

NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 07.03.2016.godine, broj 5940/3, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije kandidata dr Tijane Štajner, pod nazivom, „**Klini ki zna aj molekularne dijagnostike toksoplazmoze kod visokorizi nih bolesnika**”. Mentor za izradu doktorske disertacije je dr sc. med. Olgica urkovi - akovi , nau ni savetnik.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Sanja Mitrovi , redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Dragana Vuji , vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr Olivera Konti -Vu ini , vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
4. Prof. dr Gordana Mati , redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu
5. Prof. dr Suzana Otaševi , redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu

Nakon detaljnog pregleda priložene dokumentacije, konsultacija sa mentorom i kandidatkinjom, a prema kriterijumima za ocenu doktorske disertacije, lanovi Komisije Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu jednoglasno podnose slede i

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija „**Klini ki zna aj molekularne dijagnostike toksoplazmoze kod visokorizi nih bolesnika**” podeljena je uosam poglavlja:uvod (29 strana), ciljrada (dve strane), materijal i metode (27 strana), rezultati (46 strana), diskusija (24 strane), zaklju ci (4 strane), spisak koriš ene literature (19 strana) i prilozi (dve strane). Disertacija uklju uje ukupno 15 slika, 58 tabela, 21 grafikon, kao i 198citata iz nau nih asopisa. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata i podatke o komisiji.

U po etnom delu **UVODA** prikazan je istorijat najvažnijih otkrića u pogledu morfoloških i funkcionalnih karakteristika *Toxoplasma gondii* uključujući i klasifikaciju ovog parazita, kao i patogenezu i kliničke manifestacije toksoplazmoze. Dat je i osvrt na najznačajnije datume u kliničkoj dijagnostici toksoplazmoze. Značajan deo uvoda posvećen je opisu pojmova neophodnih za razumevanje značaja toksoplazmoze u humanoj patologiji – životnih oblika i životnog ciklusa *T. gondii*, epidemioloških pokazatelja toksoplazmoze i puteva zaražavanja ljudi. Posebna pažnja posvećena je značaju, patofiziološkim osobenostima i potencijalnim posledicama toksoplazmoze u visokorizičnim kategorijama populacije - kongenitalnoj (KT) i toksoplazmozi kao komplikaciji transplantacije organa, odnosno maternih celija hematopoeze (eng. *Haematopoietic Stem Cell Transplantation* – HSCT). Naglašeno je da je toksoplazmoza u visokorizičnim kategorijama skopana sa ozbiljnim kliničkim posledicama koje se u slučaju pravovremene laboratorijske dijagnoze mogu prevenirati ili otkloniti primenom specifične terapije. Finalni deo uvoda prikazuje metode laboratorijske dijagnostike toksoplazmoze koje su danas u širokoj upotrebi. Naglašeno je da, iako su indirektni metodi tj. metode serološke dijagnostike neuporedivo rasprostranjenije, tek direktne parazitološke metode omogućavaju, izolacijom vijabilnih parazita ili detekcijom parazitske DNK, definitivnu potvrdu dijagnoze toksoplazmoze. Istaknut je sve veći značaj molekularne detekcije *T. gondii* u telesnim tkivima, koju odlikuju visoka osjetljivost, reproducibilnost i kratko vreme izvođenja.

CILJ RADA je jasno definisan i obuhvata evaluaciju kliničkog značaja molekularne dijagnostike kongenitalne (KT) i reaktivirane toksoplazmoze nakon transplantacije maternih celija hematopoeze (HSCT). Zadaci postavljeni u svrhu realizacije zadatog cilja odnose se na uvođenje i optimizaciju qPCR protokola u cilju rane dijagnoze KT i reaktivirane toksoplazmoze nakon HSCT i evaluaciju rezultata dobijenih primenom qPCR u odnosu na rezultate dobijene konvencionalnim dijagnostičkim metodama. Posebni zadaci usmereni su na redefinisavanje dijagnostičkog algoritma za KT u Srbiji i dizajniranje dijagnostičkog algoritma za toksoplazmozu kod transplantovanih bolesnika u Srbiji, u skladu sa dobijenim rezultatima.

U poglavlju **MATERIJAL I METODE** precizno su opisani koraci u prikupljanju materijala za analizu kao i sve metode korišćene u različitim segmentima istraživanja u skladu sa postavljenim ciljem. Navedeno je da je materijal prikupljen i ispitan u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za toksoplazmozu (NRLT) u periodu od 2008-2014. godine.

