НАУЧНОМ ВЕЋУ МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА

УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На седници Научног већа Медицинског факултета у Београду одржаној 19. 03. 2015. године именована ја Комисија у саставу:

1. Проф. др Сања Митровић, Медицински факултет у Београду
2. Проф. др Мијомир Пелемиш, Медицински факултет у Београду
3. Проф. др Наташа Миладиновић Тасић, Медицински факултет у Нишу

за оцену завршене докторске дисертације под називом:
"ЗНАЧАЈ МОЛЕКУЛАРНЕ ДИЈАГНОСТИКЕ У ЕВАЛУАЦИЈИ КЛИНИЧКОГ ТОКА И ИСХОДА МАЛАРИЈЕ", кандидата дипл. вет. Зорице Дакић, мр сц. вет., запослене у Служби за микробиологију Клиничког центра Србије у Београду.

Ментор докторске дисертације је Проф. др Милорад Павловић, редовни професор у пензији, коментор је Др сц. мед. Олгица Ђурковић-Ђаковић, научни саветник.

Чланови Комисије су детаљно проучили приложену докторску дисертацију и подносе Научном већу Медицинског факултета у Београду следећи

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја докторске дисертације

Докторска дисертација "ЗНАЧАЈ МОЛЕКУЛАРНЕ ДИЈАГНОСТИКЕ У ЕВАЛУАЦИЈИ КЛИНИЧКОГ ТОКА И ИСХОДА МАЛАРИЈЕ" написана је на 140 страна и подељена на следећа поглавља: увод, циљеви рада, материјал и методе рада, резултати рада, дискусија, закључци и списак литературе. Докторска

дисертација садржи податке о комисији, сажетак на српском и енглеском језику, списак скраћеница и биографију кандидата.

У **Уводу** је дат основни приказ епидемиологије маларије у свету, животни циклус паразита рода *Plasmodium*, клиничке карактеристике маларије и свеобухватан приказ метода које се примењују за дијагностику маларије: микроскопија, брзи антигенски тестови, серологија и молекуларна дијагностика. У овом поглављу се налазе две слике.

Циљ рада је јасно дефинисан. Основни циљ рада јесте процена клиничког значаја квантитативног PCR-а у реалном времену (qPCR) у дијагностици маларије и клиничка употребљивост праћења ДНК-немије за процену ефекта антималаричне терапије.

У **Дизајну истраживања** направљен је план кохортне студије, која је обухватила све путнике који су се у дефинисаном периоду након повратка из подручја ендемских за маларију јавили на Клинику за инфективне и тропске болести (у даљем тексту: Клиника) ради искључивања ове инфекције, а код којих је дијагноза маларије потврђена или искључена упоредном применом метода конвенционалне и молекуларне дијагностике.

У **Материјалу и методама** су детаљно објашњене методе конвенционалне и молекуларне дијагностике маларије. Истраживањем су обухваћени сви повратници из маларичних подручја који су се јавили на Клинику, укључујући болеснике клинички суспектне на маларију, путнике са недавно леченом маларијом и здраве путнике упућене на Клинику ради превентивног испитивања на носилаштво *Plasmodium*-а. Конвенционална дијагностика је обухватала микроскопију а код дела испитаника и брзи тест, док је молекуларна дијагностика вршена применом квантитативног qPCR-а, и то qPCR-а на нивоу рода као скрининг теста а затим qPCR-а на нивоу врсте за детекцију врсте *Plasmodium*-а (специјес-специфични qPCR). Посебан осврт је дат на упоредно праћење трајања

паразитемије и ДНК-немије. Детаљно је дат и опис статистичке анализе резултата. У овом поглављу се налази пет табела и једна слика.

Поглавље **Резултати** обухвата детаљан приказ налаза добијених у истраживању. Резултати истраживања су изложени јасно, прегледно и систематично у 35 табела, седам графикона и једној слици.

Дискусија је написана на одговарајући начин, поткрепљена историјским и савременим наводима из литературе, односно резултатима сличних истраживања спроведених у водећим клиничким лабораторијама широм света референтним за дијагностику маларије као и истраживачким лабораторијама које уводе нове и надограђују претходне протоколе за дијагностику маларије.

У **Закључку** је дат резиме резултата у складу са дефинисаним циљевима. Поглавље **литература** садржи 200 цитираних референци.

Б. Кратак опис постигнутих резултата

У истраживање је укључено 109 испитаника који су боравили у маларичним подручјима, испитиваних на маларију између јула 2010. и маја 2013. године.

Код свих испитаника прво је рађена микроскопија а потом скрининг qPCR где је као циљни ген коришћен високо конзервирани регион 18S rRNK гена. Позитивни узорци су потом испитивани специјес-специфичним qPCR-ом за идентификацију четири врсте *Plasmodium*-а: *P. falciparum*, *P. vivax, P. ovale* и *P. malariae*.

Маларија је дијагностикована код 45 симптоматских болесника, од којих је код 42 микроскопски потврђена. Код остала три (6,7%) болесника, дијагноза је постављена индиректно, на основу адекватног терапијског одговора.

