Discovery of the Lyme Disease Agent. Casadevall A, editor. *mBio*. 2019 Sep 17;10(5):e02166-19, /mbio/10/5/mBio.02166-19.atom.
17. Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Péter O, Aeschlimann A. Erythema chronicum migrans--a tickborne spirochetosis. *Acta Trop*. 1983 Mar;40(1):79–83.
18. Burgdorfer W. How the discovery of *Borrelia burgdorferi* came about. *Clin Dermatol*. 1993 Jul;11(3):335–8.

19. Johnson RC, Schmid GP, Hyde FW, Steigerwalt AG, Brenner DJY 1984. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: Etiologic Agent of Lyme Disease. *Int J Syst Evol Microbiol.* 34(4):496–7.
20. Lipsker D, Jaulhac B, editors. *Lyme borreliosis: biological and clinical aspects.* Basel ; New York: Karger; 2009. 212 p. (Current problems in dermatology).
21. Family: Spirochaetaceae [Internet]. [cited 2020 Mar 24]. Available from: <https://lpsn.dsmz.de/family/spirochaetaceae>
22. Barbour AG, Adeolu M, Gupta RS. Division of the genus *Borrelia* into two genera (corresponding to Lyme disease and relapsing fever groups) reflects their genetic and phenotypic distinctiveness and will lead to a better understanding of these two groups of microbes (Margos et al. (2016) There is inadequate evidence to support the division of the genus *Borrelia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* doi: 10.1099/ijsem.0.001717). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017;67(6):2058–67.
23. Margos G, Marosevic D, Cutler S, Derdakova M, Diuk-Wasser M, Emler S, et al. There is inadequate evidence to support the division of the genus *Borrelia*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2017 Apr 1;67(4):1081–4.
24. Potkonjak A. Eco-Epidemiological Research Of *Borrelia*. *Med Rev.* 2018;10(2):6.
25. Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2011 Sep;2(3):123–8.

26. Hyde JA. *Borrelia burgdorferi* Keeps Moving and Carries on: A Review of Borrelial Dissemination and Invasion. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Feb 21 [cited 2020 Mar 19];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5318424/>
27. Gray J, Kahl O, Lane RS, Stanek G. *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology, and Control*. CABI; 2002. 364 p.
28. Jabbari N, Glusman G, Joesch-Cohen LM, Reddy PJ, Moritz RL, Hood L, et al. Whole genome sequence and comparative analysis of *Borrelia burgdorferi* MM1. *PLoS ONE* [Internet]. 2018 Jun 11 [cited 2020 Mar 20];13(6). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5995427/>
29. Stewart PE, Byram R, Grimm D, Tilly K, Rosa PA. The plasmids of *Borrelia burgdorferi*: essential genetic elements of a pathogen. *Plasmid*. 2005 Jan;53(1):1–13.
30. Adler B, editor. *Spirochete Biology: The Post Genomic Era* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [cited 2020 Mar 21]. (Current Topics in Microbiology and Immunology; vol. 415). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-89638-0>
31. Chaconas G, Castellanos M, Verhey TB. Changing of the guard: How the Lyme disease spirochete subverts the host immune response. *J Biol Chem*. 2020 Jan 10;295(2):301–13.
32. Coburn J, Leong J, Chaconas G. Illuminating the roles of the *Borrelia burgdorferi* adhesins. *Trends Microbiol*. 2013 Aug;21(8):372–9.

33. Li X, Liu X, Beck DS, Kantor FS, Fikrig E. *Borrelia burgdorferi* Lacking BBK32, a Fibronectin-Binding Protein, Retains Full Pathogenicity. *Infect Immun.* 2006 Jun;74(6):3305–13.
34. Kenedy MR, Lenhart TR, Akins DR. The Role of *Borrelia burgdorferi* Outer Surface Proteins. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012 Oct;66(1):1–19.
35. Stanek G, Reiter M. The expanding Lyme *Borrelia* complex--clinical significance of genomic species? *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2011 Apr;17(4):487–93.
36. Lin YP, Benoit V, Yang X, Martínez-Herranz R, Pal U, Leong JM. Strain-specific variation of the decorin-binding adhesin DbpA influences the tissue tropism of the Lyme disease spirochete. *PLoS Pathog.* 2014 Jul;10(7):e1004238.
37. Lin YP, Chen Q, Ritchie JA, Dufour NP, Fischer JR, Coburn J, et al. Glycosaminoglycan binding by *Borrelia burgdorferi* adhesin BBK32 specifically and uniquely promotes joint colonization. *Cell Microbiol.* 2015 Jun;17(6):860–75.
38. van der Heijden IM, Wilbrink B, Rijpkema SG, Schouls LM, Heymans PH, van Embden JD, et al. Detection of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* by reverse line blot in the joints of Dutch patients with Lyme arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999 Jul;42(7):1473–80.
39. Picken RN, Strle F, Picken MM, Ruzic-Sabljić E, Maraspin V, Lotric-Furlan S, et al. Identification of three species of *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, and *B. afzelii*) among isolates from acrodermatitis chronica atrophicans lesions. *J Invest Dermatol.* 1998 Mar;110(3):211–4.