U cilju evaluacije metoda za dijagnostiku kongenitalne toksoplazmoze, ovim istraživanjem obuhvaćeni su uzorci periferne krvi 80 trudnica, 60 uzoraka plodove vode (PV), 5 uzoraka fetalne krvi (FK), uzorci periferne krvi 55 novorođenadi (NK) kao i uzorci periferne krvi 16

porodilja. Rizik od posttransplantacione reaktivacije toksoplazmoze procenjivan je pretransplantacionim serološkim ispitivanjem 25 potencijalnih primalaca i 18 davalaca HSC dok je posttransplantaciona dijagnostika toksoplazmoze izvršena kod 18 primalaca. U sklopu istraživanja predstavljen je i algoritam za dijagnostiku i KT_i reaktivirane toksoplazmoze. Detaljno su opisani primenjeni serološki testovi za dijagnostiku infekcije *T. gondii*. Od kvantitativnih, primenjeni su testovi za detekciju IgG antitela specifičnih za *T. gondii* i visoko osetljivi test direktne aglutinacije (HSDA), enzimski imunotest za određivanje IgG antitela specifičnih za *T. gondii* u humanom serumu ili plazmi, VIDAS® Toxo IgG II (TXG), kao i enzimski imunotest za određivanje aviditeta IgG antitela specifičnih za *T. gondii* u humanom serumu ili plazmi, VIDAS® Toxo IgG avidity (TXGA). Od testova za detekciju IgM antitela specifičnih za *T. gondii* primenjeni su imunosorbentni aglutinacioni test za određivanje specifičnih IgM antitela (IgM-ISAgA) i enzimski imunotest za određivanje IgM antitela specifičnih za *T. gondii* u humanom serumu ili plazmi, VIDAS® Toxo IgM (TXM). Za detekciju IgA antitela specifičnih za *T. gondii* korišćen je imunosorbentni aglutinacioni test za određivanje specifičnih IgA antitela (IgA-ISAgA). Svi komercijalni kvantitativni testovi bili su proizvoda *bioMérieux, Charbonnières-les-Bains*, Francuska. Od kvalitativnih seroloških testova u dijagnostici KT korišćen je komercijalni *Western blot* (WB) test (*LD-Bio Diagnostics*, Lion, Francuska) koji omogućava komparativnu analizu IgG i IgM imunoloških profila majke i novorođeneta. Biološki ogled, koji predstavlja konvencionalnu metodu direktne parazitološke dijagnostike, postavljan je iz materijala prikupljenog u cilju prenatalne i rane postnatalne dijagnostike KT (PV, FK, NK). Detekcija parazitske DNK, kao savremena metoda direktne dijagnostike, obuhvatala je inicijalnu izolaciju (ekstrakciju) DNK iz ispitivanog materijala i sledstvenu detekciju i kvantifikaciju DNK *T. gondii* korišćenjem *real-time* PCR (qPCR) tehnike. Molekularna dijagnostika toksoplazmoze sprovedena u ovom istraživanju zasnovana je na detekciji i umnožavanju dela sekvence (amplikona) nekodirajućeg fragmenta u okviru 529 bp repetitivnog elementa koji se u genomu *T. gondii* ponavlja 200-300 puta (*GenBank accession number AF146527*). Uspostavljanje protokola za molekularnu dijagnostiku toksoplazmoze kod visokorizivnih bolesnika obuhvatilo je odabir *forward* (f) (HO1) i *reverse* (r) (HO2) prajmera tj. odgovarajućih oligonukleotidnih sekvencija specifično vezivanje za komplementarne sekvence u okviru amplikona predstavlja preduslov za uspešno umnožavanje željenog regiona dužine 81 bp u okviru 529 bp repetitivnog elementa, kao i visokospecifične *TaqMan* probe (HOFT). Optimizacija qPCR protokola obuhvatila je određivanje optimalne koncentracije prajmera i probe, kao i *annealing* (eng.) temperature (temperature vezivanja prajmera za komplementarne sekvence u

okviru amplikona). Ključni korak u procesu standardizacije qPCR protokola za dijagnostiku toksoplazmoze sastojao se u utvrđivanju pragova i raspona detekcije genetskog materijala parazita kako bi se omogućila kvantifikacija *T. gondii* u ml ispitivanog materijala. U tu svrhu konstruirana je standardna kriva, čiji su nagibi linearne krive od -2,927, i odsečak na Y osi od 37,73, pokazatelj visokog stepena efikasnosti reakcije (99,7%).