Узорци свих 109 испитаника подвргнути су испитивању скрининг qPCR-ом. Позитиван резултат добијен је код 51 испитаника, и то код свих са микроскопским налазом паразита, али и код два болесника са субмикроскопском

маларијом (СММ), четири болесника са недавно леченом маларијом и код три код којих је била могућа унакрсна контаминација.

Аналитичка осетљивост скрининг qPCR-а била је 0,04 паразита/μL (пар/μL), а специфичност 100%. За специјес-специфични qPCR, аналитичка осетљивост била је 6 пар/μL за *P. falciparum*, 0,30 пар/μL за *P. vivax*, 0,13 пар/μL за *P. ovale* и за *P. malariae* 0,09 пар/μL. Слагање између резултата микроскопије и специјес-специфичног qPCR-а у погледу идентификације врста било је 73,3%, а најбоље слагање од 90,6% показано је за *P. falciparum*. Половина неслагања потицала је од погрешно идентификоване врсте *Plasmodium*-а на микроскопском прегледу. Корелација квантификације паразита помоћу скрининг qPCR-а и микроскопије била је ниска (Пирсонов коефицијент корелације r=-0,442, *p*=0,009, r^2=0,195).

Анализа узастопних узорака појединачних пацијената показала је да се у току лечења маларије ДНК-немија (одређивана скрининг qPCR-ом) одржавала значајно дуже (средње време трајања 7,9 дана) него микроскопска паразитемија (2,2 дана) (*P*<0,001).

Резултати овог истраживања су показали да qPCR може бити веома драгоцена метода у дијагностици маларије, посебно за детекцију случајева са ниском паразитемијом, за прецизну квантификацију паразитемије, као и за поуздано одређивање врста *Plasmodium*-а.

Успостављање аутохтоне *P. vivax* маларије у Грчкој (Danis и сар. 2011) обавезује на појачан надзор над импортованом маларијом у нашој средини. Примена qPCR-а је допринела и реалнијем сагледавању вулнерабилности, важног елемента за процену малариогеног потенцијала. Иако се наше подручје због ранијег присуства вектора маларије (Дакић и сар. 2008) сматра рецептивним, због присуства ретких носилаца гаметоцита током летњих месеци, при чему ниједан носилац гаметоцита у летњем периоду није био носилац гаметоцита *P. vivax*-а за који су европске врсте анофеличних комараца погодни вектори, вулнерабилност је ниска. У циљу спречавања успостављања аутохтоне трансмисије маларије, скрининг qPCR може бити користан за скрининг повратника из тропских и субтропских подручја.

В. Упоредна анализа са резултатима из литературе

Због недостатка стандардизованих PCR протокола за дијагностику маларије, тешко је проценити и упоредити квалитет рада објављених студија и применити унакрсну анализу (Alemayehu и сар. 2013). Код моноплекс qPCR протокола, праг осетљивости иде од око 0,002 до 30 пар/μL док је осетљивост мултиплекс протокола од 0,2 до 5 пар/μL (10, Berry и сар. 2008; Kamau и сар. 2013; Perandin и сар. 2004; Veron и сар. 2009). Разлике у осетљивости у наведеним студијама последица су бројних елемената од различитих техничких детаља до искуства у молекуларној дијагностици (Alemayehu и сар. 2013; Henning и сар. 1999). У овој дисертацији осетљивост скрининг qPCR-а износила је 0,04 пар/μL, док је осетљивост за специјес-специфични qPCR била је од 0,09 пар/μL за *P. malariae* до 6 пар/μL за *P. falciparum*.

Код 42 од 45 болесника маларија је микроскопски потврђена. У три (6,7%) случаја СММ, код болесника који су самоиницијативно започели терапију антималарицима, накнадно је специјес-специфичним qPCR-ом потврђен *P. falciparum*. Код 41 болесника микроскопски је одмах одређена врста плазмодијума, сем код једног болесника са изузетно ретким паразитима где је врста и то *P. malariae* одређена након трећег узорковања. Ово је веома добар резултат с обзиром на то да су нпр Pasricha и сар. (2013) у пет лабораторија у Мелбурну забележили девет (3,5%) случајева маларије дијагностиковане након негативног првог узорка. Cnops и сар. (2011) у Белгији поређењем микроскопије и qPCR-а забележили су већу успешност qPCR-а за 8,3% у дијагностици маларије а код 1,3% болесника који су били под терапијом и код којих су уочени морфолошки измењени паразити врста је идентификована qPCR-ом. Завршну дијагнозу *P. falciparum* инфекције имало је 71,1% болесника укључујући и троје без микроскопске потврде. *P. falciparum* је најзаступљенија импортована врста плазмодијума и у земљама у окружењу (Shkurti и сар. 2013; Мулић, 2012) и у земљама западне Европе (Cnops и сар. 2011; Paglia и сар. 2012; Roberts и сар. 2013) и северне Америке (Shokoples и сар. 2013).