40. Marconi RT, Hohenberger S, Jauris-Heipke S, Schulte-Spechtel U, LaVoie CP, Rößler D, et al. Genetic Analysis of *Borrelia garinii* OspA Serotype 4 Strains Associated with Neuroborreliosis: Evidence for Extensive Genetic Homogeneity. *J Clin Microbiol.* 1999 Dec;37(12):3965–70.
41. Ogrinc K, Lotrič-Furlan S, Maraspin V, Lusa L, Cerar T, Ružič-Sabljič E, et al. Suspected early Lyme neuroborreliosis in patients with erythema migrans. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2013 Aug;57(4):501–9.
42. Logar M, Ruzić-Sabljić E, Maraspin V, Lotric-Furlan S, Cimperman J, Jurca T, et al. Comparison of erythema migrans caused by *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*. *Infection.* 2004 Feb;32(1):15–9.
43. Wormser GP, Halperin JJ. Editorial Commentary: Toward a Better Understanding of European Lyme Neuroborreliosis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2013 Aug 15;57(4):510–2.
44. Wilske B, Jauris-Heipke S, Lobentanzer R, Pradel I, Preac-Mursic V, Rössler D, et al. Phenotypic analysis of outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by monoclonal antibodies: relationship to genospecies and OspA serotype. *J Clin Microbiol.* 1995 Jan;33(1):103–9.
45. Chao LL, Chen YJ, Shih CM. First isolation and molecular identification of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* from skin biopsies of patients in Taiwan. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* 2011 Mar;15(3):e182-187.

46. Zhong X, Nouri M, Råberg L. Colonization and pathology of *Borrelia afzelii* in its natural hosts. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2019;10(4):822–7.
47. Kostić T, Momčilović S, Perišić ZD, Apostolović SR, Cvetković J, Jovanović A, et al. Manifestations of Lyme carditis. *Int J Cardiol.* 2017 Apr 1;232:24–32.
48. Robinson ML, Kobayashi T, Higgins Y, Calkins H, Melia MT. Lyme carditis. *Infect Dis Clin North Am.* 2015 Jun;29(2):255–68.
49. Patterson-Fortin J, Kohli A, Suarez MJ, Miller PE. Ocular Lyme borreliosis as a rare presentation of unilateral vision loss. *BMJ Case Rep.* 2016 Apr 25;2016.
50. Newman EA, Eisen L, Eisen RJ, Fedorova N, Hasty JM, Vaughn C, et al. *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochetes in wild birds in northwestern California: associations with ecological factors, bird behavior and tick infestation. *PloS One.* 2015;10(2):e0118146.
51. Kurtenbach K, De Michelis S, Etti S, Schäfer SM, Sewell HS, Brade V, et al. Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato--the key role of host complement. *Trends Microbiol.* 2002 Feb;10(2):74–9.
52. Kuo CC, Lin YF, Yao CT, Shih HC, Chung LH, Liao HC, et al. Tick-borne pathogens in ticks collected from birds in Taiwan. *Parasit Vectors.* 2017 Nov 25;10(1):587.
53. Tracy KE, Baumgarth N. *Borrelia burgdorferi* Manipulates Innate and Adaptive Immunity to Establish Persistence in Rodent Reservoir Hosts. *Front Immunol.* 2017;8:116.
54. Estrada-Peña A, Sprong H, Cabezas-Cruz A, de la Fuente J, Ramo A, Coipan EC. Nested coevolutionary networks shape the ecological relationships of ticks, hosts, and the Lyme

- disease bacteria of the *Borrelia burgdorferi* (s.l.) complex. *Parasit Vectors* [Internet]. 2016 Sep 23 [cited 2020 Mar 24];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5035442/>
55. Humair PF, Gern L. The wild hidden face of Lyme borreliosis in Europe. *Microbes Infect.* 2000 Jul 1;2(8):915–22.
 56. Mysterud A, Heylen DJA, Matthysen E, Garcia AL, Jore S, Viljugrein H. Lyme neuroborreliosis and bird populations in northern Europe. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2019 May 29;286(1903):20190759.
 57. Buczek AM, Buczek W, Buczek A, Bartosik K. The Potential Role of Migratory Birds in the Rapid Spread of Ticks and Tick-Borne Pathogens in the Changing Climatic and Environmental Conditions in Europe. *Int J Environ Res Public Health.* 2020 Jan;17(6):2117.
 58. Coipan CE, van Duijvendijk GLA, Hofmeester TR, Takumi K, Sprong H. The genetic diversity of *Borrelia afzelii* is not maintained by the diversity of the rodent hosts. *Parasit Vectors* [Internet]. 2018 Aug 6 [cited 2020 Mar 25];11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6090804/>
 59. Gray JS, Kahl O, Lane RS, Levin ML, Tsao JI. Diapause in ticks of the medically important *Ixodes ricinus* species complex. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2016 Jul;7(5):992–1003.
 60. Gray JS. The ecology of ticks transmitting Lyme borreliosis. *Exp Appl Acarol.* 1998;22:249–58.