Statistička obrada podataka je obavljena u SPSS programu verzija 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, SAD). Dijagnostičke metode su međusobno poređene pomoću standardnih mera slaganja između testova, i to pomoću tablica kontingencije 2 x 2 na zbirnom nivou. Granicom statističke značajnosti smatrana je verovatnoća od 5% ($P < 0,05$). Kao standardne mere slaganja testova izračunavani su osetljivost, specifičnost, pozitivna i negativna prediktivna vrednost (PPV i NPV), kao i realno statističko slaganje rezultata (*kappa* statistika).

U poglavlju **REZULTATI** su u zasebnim odeljcima sistematično i detaljno predstavljene rezultati istraživanja koji se odnose na dijagnostiku KT reaktivirane toksoplazmoze. Dobijeni rezultati prikazani su na 21 grafikonu, 58 tabeli i 15 slika.

U poglavlju **DISKUSIJA** kandidatkinja je sveobuhvatno i jasno i detaljno povezala rezultate svog istraživanja sa rezultatima sličnih istraživanja objavljenih u međunarodnim naučnim časopisima. Rezultati istraživanja o kojima ne postoje dostupni podaci u naučnoj literaturi, objašnjeni su na odgovarajući način. Na osnovu svih ovih razmatranja, kandidatkinja je izvela svoje zaključke i izložila smernice za dalji rad.

U poglavlju **ZAKLJUČCI** navedeni su najvažniji nalazi proiztekli iz rezultata rada a u skladu sa postavljenim ciljem istraživanja.

U poglavlju **LITERATURA** navedeno je 198 bibliografskih jedinica, uključujući i publikacije kandidata.

B. Kratak opis postignutih rezultata

Jedan od najvažnijih rezultata ovog istraživanja predstavlja uspešna optimizacija qPCR protokola za dijagnostiku toksoplazmoze kod visokorizikih bolesnika. Osetljivost metode u granicama detekcije 1 parazita na ml biološkog materijala verifikovana je rezultatima u ešajama NRLT u međunarodnom programu kontrole kvaliteta molekularne dijagnostike (QCMD). Optimizovanim qPCR protokolom dijagnoza KT postavljena je prenatalno u 85% slučajeva. Molekularna dijagnostika pokazala se uspešnijom od konvencionalne u ispitivanju uzoraka plodove vode sa niskom koncentracijom parazita. Pomoću qPCR uspešno je postavljena dijagnoza KT ploda u 87,5% dokazane i 40% slučajeva suspektne perikonceptualne infekcije majke. Plodova voda je i rezultatima ovog istraživanja potvrđena kao optimalan materijal za

molekularnu dijagnostiku a pokazano je i da terapija spiramicinom ne uti e na efikasnost molekularne dijagnostike u prenatalnom periodu. Molekularna dijagnostika u ranom postnatalnom periodu doprinela je potvrdi KT u 71,4% ispitivane novoro enadi. Uspešnost detekcije bila je nešto niža u odnosu na prenatalnu dijagnostiku ali su koncentracije parazita u NK bile čak niže od onih u ispitivanim uzorcima PV. Dobijena osetljivost qPCR od 80%, uz 100% specifi nost i PPV potvrdilisu nadmo molekularne u odnosu na konvencionalnu direktnu dijagnostiku KT (osetljivost biološkog ogleada od 41,7%). Visoka NPV (91,1%), je važna karakteristika qPCR protokola primenjenog u ovom istraživanju za razliku od biološkog ogleada (NPV od 57,6%). Mada je u najve em broju slu ajeva biološki oglead doprineo potvrdi dijagnoze postavljene pomo u qPCR, u 11,8% prenatalno (u 50% materijal je bila fetalna krv) i 12,5% postnatalno (neonatalna krv) dijagnostikovanih KT biološki oglead bio je pozitivan uprkos negativnom nalazu molekularne dijagnostike. Ovi rezultati pokazuju da je, ukoliko se kao materijal za dijagnostiku KT koristi krv (FK ili NK), potrebno primeniti i biološki oglead.