Код 45 болесника са маларијом, слагање микроскопије и специјес-специфичног qPCR-а забележено је код 73,3% болесника. Од 12 случајева непоклапања, шест (13,3%) су последица нетачне микроскопске идентификације врсте плазмодијума. Осталих шест случајева непоклапања обухватају три случаја маларије детектована микроскопски али не и специјес-специфичним qPCR-ом и три (6,7%) случаја СММ. СММ је уобичајена појава у ендемским подручјима и јавља се у 13 - 33% свих случајева маларије (Golassa и сар. 2013; Ramirez-Olivencia и сар. 2012, Shekalaghe и сар. 2007) што је условљено имунизованошћу, док је у овој дисертацији то била последица самоницијативно започете терапије антималарицима пре дијагностике.

Студија Berry-а и сар. (2008) показала је да је преко 17% микроскопски идентификованих врста кориговано након примене PCR-а а да ниво грешке код идентификације не-*falciparum* врста варира од 20 - 50%. Dormond и сар. (2011) нашли су подударање резултата микроскопије и мултиплекс PCR-а у 89% анализираних случајева маларије. Истраживања слична протоколу примењеном у дисертацији показала су усклађеност између микроскопије и qPCR-а од 86% (Perandin и сар. 2004) односно 71% (Rougemont и сар. 2004). Најуспешнију детекцију врсте *P. falciparum* забележили су и Edson и сар. (2010) у САД са 11,2% грешака. Најбоље слагање у овој дисертацији постигнуто је за *P. falciparum* 90,6%.

Досадашња испитивања показала су дуже трајање ДНК-немије него микроскопске паразитемије (Brown и сар. 1992; Myjak и сар. 2002; Paglia и сар. 2012) што се поклапа са резултатима дисертације. Дуго одржавање ДНК-немије умањује њен клинички значај за праћење терапијског ефеката јер није могуће разлучити да ли је детектована ДНК пореклом од вијабилних или невијабилних различитих стадијума паразита и посебно гаметоцита.

Није детектована ниједна мешана инфекција. Генерално, у неендемским подручјима молекуларним методама детектује се за 5% до12% више мешаних инфекција него микроскопијом (Mixson-Hayden и сар. 2010; Mueller и сар. 2007). Иако је код 11 болесника конвенционалним PCR-ом у Шведској потврђено одсуство мешаних инфекција не може се искључити могућност да је због

компетиције (Bialasiewicz и сар. 2007) и молекуларном методом пропуштена евентуално мање заступљена врста *Plasmodium*-а.

Г. Објављени резултати који чине део тезе

Рад објављен у часопису индексираном у SCI/CC бази:

1. **Dakić Z**, Ivović V, Pavlović M, Lavadinović L, Marković M, Djurković-Djaković O (2014) Clinical significance of molecular methods in the diagnosis of imported malaria in returning travelers in Serbia. *International Journal of Infectious Diseases*, 29: 24-30. DOI: 10.1016/j.ijid.2014.08.013 (IF 2,330, категорија М22).

Д. Закључак (образложење научног доприноса)

Докторска дисертација "ЗНАЧАЈ МОЛЕКУЛАРНЕ ДИЈАГНОСТИКЕ У ЕВАЛУАЦИЈИ КЛИНИЧКОГ ТОКА И ИСХОДА МАЛАРИЈЕ" кандидата мр сц. вет. Зорице Дакић представља оригиналан научни рад заснован на личном лабораторијском раду на увођењу молекуларне дијагностике маларије и поређењу са сопственим искуством у конвенционалној дијагностици маларије. Тема је изузетно актуелна и чини јединствен прилог научном приступу овом медицинском проблему. Циљеви истраживања су јасно постављени а методологија прегледно и детаљно описана. Резултати су прецизно приказани и праћени одговарајућом анализом из које су произашли логички исправно изведени закључци.

С обзиром на то да су истраживањем показане предности молекуларне дијагостике маларије, пре свега за прецизно одређивање врсте *Plasmodium*-а, ово истраживање поред академског има и практични лабораторијски значај, са амбицијом да се уведе у протокол рутинске лабораторијске дијагностике импортоване маларије у Србији.

Комисија даје позитивну оцену докторској дисертацији, уз нагласак да се ради о потпуно оригиналном истраживању у чијој је жижи молекуларно

испитивање односно дијагностика маларије, чији резултати у свему излазе из оквира рутинских дијагностичких процедура и стандардне статистичке обраде, и тиме ова дисертација без сумње представља вредан допринос на светском нивоу овој стално актуелној медицинској проблематици.

Узевши у обзир напред наведено, Комисија предлаже Научном већу Медицинског факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену предложене докторске дисертације мр сц. вет. Зорице Дакић и одобри њену јавну одбрану ради стицања титуле доктора медицинских наука.

Београд, 21. 04. 2015. године

Ментор

_____

Проф. др Милорад Павловић

Чланови Комисије:

_____

Проф. др Сања Митровић

_____

Коментор

Проф. др Мијомир Пелемиш

_____

Др сц. мед. Олгица Ђурковић-Ђаковић,
Научни саветник

_____

Проф. др Наташа Миладиновић Тасић