61. Muñoz-Leal S, González-Acuña D. The tick *Ixodes uriae* (Acari: Ixodidae): Hosts, geographical distribution, and vector roles. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2015 Sep;6(6):843–68.
62. Smith RP, Muzaffar SB, Lavers J, Lacombe EH, Cahill BK, Lubelczyk CB, et al. *Borrelia garinii* in Seabird Ticks (*Ixodes uriae*), Atlantic Coast, North America. *Emerg Infect Dis.* 2006 Dec;12(12):1909–12.
63. Telford SR, Spielman A. Competence of a rabbit-feeding *Ixodes* (Acari: Ixodidae) as a vector of the Lyme disease spirochete. *J Med Entomol.* 1989 Mar;26(2):118–21.
64. Dolan MC, Maupin GO, Panella NA, Golde WT, Piesman J. Vector competence of *Ixodes scapularis*, *I. spinipalpis*, and *Dermacentor andersoni* (Acari:Ixodidae) in transmitting *Borrelia burgdorferi*, the etiologic agent of Lyme disease. *J Med Entomol.* 1997 Mar;34(2):128–35.
65. Mysterud A, Byrkjeland R, Qviller L, Viljugrein H. The generalist tick *Ixodes ricinus* and the specialist tick *Ixodes trianguliceps* on shrews and rodents in a northern forest ecosystem—a role of body size even among small hosts. *Parasit Vectors.* 2015 Dec 16;8(1):639.
66. Cayol C, Jääskeläinen A, Koskela E, Kyröläinen S, Mappes T, Siukkola A, et al. Sympatric *Ixodes* -tick species: pattern of distribution and pathogen transmission within wild rodent populations. *Sci Rep.* 2018 Nov 9;8(1):1–10.
67. Simin V, Lalošević D, Mijatović D, Tomanović S, Miljević M, Čabrilo B, et al. *Borellia burgdorferi* infection in removed ticks and anti-borrelia antibodies in infested patients admitted to the Pasteur institute, Novi Sad. *Vet Glas.* 2020 OnLine-First;(00):8–8.

68. Banović P, Díaz-Sánchez AA, Galon C, Simin V, Mijatović D, Obregón D, et al. Humans infested with *Ixodes ricinus* are exposed to a diverse array of tick-borne pathogens in Serbia. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2020 Nov 23;101609.
69. Čakić S, Veinović G, Cerar T, Mihaljica D, Sukara R, Ružić-Sabljić E, et al. Diversity of Lyme borreliosis spirochetes isolated from ticks in Serbia. *Med Vet Entomol.* 2019 Dec;33(4):512–20.
70. Potkonjak A, Kleinerman G, Gutiérrez R, Savić S, Vračar V, Nachum-Biala Y, et al. Occurrence of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in *Ixodes ricinus* Ticks with First Identification of *Borrelia miyamotoi* in Vojvodina, Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis* Larchmt N. 2016;16(10):631–5.
71. Rizzoli A, Silaghi C, Obiegala A, Rudolf I, Hubálek Z, Földvári G, et al. *Ixodes ricinus* and Its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health. *Front Public Health.* 2014;2:251.
72. Anderson JF. Epizootiology of Lyme borreliosis. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1991;77:23–34.
73. Estrada-Peña A, Gray JS, Kahl O, Lane RS, Nijhoff AM. Research on the ecology of ticks and tick-borne pathogens—methodological principles and caveats. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2013 [cited 2020 Apr 19];3. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2013.00029/full>
74. Rudolph D, Knülle W. Site and mechanism of water vapour uptake from the atmosphere in ixodid ticks. *Nature.* 1974 May 3;249(452):84–5.

75. Herrmann C, Gern L. Search for blood or water is influenced by *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *Parasit Vectors* [Internet]. 2015 Jan 6 [cited 2020 Apr 19];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4311481/>
76. Braks MAH, van Wieren SE, Takken W, Sprong H, editors. Ecology and prevention of Lyme borreliosis [Internet]. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers; 2016 [cited 2020 Apr 19]. (Ecology and Control of Vector-borne diseases; vol. 4). Available from: <https://www.wageningenacademic.com/doi/book/10.3920/978-90-8686-838-4>
77. Randolph SE, Storey K. Impact of Microclimate on Immature Tick-Rodent Host Interactions (Acari: Ixodidae): Implications for Parasite Transmission. *J Med Entomol*. 1999 Nov 1;36(6):741–8.
78. Radolf JD, Caimano MJ, Stevenson B, Hu LT. Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat Rev Microbiol*. 2012 Jan 9;10(2):87–99.
79. Pospisilova T, Urbanova V, Hes O, Kopacek P, Hajdusek O, Sima R. Tracking of *Borrelia afzelii* Transmission from Infected *Ixodes ricinus* Nymphs to Mice. *Infect Immun* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2020 Apr 20];87(6). Available from: <https://iai.asm.org/content/87/6/e00896-18>
80. Jacquet M, Genné D, Belli A, Maluenda E, Sarr A, Voordouw MJ. The abundance of the Lyme disease pathogen *Borrelia afzelii* declines over time in the tick vector *Ixodes ricinus*. *Parasit Vectors*. 2017 May 25;10(1):257.