Dokazivanje specifi nih IgA antitela u plodovoj vodi pokazalo se korisnim u cilju detekcije fetalnog imunskog odgovora na infekciju, posebno u slu ajevima infekcijemajke u perikonceptualnom periodu. S druge strane, detekcija IgM antitela pokazala se nedovoljno osetljivom. Tako e, mada su specifi na IgA antitela (za razliku od specifi nih IgM) ispitivana kod svega 2/3 novoro enadi suspektne na KT, detektovana su kod 56,25% inficiranih (osetljivost 56,3%, specifi nost 80,0%), dok su specifi na IgM antitela na ena kod 37,5% (osetljivost 37,5%, specifi nost 97,4%). Komparativna WB analiza uporednih IgG/IgM profila majke i novoro eneta, kao i sukcesivnih neonatalnih uzoraka u odnosu na uzorak seruma na ro enju, pokazala se uspešnijom od kvantitativnih seroloških metoda u dijagnostici KT na ro enju, odnosno u prva tri meseca života. WB se pokazao jednako uspešnim u potvrdi prenatalne (9,1%) kao i postnatalne dijagnoze KT (9,1%), ali je korist od WB testa bila posebno evidentna u slu aju nedektabilnih specifi nih IgM i IgA antitela. Rezultati statisti ke analize su pokazali da je osetljivost WB testa od 64,3% viša od osetljivosti IgM- ali i IgA- ISAgA testa, dok je specifi nost jednaka onoj kod direktnih dijagnosti kih metoda (100%).

Kod ve ine trudnica ispitivanih u ovom istraživanju u cilju procene rizika po plod, vreme infekcije je odre eno na perikonceptualni period (70%). Perikonceptualna infekcija majke rezultirala je KT ploda u gotovo tre inislu ajeva (29%).

Serološkim ispitivanjem trudnica otkrivena su odstupanja u uobi ajenoj dinamici specifi nih antitela kod više od etvrtine slu ajeva (27%). Najuestalija je bila pojava rezidualnih specifi nih IgM antitela (14,3%) i, u manjoj meri, usporenog sazrevanja aviditeta specifi nih

IgG antitela (6,3%). Detektovane neobičnosti, u kontekstu podatka da je većina trudnica zbog odsustva organizovanog skrininga u Srbiji upućena na inicijalno ispitivanje u NRLT u podmakloj trudnoći (61,25% u II i 16,25% u III trimestru), potenciraju važnost primene preciznih kriterijuma za određivanje vremena infekcije u odnosu na zaražavanje. Takvi kriterijumi, na osnovu kojih se procenjuje potreba za prenatalnom dijagnostikom KT u konkretnom slučaju, precizno su predstavljeni u ovom radu.

Značajni rezultati proistekli su i iz dela istraživanja u kojem je procenjivan doprinos molekularne detekcije *T. gondii* u sklopu dijagnostike reaktivacije latentne infekcije. Reaktivacija toksoplazmoze je detektovana kod ukupno 17,6% seropozitivnih primalaca HSC (ta nije kod 20% seropozitivnih bolesnika podvrgnutih alogenoj HSCT, od kojih je kod 33,3% urađena HSCT od identičnog/podudarnog srodnog davaoca). Rezultati su potvrdili da je seronegativni status davaoca bio doprinosi faktor u nastanku reaktivacije u svim dijagnostikovanim slučajevima. Ispitivanje serološkog statusa infekcije *T. gondii* potencijalnih davalaca i primalaca HSC u pretransplantacionom periodu omogućilo je procenu rizika od posttransplantacione reaktivacije toksoplazmoze. S druge strane, ispitivanje dinamike specifičnih IgM, IgA i IgG antitela kod primalaca nakon transplantacije nije doprinelo dijagnostici reaktivacije.

Primena molekularne dijagnostike pokazala se superiornom u ranoj detekciji reaktivacije toksoplazmoze, posebno u slučaju malog broja parazita u krvi (6 parazita na ml krvi u jednom slučaju). Pokazana je i korelacija broja parazita u ispitivanom biološkom materijalu sa težinom kliničkih simptoma reaktivacije. Primena optimizovanog qPCR protokola u ovom delu istraživanja omogućila je i praćenje terapijskog efekta. Povoljan efekat (ilustrovan smanjenjem broja ili išezavanjem parazita u uzorku periferne krvi) primećen je kod svih bolesnika sa reaktivacijom nekoliko dana po započinjanju antitoksoplazmatske terapije.

C. Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Evaluacija kliničkog značaja molekularne dijagnostike KT i reaktivirane toksoplazmoze izvršena je na reprezentativnom uzorku koji je obuhvatio sve visokorizikne bolesnike ispitane u NRLT tokom poslednjih šest godina.