81. Bonnet SI, Binetruy F, Hernández-Jarguín AM, Duron O. The Tick Microbiome: Why Non-pathogenic Microorganisms Matter in Tick Biology and Pathogen Transmission. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2017 [cited 2020 Apr 20];7. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2017.00236/full>
82. Genné D, Sarr A, Rais O, Voordouw MJ. Competition Between Strains of *Borrelia afzelii* in Immature *Ixodes ricinus* Ticks Is Not Affected by Season. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2019 [cited 2020 Apr 20];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2019.00431/full>
83. Suppan J, Engel B, Marchetti-Deschmann M, Nürnberger S. Tick attachment cement - reviewing the mysteries of a biological skin plug system. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2018;93(2):1056–76.
84. Šimo L, Kazimirova M, Richardson J, Bonnet SI. The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2017 [cited 2020 Apr 20];7. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2017.00281/full>
85. Blisnick AA, Foulon T, Bonnet SI. Serine Protease Inhibitors in Ticks: An Overview of Their Role in Tick Biology and Tick-Borne Pathogen Transmission. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2017 [cited 2020 Apr 20];7. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2017.00199/full>
86. Brossard M, Wikel SK. Tick immunobiology. *Parasitology*. 2004;129 Suppl:S161-176.

87. Cabezas-Cruz A, Hodžić A, Román-Carrasco P, Mateos-Hernández L, Duscher GG, Sinha DK, et al. Environmental and Molecular Drivers of the α -Gal Syndrome. *Front Immunol* [Internet]. 2019 [cited 2020 Apr 20];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.01210/full>
88. de la Fuente J, Pacheco I, Villar M, Cabezas-Cruz A. The alpha-Gal syndrome: new insights into the tick-host conflict and cooperation. *Parasit Vectors*. 2019 Apr 3;12(1):154.
89. Nuttall PA, Labuda M. Tick-host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology*. 2004;129 Suppl:S177-189.
90. Nuttall PA. Tick saliva and its role in pathogen transmission. *Wien Klin Wochenschr* [Internet]. 2019 May 6 [cited 2020 Apr 20]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s00508-019-1500-y>
91. Labuda M, Kozuch O, Zuffová E, Elecková E, Hails RS, Nuttall PA. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts. *Virology*. 1997 Aug 18;235(1):138–43.
92. Voordouw MJ. Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens. *Parasitology*. 2015 Feb;142(2):290–302.
93. Ostfeld RS, Brunner JL. Climate change and Ixodes tick-borne diseases of humans. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* [Internet]. 2015 Apr 5 [cited 2020 Apr 21];370(1665). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4342967/>

94. Alkhishe AA, Peterson AT, Samy AM. Climate change influences on the potential geographic distribution of the disease vector tick *Ixodes ricinus*. *PloS One*. 2017;12(12):e0189092.
95. Bouchard C, Dibernardo A, Koffi J, Wood H, Leighton P, Lindsay L. Increased risk of tick-borne diseases with climate and environmental changes. *Can Commun Dis Rep*. 2019 Apr 4;45(4):83–9.
96. United Nations. *World Urbanization Prospects The 2014 Revision United*. New York: Department of Economic and Social Affairs, Population Division; 2015.
97. McKinney ML. Urbanization as a major cause of biotic homogenization. *Biol Conserv*. 2006 Jan;127(3):247–60.
98. McKinney ML. Effects of urbanization on species richness: A review of plants and animals. *Urban Ecosyst*. 2007;
99. Bartosik K, Kubrak T, Olszewski T, Jung M, Buczek A. PREVENTION OF TICK BITES AND PROTECTION AGAINST TICK-BORNE DISEASES IN SOUTH-EASTERN POLAND. *Ann Agric Environ Med*. 2008 Dec 28;15(2):181–5.
100. Kaya AD, Parlak AH, Ozturk CE, Behcet M. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* infection among forestry workers and farmers in Duzce, north-western Turkey. *New Microbiol*. 2008 Apr;31(2):203–9.
101. Hristea A, Hristescu S, Ciufecu C, Vasile A. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in Romania. *Eur J Epidemiol*. 2001;17(9):891–6.

102. Cetin E, Sotoudeh M, Auer H, Stanek G. Paradigm Burgenland: risk of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection indicated by variable seroprevalence rates in hunters. *Wien Klin Wochenschr.* 2006 Nov;118(21–22):677–81.
103. Garcia-Marti I, Zurita-Milla R, Swart A. Modelling tick bite risk by combining random forests and count data regression models. *PloS One.* 2019;14(12):e0216511.
104. Garcia-Marti I, Zurita-Milla R, Harms MG, Swart A. Using volunteered observations to map human exposure to ticks. *Sci Rep [Internet].* 2018 Oct 18 [cited 2020 Apr 21];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6194133/>
105. Daly ER, Fredette C, Mathewson AA, Dufault K, Swenson DJ, Chan BP. Tick bite and Lyme disease-related emergency department encounters in New Hampshire, 2010–2014. *Zoonoses Public Health.* 2017 Dec;64(8):655–61.
106. Guven O, Satilmis D, Sonmez FT, Demir B, Erdogan Ö. TICK INFESTATION: A 200-PATIENTS' SERIES. *Afr J Infect Dis.* 2017 Jun 8;11(2):62–7.
107. Mladenović J. Epidemiološki aspekti lajmske bolesti na teritoriji grada Beograda. [Niš]: Univerzitet u Nišu; 2014.
108. Wilhelmsson P, Lindblom P, Fryland L, Nyman D, Jaenson TG, Forsberg P, et al. Ixodes ricinus ticks removed from humans in Northern Europe: seasonal pattern of infestation, attachment sites and duration of feeding. *Parasit Vectors.* 2013 Dec 20;6:362.
109. Hubálek Z. Epidemiology of Lyme Borreliosis. In: *Lyme Borreliosis.* Basel: Karger; 2009. p. 31–50.

110. Stanek G, Fingerle V, Hunfeld KP, Jaulhac B, Kaiser R, Krause A, et al. Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Jan;17(1):69–79.
111. Kovačević Berić D. Epidemiological Characteristics of Lyme Disease in North District of Bačka (Serbia) for the Period 2006-2015. *Med Data.* 2017;9(1):33–7.
112. Dimitrovic R. Lyme borreliosis in Yugoslavia 1987– 1994. Warsaw: WHO; 1995 p. 182–91.
113. Letrilliart L, Ragon B, Hanslik T, Flahault A. Lyme disease in France: a primary care-based prospective study. *Epidemiol Infect.* 2005 Oct;133(5):935–42.
114. Iyer R, Caimano MJ, Luthra A, Axline D, Corona A, Iacobas DA, et al. Stage-specific global alterations in the transcriptomes of Lyme disease spirochetes during tick feeding and following mammalian host adaptation. *Mol Microbiol.* 2015 Feb;95(3):509–38.
115. Sonenshine DE, Macaluso KR. Microbial Invasion vs. Tick Immune Regulation. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2017 Sep 5 [cited 2019 Sep 30];7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2017.00390/full>
116. Figlerowicz M, Urbanowicz A, Lewandowski D, Jodynys-Liebert J, Sadowski C. Functional Insights into Recombinant TROSPA Protein from *Ixodes ricinus*. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 Oct 18 [cited 2019 Oct 15];8(10). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3800121/>
117. Banović P, Mijatović D, Lalošević D. New pathophysiological aspects of migratory erythema development in Lyme borreliosis. *Prax Medica.* 2019;48(3–4):37–41.

118. Mbow ML, Gilmore RD, Titus RG. An OspC-Specific Monoclonal Antibody Passively Protects Mice from Tick-Transmitted Infection by *Borrelia burgdorferi* B31. *Infect Immun.* 1999 Oct;67(10):5470–2.
119. Ramamoorthi N, Narasimhan S, Pal U, Bao F, Yang XF, Fish D, et al. The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature.* 2005 Jul 28;436(7050):573–7.
120. Hovius JW, Schuijt TJ, de Groot KA, Roelofs JJTH, Oei GA, Marquart JA, et al. Preferential Protection of *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto by a Salp 15 Homologue in *Ixodes ricinus* Saliva. *J Infect Dis.* 2008 Oct 15;198(8):1189–97.
121. Kraiczy P, Stevenson B. Complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*: Structure, function and regulation of gene expression. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2013 Feb;4(0):26–34.
122. von Lackum K, Miller JC, Bykowski T, Riley SP, Woodman ME, Brade V, et al. *Borrelia burgdorferi* Regulates Expression of Complement Regulator-Acquiring Surface Protein 1 during the Mammal-Tick Infection Cycle. *Infect Immun.* 2005 Nov;73(11):7398–405.
123. Lovrich SD, Jobe DA, Schell RF, Callister SM. Borreliacidal OspC Antibodies Specific for a Highly Conserved Epitope Are Immunodominant in Human Lyme Disease and Do Not Occur in Mice or Hamsters. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005 Jun;12(6):746–51.
124. Aslam B, Nisar MA, Khurshid M, Farooq Salamat MK. Immune escape strategies of *Borrelia burgdorferi*. *Future Microbiol.* 2017 Oct;12(13):1219–37.

125. CDC. Case Definitions for Infectious Conditions Under Public Health Surveillance: (547492006-001) [Internet]. U.S. Department of Health and Human Services; 1997 [cited 2020 May 4]. Available from: <http://doi.apa.org/get-pe-doi.cfm?doi=10.1037/e547492006-001>
126. Stanek G, O Connel S, Cimmino M, Aberer E, Kristoferitsch W, Granstrom M, et al. European Union Concerted Action on Risk Assessment in Lyme Borreliosis. *Wien Klin Wochenschr.* 1996;108(23):741–7.
127. Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, Birtles RJ, Bjoërsdorff A, Blanco JR, et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(12):1108–32.
128. Strle F, Cheng Y, Cimperman J, Maraspin V, Lotric-Furlan S, Nelson JA, et al. Persistence of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Resolved Erythema Migrans Lesions. *Clin Infect Dis.* 1995;21(2):380–9.
129. Banović P, Čapo I, Ogorelica D, Vranješ N, Simin V, Lalošević D. Mysterious path of *Borrelia spielmanii*: spreading without morphological alteration of collagen type I and IV. *Future Microbiol.* 2019;14:1469–75.
130. Stanek G. Lyme borreliosis, ticks and *Borrelia* species. *Wien Klin Wochenschr.* 2018;130(15–16):459–62.
131. Hansmann Y, Leyer C, Lefebvre N, Revest M, Rabaud C, Alfandari S, et al. Feedback on difficulties raised by the interpretation of serological tests for the diagnosis of Lyme disease. *Med Mal Infect.* 2014 May;44(5):199–205.