Kod sumnje na primoinfekciju trudnice, prioritet je utvrđivanje potencijalnog rizika za nastanak infekcije fetusa. Ovo se postiže primenom seroloških testova pomoću kojih se utvrdi status infekcije trudnice, koji se potom vremenski odredi u odnosu na vreme zaražavanja. Da ovo, međutim, nije uvek lako pokazuje i podatak da je u ovom istraživanju 27% serološki praćenih trudnica ispoljilo neobičajan obrazac dinamike specifičnih antitela. Prolongirana

detekcijanisko-avidnih specifi nih IgG antitela zabeležena je kod 6,3% trudnica, što je niže nego u istraživanju Bobi a i sar. u kome je usporeno sazrevanje aviditeta registrovano u 15,4% pacijenata (Bobi i sar., 2009). Rezidualna specifi na IgM antitela detektovana su kod 14,3% trudnica, što odgovara rezultatimaGras i sar. koji su ih detektovali kod 9-27% (u zavisnosti od osetljivosti koriš enog testa) (Gras i sar., 2004).

Kada je re o datiranju infekcije u odnosu na za e e,u ovom radu je vreme infekcije kod ak 70% ispitivanih trudnica procenjeno na perikonceptualni period. KT je potvr ena kao ishod u 10 slu ajeva dokazane i u osam slu ajeva suspektne perikonceptualne infekcije majke (ukupno u 29%). Kandidat isti e da su ovi nalaziu suprotnosti sa uverenjem da je vertikalna transmisija kod infekcija u prvim nedeljama trudno e veoma retka (Desmonts i Couvreur, 1984; Hohlfeld i sar., 1994; Dunn i sar., 1999) i podse a namogu nostodložene migracije parazita iz posteljice na plod, nedeljama i mesecima nakon infekcije majke (Hezard i sar., 1997; Villena i sar., 2003), fenomena koji je pre više decenija prepoznat kao „prenatalni inkubacioni period“ (Thalhammer i sar., 1955; Thalhammer i sar., 1975).

Kombinovanom primenom metoda konvencionalne i molekularne dijagnostike, prenatalna dijagnoza KT postavljena je u ovom istraživanjuu 26% slu ajeva. Kandidat isti e da je uspešnost detekcije genetskog materijala parazita u ak 85% prenatalno dijagnostikovanih slu ajeva KT rezultat sadejstva više inilaca. Prvo, navodi da sama primena *real-time* PCR tehnologije predstavlja napredak u odnosu na konvencionalni PCR, posebno u uzorcima sa nižom koncentracijom ciljne DNK, što je u saglasnosti podacima iz literature (Costa i sar., 2000). Drugo, isti e da je unapre enju molekularne identifikacije uzro nika toksoplazmoze doprinela i promena PCR targeta, jer su brojne studije pokazale prednosti detekcije 529 bp repetitivnog elementa nad ranije koriš enimB1 genom (Homan i sar., 2000; Bastien i sar., 2007; Sterkers i sar., 2010). Me utim, kandidat sesaglašavai sa autorima koji isti u da se ne sme zanemariti doprinos biološkog ogleđa prenatalnoj dijagnostici KT iz amnionske te nosti (Robert-Gangneux i sar., 1999), odnosno na ro enju iz umbilikalne ili periferne neonatalne krvi (Bessieres i sar., 2001; Naessens i sar., 1999; Živkovi i sar., 2011), posebno u slu ajevima kada je PCR negativan zbog prisustva inhibitora *Taq* polimeraze.

Brojni autori naglašavaju da je primena qPCR u cilju dijagnoze KT kod novoro eni adi posebno važna kod infekcija majki u III trimestru, kada se, zbog mogu eg rizika od prevremenog poro aja, retko pristupa amniocentezi (Robert-Gangneux i sar., 1999; Bessieres i sar., 2001; Wallon i sar., 2010), kao i u zemljama u kojima se serološki skrining trudnica i prenatalna dijagnostika KT ne sprovode rutinski (Sterkers i sar., 2011).S tim u vezi, kandidat isti e zna ajmolekularne detekcije*T. gondii* i u neonatalnoj krvi. Iako se pokazalamanje

uspešnomne u plodovoj vodi (71,4% u odnosu na 85%), primena qPCR omoguila je potvrdu dijagnoze KT kod dva novorođeneta kod kojih je biološki ogled bio negativan.