132. Fingerle V, Sing A. [Lyme Borreliosis: Serological and Microbiological Diagnostics and Differential Diagnosis]. *Dtsch Med Wochenschr* 1946. 2020 Jan;145(1):29–34.
133. Đaković-Rode O, Ružić-Sabljić E. Lyme borelioza - diferencijalno dijagnostičke poteškoće u interpretaciji seroloških rezultata = Lyme borreliosis - differential diagnostic difficulties in the interpretation of serological results. *Infektološki Glas*. 2002;(22):45–9.
134. Lantos PM, Branda JA, Boggan JC, Chudgar SM, Wilson EA, Ruffin F, et al. Poor Positive Predictive Value of Lyme Disease Serologic Testing in an Area of Low Disease Incidence. *Clin Infect Dis*. 2015 Nov 1;61(9):1374–80.
135. Lohr B, Fingerle V, Norris DE, Hunfeld KP. Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis: Current state of the art and future perspectives. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2018 May 19;55(4):219–45.
136. Cutler SJ, Rudenko N, Golovchenko M, Cramaro WJ, Kirpach J, Savic S, et al. Diagnosing Borreliosis. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2017 Jan;17(1):2–11.
137. ESCMID: ESGBOR [Internet]. [cited 2020 Feb 28]. Available from: https://www.escmid.org/research_projects/study_groups/lyme_borreliosis/
138. Dunaj J, Moniuszko A, Zajkowska J, Pancewicz S. The role of PCR in diagnostics of Lyme borreliosis. *Przegl Epidemiol*. 2013;67(1):35–9, 119–23.
139. CDC. Diagnosis and testing of Lyme disease | CDC [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2019 [cited 2020 Mar 7]. Available from: <https://www.cdc.gov/lyme/diagnostesting/index.html>

140. Recommendations | Lyme disease | Guidance | NICE [Internet]. NICE; [cited 2020 Feb 28]. Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng95/chapter/recommendations>
141. Gocko X, Lenormand C, Lemogne C, Bouiller K, Gehanno JF, Rabaud C, et al. Lyme borreliosis and other tick-borne diseases. Guidelines from the French scientific societies. *Médecine Mal Infect.* 2019 Aug;49(5):296–317.
142. IZJZS - Batut :: Izveštaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2013. godinu [Internet]. [cited 2020 Feb 28]. Available from: <http://www.batut.org.rs/index.php?content=1168>
143. Factsheet on Lyme borreliosis, for healthcare professionals [Internet]. European Centre for Disease Prevention and Control. 2015 [cited 2020 Feb 28]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/factsheet-lyme-borreliosis-healthcare-professionals>
144. Banović P, Díaz-Sánchez AA, Simin V, Foucault-Simonin A, Galon C, Wu-Chuang A, et al. Clinical Aspects and Detection of Emerging Rickettsial Pathogens: A “One Health” Approach Study in Serbia, 2020. *Front Microbiol* [Internet]. 2022 [cited 2022 Jan 30];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2021.797399>
145. Cruickshank M, O’Flynn N, Faust SN. Lyme disease: summary of NICE guidance. *BMJ.* 2018 Apr 12;361:k1261.
146. Banović P, Díaz-Sánchez AA, Galon C, Foucault-Simonin A, Simin V, Mijatović D, et al. A One Health approach to study the circulation of tick-borne pathogens: A preliminary study. *One Health.* 2021 Jun 1;100270.

147. Estrada-Peña A. Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region: A Guide to Identification of Species. University of Zaragoza; 2004. 131 p.
148. Cull B, Pietzsch ME, Gillingham EL, McGinley L, Medlock JM, Hansford KM. Seasonality and anatomical location of human tick bites in the United Kingdom. *Zoonoses Public Health*. 2020 Mar;67(2):112–21.
149. Nasirian H, Zahirnia A. Detailed Infestation Spectrums About Biological Stages of Hard Ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae) in Humans: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Acta Parasitol [Internet]*. 2021 Mar 20 [cited 2021 Mar 26]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00362-y>
150. De Keukeleire M, Robert A, Kabamba B, Dion E, Luyasu V, Vanwambeke SO. Individual and environmental factors associated with the seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in Belgian farmers and veterinarians. *Infect Ecol Epidemiol [Internet]*. 2016 Nov 15 [cited 2021 Jan 25];6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5112351/>
151. Jore S, Vanwambeke SO, Slunge D, Boman A, Krogfelt KA, Jepsen MT, et al. Spatial tick bite exposure and associated risk factors in Scandinavia. *Infect Ecol Epidemiol*. 2020 Jan 1;10(1):1764693.
152. Hofhuis A, Herremans T, Notermans DW, Sprong H, Fonville M, Giessen JWB van der, et al. A Prospective Study among Patients Presenting at the General Practitioner with a Tick Bite or Erythema Migrans in the Netherlands. *PLOS ONE*. 2013 May 16;8(5):e64361.

153. Wilhelmsson P, Fryland L, Lindblom P, Sjöwall J, Ahlm C, Berglund J, et al. A prospective study on the incidence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection after a tick bite in Sweden and on the Åland Islands, Finland (2008-2009). *Ticks Tick-Borne Dis.* 2016 Feb;7(1):71–9.
154. Maiwald M, Oehme R, March O, Petney TN, Kimmig P, Naser K, et al. Transmission risk of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from *Ixodes ricinus* ticks to humans in southwest Germany. *Epidemiol Infect.* 1998 Aug;121(1):103–8.
155. Huegli D, Moret J, Rais O, Moosmann Y, Erard P, Malinverni R, et al. Prospective study on the incidence of infection by *Borrelia burgdorferi* sensu lato after a tick bite in a highly endemic area of Switzerland. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2011 Sep;2(3):129–36.
156. Faulde MK, Rutenfranz M, Hepke J, Rogge M, Görner A, Keth A. Human tick infestation pattern, tick-bite rate, and associated *Borrelia burgdorferi* s.l. infection risk during occupational tick exposure at the Seedorf military training area, northwestern Germany. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2014 Sep;5(5):594–9.
157. Begović-Kuprešanin V, Milanović M, Mikić D, Popović S, Hristović D, Rajić-Dimitrijević R, et al. The influence of early antibiotic therapy on the clinical manifestations in patients with early Lyme disease. *Srp Arh Celok Lek.* 2018;146(9–10):516–23.
158. Enkelmann J, Böhmer M, Fingerle V, Siffczyk C, Werber D, Littmann M, et al. Incidence of notified Lyme borreliosis in Germany, 2013-2017. *Sci Rep.* 2018 08;8(1):14976.
159. Junttila J, Peltomaa M, Soini H, Marjamäki M, Viljanen MK. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* Ticks in Urban Recreational Areas of Helsinki. *J Clin Microbiol.* 1999 May;37(5):1361–5.

160. Christova I, Komitova R. Clinical and epidemiological features of Lyme borreliosis in Bulgaria. *Wien Klin Wochenschr.* 2004 Jan 31;116(1–2):42–6.
161. Korenberg EI. [Infections of the Lyme borreliosis group--ixodid tick-borne borrelioses in Russia]. *Med Parazitol (Mosk).* 1996 Sep;(3):14–8.
162. Banović P, Obregón D, Mijatović D, Simin V, Stankov S, Budakov-Obradović Z, et al. Tick-Borne Encephalitis Virus Seropositivity among Tick Infested Individuals in Serbia. *Pathogens.* 2021 Mar;10(3):301.
163. Gray JS, Dautel H, Estrada-Peña A, Kahl O, Lindgren E. Effects of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Diseases in Europe. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2009 Jan 4;2009:e593232.
164. Estrada-Peña A, Martinez JM, Acedo CS, Quilez J, Cacho ED. Phenology of the tick, *Ixodes ricinus*, in its southern distribution range (central Spain). *Med Vet Entomol.* 2004;18(4):387–97.
165. Tälleklint L, Jaenson TG. Infestation of mammals by *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) in south-central Sweden. *Exp Appl Acarol.* 1997 Dec;21(12):755–71.
166. Chrdle A, Chmelík V, Růžek D. Tick-borne encephalitis: What travelers should know when visiting an endemic country. *Hum Vaccines Immunother.* 2016 Oct 2;12(10):2694–9.
167. Rauter C, Hartung T. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Nov;71(11):7203–16.

168. Kirstein F, Rijpkema S, Molkenboer M, Gray JS. Local variations in the distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks. *Appl Environ Microbiol.* 1997 Mar;63(3):1102–6.
169. Gray JS, Robertson JN, Key S. Limited role of rodents as reservoirs of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Ireland. *Eur J Epidemiol.* 2000 Feb 1;16(2):101–3.
170. Cinco M, Padovan D, Murgia R, Poldini L, Frusteri L, van de Pol I, et al. Rate of infection of *Ixodes ricinus* ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* and group VS116 in an endemic focus of Lyme disease in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 1998 Feb;17(2):90–4.
171. Favia G, Cancrini G, Carfi A, Grazioli D, Lillini E, Iori A. Molecular identification of *Borrelia valaisiana* and HGE-like Ehrlichia in *Ixodes ricinus* ticks sampled in north-eastern Italy: first report in Veneto region. *Parassitologia.* 2001 Sep;43(3):143–6.
172. Sytykiewicz H, Karbowski G, Werszko J, Czerniewicz P, Sprawka I, Mitrus J. Molecular screening for *Bartonella henselae* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato co-existence within *Ixodes ricinus* populations in central and eastern parts of Poland. *Ann Agric Environ Med AAEM.* 2012;19(3):451–6.
173. Milutinović M, Masuzawa T, Tomanović S, Radulović Ž, Fukui T, Okamoto Y. *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis* and their co-infections in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks collected in Serbia. *Exp Appl Acarol.* 2008 Aug 1;45(3):171–83.

174. Milutinovic M, Radulovic Ž, Tomanovic S, Tomanovic Ž. Seasonal Distribution Of *Borrelia* in *Ixodes ricinus* Ticks In The Belgrade region, Serbia. *Arch Biol Sci.* 2006;58:183–6.
175. Audino T, Pautasso A, Bellavia V, Carta V, Ferrari A, Verna F, et al. Ticks infesting humans and associated pathogens: a cross-sectional study in a 3-year period (2017–2019) in northwest Italy. *Parasit Vectors* [Internet]. 2021 Mar 5 [cited 2021 Mar 26];14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7934501/>
176. Battisti E, Zanet S, Boraso F, Minniti D, Giacometti M, Duscher GG, et al. Survey on tick-borne pathogens in ticks removed from humans in Northwestern Italy. *Vet Parasitol Reg Stud Rep.* 2019 Dec;18:100352.
177. Hofhuis A, van de Kasstele J, Sprong H, van den Wijngaard CC, Harms MG, Fonville M, et al. Predicting the risk of Lyme borreliosis after a tick bite, using a structural equation model. *PLoS ONE* [Internet]. 2017 Jul 24 [cited 2021 Mar 24];12(7). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5524385/>
178. Waindok P, Schicht S, Fingerle V, Strube C. Lyme borreliae prevalence and genospecies distribution in ticks removed from humans. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2017 Aug;8(5):709–14.
179. Springer A, Raulf MK, Fingerle V, Strube C. *Borrelia* prevalence and species distribution in ticks removed from humans in Germany, 2013-2017. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2020 Mar;11(2):101363.
180. Špitalská E, Boldišová E, Štefanidesová K, Kocianová E, Majerčíková Z, Taragel'ová VR, et al. Pathogenic microorganisms in ticks removed from Slovakian residents over the years 2008-2018. *Ticks Tick-Borne Dis.* 2021 Mar;12(2):101626.

181. Mavin S, Hopkins PC, MacLennan A, Joss AWL, Ho-Yen DO. Urban and rural risks of Lyme disease in the Scottish Highlands. *Scott Med J*. 2009 May;54(2):24–6.
182. Oechslin CP, Heutschi D, Lenz N, Tischhauser W, Péter O, Rais O, et al. Prevalence of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks in urban and suburban areas of Switzerland. *Parasit Vectors*. 2017 Nov 9;10(1):558.
183. Trevethan R. Sensitivity, Specificity, and Predictive Values: Foundations, Pliabilities, and Pitfalls in Research and Practice. *Front Public Health* [Internet]. 2017 [cited 2021 Mar 27];5. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2017.00307/full>
184. Zeller H, ECDC. A systematic literature review on the diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis. 2016.
185. Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. *Lancet Lond Engl*. 2012 Feb 4;379(9814):461–73.
186. Caplash S, Gangaputra S, Kesav N, Akanda M, Vitale S, Kodati S, et al. Utility of routine Lyme screening in patients with Uveitis. *Ophthalmology*. 2019 Dec;126(12):1726–8.
187. Wormser GP. Documentation of a false positive Lyme disease serologic test in a patient with untreated *Babesia microti* infection carries implications for accurately determining the frequency of Lyme disease coinfections. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2021 Sep;101(1):115429.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Фактори ризика за инфицирање крпељима и оболевање од лајмске борелиозе у Јужнобачком округу и дијагностика у раној фази болести
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) ЗАРЗ Пастеров завод Нови Сад
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске академске студије – Клиничка истраживања
1. Опис података
<i>1.1 Врста студије</i> <i>Ретроспективна студија</i> <hr/> <i>–</i> <hr/> <i>–</i> <hr/> <i>–</i>
<i>1.2 Врсте података</i> <i>а) <u>квантитативни</u></i> <i>б) квалитативни</i>

1.3. Начин прикупљања података

а) анкете, упитници, тестови

б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи

в) генотипови: навести врсту _____

г) административни подаци: навести врсту _____

д) узорци ткива: навести врсту _____

ђ) снимци, фотографије: навести врсту _____

е) текст, навести врсту _____

ж) мапа, навести врсту _____

з) остало: описати _____

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

а) Excel фајл, датотека _____

б) SPSS фајл, датотека _____

с) PDF фајл, датотека _____

д) Текст фајл, датотека _____

е) JPG фајл, датотека _____

ф) Остало, датотека : Access база података амбуланте за Лајмску борелиозу и друге болести које преносе крпељи за године 2018. и 2019.

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли велики број варијабли

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) _____

1.3.3. Поновљена мерења

а) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) временски размак између поновљених мера је _____

б) варијабле које се више пута мере односе се на _____

в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, навести тип _____

б) корелационо истраживање, навести тип _____

ц) анализа текста, навести тип _____

д) остало, навести шта _____ Ретроспективна студија података сакупљених током рутинског рада

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

–

–

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да Не

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података? _____
- б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не
- в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

–

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података је контролисан применом статистичких тестова.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података у матрицу је изведена поређењем добијених података са литературним подацима.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у _____
репозиторијум.

3.1.2. URL адреса

3.1.3. DOI

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

—

—

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен?

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

—

—

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

—

—

—

—

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму?

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да Не

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање
Етичка комисија Медицинског факултета у Новом Саду одобрење 01-39/150/1 од 26.12.2019.

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- a) Подаци нису у отвореном приступу
- b) Подаци су анонимизирани
- ц) Остало, навести шта

–

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

–

–

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

–

–

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство – некомерцијално – без прераде.

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Павле Бановић, pavle.banovic@mf.uns.ac.rs

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Павле Бановић, pavle.banovic@mf.uns.ac.rs

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Павле Бановић, pavle.banovic@mf.uns.ac.rs