Disocijacijau detekciji specifičnih IgM i IgA antitela zapažena u ovom istraživanju potvrđuje nalaze ranijih studija u kojima je u cilju dijagnostike KT korišćena FK (Bessieres i sar., 1992), odnosno NK (Bessieres i sar., 2001), i koje su pokazale isto prisustvo specifičnih IgA antitela u uzorcima fetalnih ali i neonatalnih seruma u slučaju infekcije majki u prvoj polovini trudnoće. ISAgA test je u istraživanju kandidata ispoljio nižu osetljivost (37,5% za IgM i 56,3% za detekciju specifičnih IgA antitela) u odnosu na slične studije sprovedene u francuskim referentnim centrima –75,2% u istraživanju Wallon i sar., 73% u studiji Bessieres i sar., i 80% kod Robert-Gangneux i sar. (Wallon i sar., 2010; Bessieres i sar., 2009; Robert-Gangneux i sar., 1999). Bessieres i sar. međutim dokazuju da se specifična IgM i IgA antitela najčešće detektuju kod novorođenadi koje su majke inficirane u III trimestru trudnoće, što dovode u vezu sa kratkotrajnom i prolaznom sintezom fetalnih IgM odnosno IgA i njihovim izostavljanjem pre rođenja kada se infekcija majke dogodi u ranoj trudnoći (Bessieres i sar., 2009). S obzirom na karakteristike ispitivane populacije u istraživanju kandidata, u kome je postnatalnom dijagnostikom obuhvaćena novorođenad 37 žena od kojih je 73% inficirano u perikonceptualnom periodu a svega 2,7% u III trimestru, kao i novorođenad 16 porodilja od kojih je samo 18,7% inficirano u III trimestru, kandidat zaključuje da odsustvo detekcije pre svega specifičnog IgM imunskog odgovora novorođenadi nije iznenađujuće.

Kandidatkinja navodi da su njeni rezultati saglasni sa istraživanjima koja ukazuju na poseban značaj komparativne *Western blot* (WB) analize seroloških IgG i IgM profila majke i novorođeneta za dijagnozu intrauterusne infekcije u odsustvu detektibilnih specifičnih IgM i IgA u serumu novorođeneta čak i osetljivim ISAgA testom (Remington i sar., 1985; Remington i sar., 2004). Osetljivost WB testa primenjenog u ovom istraživanju određena je na 64,3%, specifičnost i PPV na 100% a NPV na 83,9%. Ovi rezultati saglasni su sa podacima studije Tissot-Dupont i sar. koji su takođe pokazali višu osetljivost i specifičnost WB analize u odnosu na IgM-ISAgA test primenjen u neonatalnom periodu (osetljivost od 86,9% naspram 69,6% i specifičnost od 96,1% naspram 92,2%) (Tissot Dupont i sar., 2003).

Druga kategorija visokoriziknih bolesnika kod kojih je u ovom radu ispitivan značaj primene molekularne dijagnostike toksoplazmoze obuhvata primaoce matičelija hematopoeze. Dijagnoza reaktivacije latentne toksoplazmoze nakon HSCT postavljena je u ovom istraživanju primenom qPCR kod 17,6% seropozitivnih primalaca. Ova učestalost reaktivacije slična je onoj zabeleženoj u multicentričnoj prospektivnoj studiji tokom koje je reaktivacija detektovana molekularnim metodama u 16% od ukupno 106 seropozitivnih primalaca, dok je

diseminovana forma bolesti registrovana kod 38% reaktiviranih bolesnika (Martino i sar., 2005). Diseminacija infekcije sa kliničkim manifestacijama plućne toksoplazmoze 14 dana posle HSCT sa fulminantnim tokom zabeležena je kod jednog od tri bolesnika kod kojih je došlo do reaktivacije. Kandidat smatra ovaj nalaz interesantnim, jer se po podacima iz literature simptomi kliničke manifestne reaktivacije najčešće zapažaju u prvih 2-4 meseca nakon transplantacije (Derouin i sar., 2008), u proseku tokom prvih 64 dana (Martino i sar., 2000), dok se u manje od 10% slučajeva ispoljavaju u prvih mesec dana (Derouin i sar., 2008). Rezultati kandidata su u skladu sa nalazima drugih autora po kojima, ukoliko se plućna toksoplazmoza razvije unutar 30 dana od HSCT, u odsustvu brze dijagnostike (i sledstvene terapije) postoji velika opasnost od diseminacije i fatalnog ishoda (Chandrasekar i sar., 1997; Mulanovich i sar., 2011). U ovom istraživanju, u sva tri slučaja detektovane reaktivacije nakon alogene HSCT u pitanju je bilo neslaganje u serološkom statusu recipijenta (seropozitivan) i donora (seronegativan) (serološki R+/D- *mismatch* (eng.)). Ovo odgovara i literaturnim podacima, koji pokazuju da je u čak 80% zabeleženih slučajeva reaktivacije toksoplazmoze posle HSCT u pitanju bio serološki *mismatch* (Derouin i sar., 1992; Martino i sar., 2005).

Mada je serološki skrining značajan za pretransplantacionu procenu rizika reaktivacije, korist od serološkog ispitivanja u posttransplantacionom periodu je, zbog supresije humoralnog odgovora tokom primene immunosupresivne terapije, upitna i uglavnom skromna. Prema podacima iz literature, pravovremena primena PCR tehnike omogućava detekciju i veoma malog broja parazita u krvi, kada je šansa za uspeh specifične terapije najveća (Bretagne i sar., 2000; Martino i sar., 2005; Meers i sar., 2010). Ova je direktno potvrđeno u istraživanju kandidata kod pacijenata sa asimptomatskom reaktivacijom infekcije, na osnovu detekcije svega 6 parazita na ml krvi i potpunim odsustvom *T. gondii* u tri sukcesivna uzorka periferne krvi kod jednog od tri bolesnika, kao i na osnovu rastele parazitemije do primene specifične terapije kod drugog bolesnika. S druge strane, broj parazita detektovan u krvi i BAL-u trećeg bolesnika kod kojeg se reaktivacija manifestovala progresivnom toksoplazmozom pluća bio je daleko viši od parazitemije dokumentovane u drugim sličnim studijama (Martino i sar., 2005; Patrat-Delon i sar., 2010). Kandidat nalazi da je visoka koncentracija parazita u telesnim tečnostima korelirala sa težinom kliničkih manifestacija u trenutku dijagnoze, dok je značajno smanjenje broja parazita u sukcesivnom uzorku krvi (nakon devet dana) reflektovalo efekat primene specifične terapije (trimetoprim-sulfametoksazol i klindamicin), kako je opisano i u literaturi (Martino i sar., 2005; Patrat-Delon i sar., 2010). Kandidat sledstveno zaključuje da primena qPCR omogućava i detekciju niskih koncentracija i kvantifikaciju parazitske DNK u

krvi i telesnim testovima, što ima ne samo prognostički značaj već predstavlja i vrlo efikasan vid monitoringa efekta specifične terapije.

U literaturi je istaknuto da se zbog mogućeg negativnog uticaja na prihvatanje kalemata kao i zbog potencijalne mijelotoksičnosti, profilaksa kod HSCT neretko odlaže do dokaza o uspostavljanju loze neutrofila i trombocita (Chandrasekar i sar., 1997; Meers i sar., 2010), što je praksa i u transplantacionom centru u kojem su ležali bolesnici obuhvaćeni ovim istraživanjem. Prema podacima iz literature, u najvećem broju slučajeva prihvatanje kalemata se odvija u prvih 30 dana posle HSCT, a toksoplazmoza se u preko 90% slučajeva reaktivira po isteku ovog perioda (Derouin i sar., 2008). Međutim, kandidat zaključuje da odluka o odlaganju profilakse do prihvatanja kalemata zahteva nedeljnu praćenje uzoraka periferne krvi primarnim qPCR analizom može se omogućiti, u slučaju detekcije DNK parazita, pravovremena primena specifične terapije kojom se, prema podacima iz literature, u 80% slučajeva prevenira fatalni ishod izazvan toksoplazmozom (Bretagne i sar., 2000; Martino i sar., 2005; Meers i sar., 2010).

D. Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. **Živković T**, Ivović V, Vujanović M, Klun I, Bobić B, Nikolić A, Djurković -Djaković O (2011): Adverse fetal outcome in the absence of timely prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Wien Klin Wochenschr* 123: 43-46. (*Medicine, General & Internal* 95/155, IF = 0,809)

2. **Štajner T**, Vasiljević Z, Vujić D, Marković M, Ristić G, Milić D, Pašić S, Ivović V, Ajzenberg D, Djurković -Djaković O (2013): Atypical strain of *Toxoplasma gondii* causing fatal reactivation after haematopoietic stem cell transplantation in a patient with an underlying immunological deficiency. *J Clin Microbiol* 51, 8: 2686-2690. (*Microbiology* 23/119, IF = 4,232)

3. **Štajner T**, Bobić B, Klun I, Nikolić A, Srbljanović J, Uzelac A, Rajnpreht I, Djurković -Djaković O (2016): Prenatal and early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis in a setting with no systematic screening in pregnancy. *Medicine* 95(9):e2979. (*Medicine, General & Internal* 15/154, IF = 5,723)

E. Zaključak (obrazloženje naučnih doprinosa disertacije)

Doktorska disertacija pod nazivom „**Klinički značaj molekularne dijagnostike toksoplazmoze kod visokorizičnih bolesnika**” dr. Tijane Štajner predstavlja značajan originalni naučni doprinos razumevanju uloge molekularnih metoda u savremenoj i

sveobuhvatnoj dijagnostici toksoplazmoze a posebno zna aja pravovremene primene molekularne dijagnostike u prevenciji klini kih posledica toksoplazmoze kod fetusa, odnosno novoro en adi i bolesnika koji se le e transplantacijom mati nih elija hematopoeze. Svi segmenti ove doktorske disertacije odli no su uskla eni sa postavljenim ciljevima istraživanja, koji su precizno definisani i aktuelni iz aspekta savremenih pravaca razvoja medicinske nauke.

Ovo istraživanje rezultiralo je zna ajnim inovativnim nau nim saznanjima. Naime, u ovom radu prikazani suprvi rezultati organizovane primene savremenih molekularnih metoda u postoje em algoritmu dijagnostike KT u Srbiji koji se do uvo enja i optimizacije qPCR metode bazirao na metodama konvencionalne dijagnostike. Osim što je više nego ijedna dosadašnja metoda doprinela brznoj i preciznoj dijagnozi infekcije *T. gondii* i pre ro enja deteta, primena qPCR u dijagnostici KT rezultirala je pravovremenim le enjem u slu aju pozitivnog nalaza a smanjenjem broja nepotrebno le enih trudnica odnosno novoro en adi u slu aju negativnog qPCR nalaza. Tako e, ovo istraživanje predstavlja i prvu organizovanu primenu qPCR u cilju dijagnostike reaktivacije latentne toksoplazmoze nakon HSCT kao i pra enja efekta specifi ne terapije reaktivirane toksoplazmoze u Srbiji. Rezultati koji nedvosmisleno pokazuju daredovnopra enje primalaca HSC pomo u qPCR metode doprinosi kako sniženju stope reaktivacije infekcije *T. gondii* (omogu avanjem pravovremene primene profilakse, shodno qPCR nalazu) tako i pra enjuefekta primene specifi ne terapije (jasnim pokazivanjem sniženja parazitemije), predstavljaju smernicu za pravovremeno otkrivanje ove oportunisti ke infekcije koja može da ugrozi život, a time i doprinos unapre enju zdravstvene zaštite bolesnika nakon uspešnih transplantacija mati nih elija hematopoeze.

F. Predlog Komisije za ocenu završene doktorske disertacije

Doktorska disertacija pod nazivom „**Klini ki zna aj molekularne dijagnostike toksoplazmoze kod visokorizi nih bolesnika**” kandidatadr Tijane Štajner, po svom sadržaju i formi, razložnom uvodnom delu, precizno formulisanim i aktuelnim ciljevima istraživanja, savremenoj metodologiji, sistemati no prikazanim rezultatima, smislenoj i nau nim injenicama potkrepljenoj diskusiji, kao i jezgrovitim i konkretnim zaklju cima ispunjava sve kriterijume odli no napisanog nau nog rada.

Stoga, Komisija sa zadovoljstvom predlaže Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju pod naslovom „**Klini ki zna aj molekularne dijagnostike toksoplazmoze kod visokorizi nih bolesnika**” kandidatadr

Tijane Štajner, i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 30.03.2016.

Mentor:

Dr sc. med. Olgica Turkovi - akovi , nau ni savetnik

lanovi Komisije:

Prof. dr Sanja Mitrovi , redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Dragana Vuji , vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Olivera Konti -Vu ini , vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Gordana Mati , redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Suzana Otaševi , redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu
