

УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ

ФАКУЛТЕТ: МЕДИЦИНСКИ

**ИЗВЈЕШТАЈ***о оцјени урађене докторске дисертације***I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ**

На основу члана 141. Закона о високом образовању („Службени гласник“ Републике Српске број: 67/20), члана 54. Статута Универзитета у Бањој Луци и члана 18. Статута Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци, Наставно-научно вијеће Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци на VI редовној електронској сједници одржаној 12.04.2022.године донијело је одлуку број 18/3.301/2022. о именовану Комисије за оцјену урађене докторске дисертације мр Татјане Рогановић, доктора медицине, под називом „Значај *ELISA*, *IMMUNOBLOT* теста, хемокина *CXCL13* и *REAL-TIME PCR* у дијагностици лајмске неуроборелиозе“ у саставу:

1. Др Верхаз Антонија, ванредни професор, ужа научна област Инфектологија, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци, председник;
2. Др Милош Кораћ, ванредни професор, ужа научна област Инфектологија, Медицински факултет Универзитета у Београду, члан;
3. Др Јања Бојанић, редовни професор, ужа научна област Епидемиологија, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци, члан;
4. Др Маја Травар, ванредни професор, ужа научна област Медицинска и клиничка микробиологија, Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци, резервни члан.

II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

Татјана (Саво) Рогановић

Рођена 14.10.1974.године, у Бањој Луци, Република Српска, Босна и Херцеговина.

Завршила је послједипломски магистарски студиј на Медицинском факултету Универзитета у Бањој Луци, студијски програм: „Биомедицинска истраживања“.

Магистарски рад под називом: „Карактеристике менингитиса изазваног вирусом мумпса у току епидемије у Републици Српској“ одбранила је на Медицинском факултету Универзитета у Бањој Луци дана 07.11.2014. године и стекла научни степен магистра медицинских наука.

III УВОДНИ ДИО ОЦЈЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Наслов докторске дисертације мр Татјане Рогановић је „Значај *ELISA*, *IMMUNOBLOT* теста, хемокина *CXCL13* и *REAL-TIME PCR* у дијагностици лајмске неуроборелиозе“.

Тема докторске дисертације је прихваћена од стране Наставно-научног вијећа Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци Одлуком број 18/3.197/2019, донесеном дана 07.03.2019.године, а Сенат Универзитета у Бањој Луци је Одлуком број 02/04-3.649-63/19, донесеном дана 28.03.2019.године дао сагласност на Извјештај о оцјени подобности теме, кандидата и ментора за израду докторске дисертације на Медицинском факултету Универзитета у Бањој Луци кандидата мр Татјане Рогановић под називом „Значај *ELISA*, *IMMUNOBLOT* теста, хемокина *CXCL13* и *REAL-TIME PCR* у дијагностици лајмске неуроборелиозе“.

Докторска дисертација кандидата мр Татјане Рогановић је написана ћириличним писмом *Times New Roman* величине фонта 12, са проредом 1,5 на 82 стране формата А4. На почетку дисертације се налази 8 страна које нису нумерисане, а односе се на насловну страну докторске дисертације на српском и енглеском језику, резиме на српском и енглеском језику, попис скраћеница и садржај. Иза докторске дисертације су 4 стране, и то:

- Биографија кандидата;
- потписана Изјава о ауторству;

- потписана Изјава којом се овлашћује Универзитет у Бањој Луци да се докторска дисертација учини јавно доступном;
- потписана Изјава о идентичности штампане и електронске верзије докторске дисертације.

Дисертација садржи 35 слика и 9 табела, а цитирано је 88 литературних извода.

Урађена докторска дисертација је подијељена у 8 поглавља, и то:

1. Увод, написан на 19 страна;
2. Радна хипотеза, написана на 1 страни;
3. Циљ истраживања, написани на 1 страни;
4. Испитаници и методе рада, написано на 11 страна;
5. Резултати, написани на 23 стране;
6. Дискусија, написана на 16 страна;
7. Закључци, написани на 2 стране;
8. Литература, написана на 9 страна.

IV УВОД И ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

У уводном дијелу дисертације су описане основне карактеристике лајмске болести-њена етиологија, епидемиологија, патогенеза и клиничке карактеристике које се манифестују кроз три стадијума-рана локализована, рана дисеминована и касна дисеминована инфекција, са посебним освртом на лајмску неуроборелиозу, односно њене ране и касне неуролошке манифестације.

Посебна пажња је посвећена опису и значају појединих тестова у дијагностици лајмске неуроборелиозе - *ELISA (enzyme-linked immunoassay)* и *IMMUNOBLOT* тест те хемокин *CXCL13* и *REAL-TIME PCR* (реакција ланчаног умножавања у реалном времену - *Real-time Polymerase chain reaction*) које се рутински не користе и које су по први пут спроведени у Републици Српској.

У другом поглављу постављене су радне хипотезе истраживања:

1. Изостанак плеоцитозе у цереброспиналној течности није параметар који искључује лајмску неуроборелиозу.
2. Иако веома значајна, двостепена серолошка дијагностика (*ELISA, Immunoblot*) није увијек поуздана у дефинитивној дијагнози лајмске неуроборелиозе.

3. Хемокин *CXCL13* у цереброспиналној течности је значајан маркер ране лајмске неуроборелиозе који такође треба тумачити са опрезом и у корелацији са другим методама у дијагностици лајмске неуроборелиозе.

4. Цереброспинална течност је добар биолошки материјал за детекцију *Borrelia burgdorferi Real-time PCR* методом у току ране дисеминоване инфекције, док је у току касне перзистентне инфекције осјетљивост ове методе значајно мања.

Циљеви истраживања су јасно и прецизно формулисани:

1. Утврдити карактеристике у клиничкој слици и стандардним хематолошким (комплетна крвна слика - еритроцити, хемоглобин, хематокрит, тромбоцити, леукоцити са формулом: неутрофили, еозинофили, базофили, моноцити, лимфоцити) и биохемијским параметрима крви (гликемија, аспартат аминотрансфераза, аланин аминотрансфераза, С-реактивни протеин) као и параметрима цитохемијске анализе цереброспиналне течности (број ћелија уз однос моноклеара и полиморфонуклеара, протеинорахија, гликорахија) код испитаника са сумњом на лајмску неуроборелиозу.

2. Анализирати резултате тестова двостепене серолошке дијагностике лајмске борелиозе (*ELISA anti-Borrelia IgM* и *IgG* и потврдног *Immunoblot anti-Borrelia* теста *IgM* и *IgG*) код испитаника са сумњом на лајмску неуроборелиозу.

3. Одредити *ELISA* концентрацију хемокина *CXCL13* у цереброспиналној течности код испитаника са сумњом на лајмску неуроборелиозу и његов значај у дијагностици лајмске неуроборелиозе.

4. Испитати осјетљивост *Real-time* реакције ланчаног умножавања (*Polymerase chain reaction-PCR*) у цереброспиналној течности код испитаника са сумњом на лајмску неуроборелиозу и њен значај у дијагностици лајмске неуроборелиозе.

Кратак преглед претходних истраживања и литературе

Осим *erythema migrans*, који се обично дијагностикује клинички, друге манифестације лајмске борелиозе се обично дијагностикују препознавањем карактеристичних клиничких знакова и симптома болести заједно са серолошким тестирањем^[1,2,3].

Све европске или америчке смјернице засноване на доказима препоручују двостепену серолошку дијагностику лајмске борелиозе која се врши детекцијом антитијела иницијално користећи скрининг тест (*ELISA*) и уколико је он позитиван или неодређен ради се потврди *Immunoblot* тест^[2,4,5,6,7,8,9].

У случају ране лајмске борелиозе, борелија специфична *IgM* антителија се *ELISA* тестом могу детектовати од треће седмице, а *IgG* антителија од шесте седмице и тада се сматра да је серолошки тест сензитиван и специфичан више од 90%^[2,5,6]. Интерпретација серолошких тестова (*IgM* и *IgG*) може бити компликована^[10]. Главни проблем серолошке дијагностике лајмске борелиозе је неопостојање златног стандарда и немогућност поуздане корелације између резултата серолошких тестова и клиничког стања пацијента^[8]. Изостанак детекције антителија у великој мјери искључује лајмску борелиозу код пацијената са очуваним имунитетом и продуженом болести^[5]. Сама серопозитивност није довољна да се постави дијагноза лајмске борелиозе^[2]. Детекција *IgM* и/или *IgG* антителија сама за себе није потврда болести изазване борелијом^[5].

Immunoblot тест се у Америци тумачи према критеријумима Центара за контролу и превенцију болести (*Centers for Disease Control and Prevention - CDC*) и захтијева најмање двије од три значајне траке за позитиван *IgM*, и 5 од 10 значајних трака за позитиван *IgG*^[1,4]. Међутим, ови критеријуми се не могу користити у Европи, јер ниједан скуп интерпретативних критеријума не даје резултате високе сензитивности и специфичности у свим земљама, због присуства различитих генотипова борелије. У мултицентричној студији за развој критеријума за Европу, свака лабораторија је идентификовала осам трака за употребу у дијагнози, али ниједан сет критеријума није могао да се формулише^[1]. Двостепена серолошка дијагностика није осјетљива за рану лајмску борелиозу, тако да негативан резултат не искључује инфекцију са борелијом. Осјетљивост се повећава са развојем дисеминоване инфекције. Док је већина пацијената са *erythema migrans* серонегативна, већина пацијената са неуроборелиозом би требало да буде серопозитивна^[4].

Borrelia burgdorferi има велики број антигена који се, у зависности од стадијума, могу детектовати са различитим степеном сензитивности и који понекад имају различите нивое специфичности. Познавање ових протеина је важно када се интерпретирају резултати серолошких тестова (рани имуни одговор, првенствено *IgM*: флагеларни протеин (*Flagellin*, *p41*), *OspC* (повезан са спољном мембраном), *VlsE* и касни имуни одговор, првенствено *IgG*: *p83/100*, *p58*, *p43*, *p39*, *p30*, *p21*, *DbpA* (*Osp17*), *p14*, *VlsE* те неспецифични антигени: *Flagellin*, *Heat shock proteins* (*Hsps*)^[5].

Хемокин *CXCL13* је први пут описан од стране Леглера (*Legler*) и сарадника 1998. године. Код људи се углавном ствара од стране дендритичких ћелија, моноцита, зрелих

макрофага. Након везивања за *G*-протеин рецептора *CXCR5* на неутрофилима и маст ћелијама, *CXCL13* утиче на хемотаксу и миграцију Б лимфоцита од лимфоидног ткива до мјеста инфламације^[11]. *CXCL13* се ослобађа од стране моноцита централног нервног система као одговор на борелија спољашњи површински протеин, стимулишући регрутовање Б ћелија у централни нервни систем^[12]. Б ћелије су извор продукције антитијела и могу мигрирати у централни нервни систем и прије него се покрене продукција интратекалних антитијела^[13]. Од 2005.године различите студије су сугерисале да је детекција *CXCL13* у ЦСТ користан маркер у дијагностици ране лајмске неуроборелиозе, чак и прије специфичног одговора антитијела, иако се повишене вриједности *CXCL13* у ЦСТ налазе и код пацијената са другим бактеријским и вирусним инфекцијама централног нервног система, аутоимуним болестима и малигнитетима везаним за бијеле крвне ћелије^[4,5,12,14,15,16,17,18,19,20]. Одређивање *CXCL13* се не ради рутински и тек треба да буде стандардизовано^[5,21].

Детекција ДНК борелије *PCR* дијагностиком се не ради рутински^[21]. У изузетним случајевима (имунокомпромитовани пацијенти) инфекција борелијом може бити поткријепљена откривањем патогена у цереброспиналној течности. За акутну лајмску неуроборелиозу сензитивност детекције патогена у цереброспиналној течности културом или *PCR* тестом је само 10–30%^[5,6,22]. Очекује се да детекција патогена има већу сензитивност када је краће трајање болести него у пролонгираним случајевима^[5,22]. Детекција патогена у крви се не препоручује јер је још мање сензитивна. Резултат *PCR* теста се мора тумачити у складу са симптомима и резултатима серологије. Позитиван резултат *PCR* теста за пацијенте са пролонгираном болести и негативном серологијом је веома вјероватно лажно позитиван^[5]. Директна детекција *Borrelia burgdorferi sensu lato* ДНК *PCR* методом је кориснија у дијагностици лајмске борелиозе из узорак кожних промјена и синовијалне течности^[2,22]. Позитиван *PCR* резултат за борелију не утврђује активну инфекцију^[2], ДНК борелије може да опстане након убијања спирохета^[11]. Тест је бесмислен код пацијената који имају неуролошке манифестације дуже од шест недеља (слаба осетљивост)^[2].

За ране дисеминоване манифестације са неуролошким симптомима у року од шест недеља након убода крпеља (рана лајмска неуроборелиоза) серолошки тест крви може бити негативан и дијагноза треба да се заснива на резултатима анализе ЦСТ^[2]. У ЦСТ лимфоцитна плеоцитоза, поремећај крвно-мождане баријере и интратекална синтеза

имуноглобулина се може очекивати код сваке лајмске неуробореиозе. Могући изузеци су веома рани стадијум болести или дистална симетрична полинеуропатија^[5,6].

Литература:

1. Steere AC, Strle F, Wormser GP. Lyme borreliosis. Nat Rev Dis Primers. 2016;2:16090.
2. Jaulhac B, Saunier A, Caumes E, Bouillier K, Gehanno JF, Rabaud C, et al. Lyme borreliosis and other tick-borne diseases. Guidelines from the French scientific societies (II). Biological diagnosis, treatment, persistent symptoms after documented or suspected Lyme borreliosis. Med Mal Infect. 2019;49(5):335-346.
3. Lager M, Dessau RB, Wilhelmsson P, Nyman D, Jensen GF, Matussek A, et al. Serological diagnostics of Lyme borreliosis: comparison of assays in twelve clinical laboratories in Northern Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019;38(10):1933-1945.
4. Garcia-Monco JC, Benach JL. Lyme Neuroborreliosis: Clinical Outcomes, Controversy, Pathogenesis, and Polymicrobial Infections. Ann Neurol. 2019; 85(1):21-31.
5. Rauer S, Kastenbauer S, Hofmann H, Fingerle V, Huppertz HI, Hunfeld KP, et al. Guidelines for diagnosis and treatment in neurology - Lyme neuroborreliosis. Ger Med Sci. 2020;18:Doc03.
6. Rauer S, Kastenbauer S, Fingerle V, Hunfeld KS, Huppertz HI, Dersch R, et al. Lyme Neuroborreliosis. Clinical Practice Guideline. Dtsch Arztebl Int. 2018;115(45):751-756.
7. Roos K. Neurologic Complications of Lyme Disease. Neuroinfectious Diseases 2021; 27(4):1040-1050.
8. Kodym P, Kurzová Z, Berenová D, Pícha D, Smíšková D, Moravcová L, et al. Serological Diagnostics of Lyme Borreliosis: Comparison of Universal and Borrelia Species-Specific Tests Based on Whole-Cell and Recombinant Antigens. J Clin Microbiol. 2018; 56(11): e00601-18.
9. Gorkom T, Kremer K, Voet W, Notermans DW, Vlaminckx BJM, Sankatsing SUC, et al. Disagreement between the results from three commercial tests for the detection of Borrelia-specific serum antibodies in the Netherlands associated with antibiotic treatment for Lyme borreliosis: a retrospective study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2017; 36(11):2137-2146.
10. Hillerdal H, Henningson AJ. Serodiagnosis of Lyme borreliosis-is IgM in serum more harmful than helpful? Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2021;40(6):1161-1168.
11. Gudowska-Sawczuk M, Mroczko B. Chemokine Ligand 13 (CXCL13) in Neuroborreliosis and Neurosyphilis as Selected Spirochetal Neurological Diseases: A Review

of Its Diagnostic Significance. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(8): 2927.

12. Pöyhönen H, Lähdesmäki T, Hytönen J, Peltola V. Cerebrospinal Fluid Pleocytosis and Elevated C-X-C Motif Chemokine Ligand 13 Value Predict Lyme Borreliosis in Children With Facial Palsy. *Pediatr Infect Dis J.* 2019;38(12):1195-1198.

13. Henningsson AJ, Lager M, Brännström R, Tjernberg I, Skogman BH. The chemokine CXCL13 in cerebrospinal fluid in children with Lyme neuroborreliosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018; 37(10): 1983–1991.

14. Gorkom T, Arkel GHJ, Heron M, Volet W, Thijsen STF, Kremer K. The Usefulness of Two CXCL13 Assays on Cerebrospinal Fluid for the Diagnosis of Lyme Neuroborreliosis: a Retrospective Study in a Routine Clinical Setting. *J Clin Microbiol.* 2021;59(9):e00255-21.

15. Haglund S, Lager M, Gyllemark P, Andersson G, Ekelund O, Sundqvist M, et al. CXCL13 in laboratory diagnosis of Lyme neuroborreliosis-the performance of the recomBead and ReaScan CXCL13 assays in human cerebrospinal fluid samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2022;41:175 –179.

16. Ziegler K, Rath A, Schoerner C, Meyer R, Bertsch T, Erbguth F, et al. Comparative Analysis of the Euroimmun CXCL13 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and the ReaScan Lateral Flow Immunoassay for Diagnosis of Lyme Neuroborreliosis. *J Clin Microbiol.* 2020;58(9):e00207-20.

17. Skogman BH, Lager M, Brudin L, Jenmalm MC, Tjernberg I, Henningsson AJ. Cytokines and chemokines in cerebrospinal fluid in relation to diagnosis, clinical presentation and recovery in children being evaluated for Lyme neuroborreliosis. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020;11(3):101390.

18. Eckman EA, Pacheco-Quinto J, Herdt AR, Halperin JJ. Neuroimmunomodulators in Neuroborreliosis and Lyme Encephalopathy. *Clin Infect Dis.* 2018;67(1):80-88.

19. Rupprecht TA, Manz KM, Fingerle V, Lechner C, Klein M, Pfirrmann M, et al. Diagnostic value of cerebrospinal fluid CXCL13 for acute Lyme neuroborreliosis. A systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(12):1234-1240.

20. Gyllemark P, Forsberg P, Ernerudh J, Henningsson AJ. Intrathecal Th17- and B cell-associated cytokine and chemokine responses in relation to clinical outcome in Lyme neuroborreliosis: a large retrospective study. *J Neuroinflammation.* 2017;14(1):27.

21. Theel ES, Aguero-Rosenfeld ME, Pritt B, Adem PV, Wormser GP. Limitations and Confusing Aspects of Diagnostic Testing for Neurologic Lyme Disease in the United States. *J Clin Microbiol.* 2019;57(1):e01406-18.

22. Barstad B, Quarsten H, Tveitnes D, Noraas S, Ask IS, Saeed M, et al. Direct Molecular

Detection and Genotyping of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Cerebrospinal Fluid of Children with Lyme Neuroborreliosis. Clin Microbiol. 2018;56(5):e01868-17.

V МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

Испитаници и методе рада кориштене у овом истраживању су усклађени са постављеним циљевима рада и описани су на 11 страна. Примијењене методе рада су адекватне и савремене.

Спроведено испитивање је урађено као проспективна студија у Универзитетском клиничком центру Републике Српске. Етички одбор Универзитетског клиничког центра Републике Српске је дао сагласност за истраживање.

Истраживање је проведено на начин како је наведено у плану рада који је дат приликом пријаве докторске тезе:

1. Одабрани су пацијенти који испуњавају критеријуме за укључивање у студију.
2. Урађени су потребни тестови: *ELISA* тест на *Borrelia burgdorferi* *IgM* и *IgG* у серуму и цереброспиналној течности, потврдни *IMMUNOBLOT* тест у серуму, хемокин *CXCL13* и *REAL-TIME PCR* у цереброспиналној течности испитаника.
3. Анализирани су анамнестички подаци, неуролошки и остали симптоми које је испитаник наводио приликом пријема у болницу, дужина трајања наведених симптома до пријема у болницу, коморбидитети, претходна терапија антибиотцима за лајмску борелиозу, клинички одговор на антибиотску терапију у току хоспитализације, резултати стандарних и биохемијских параметара крви и цитохемијске анализе цереброспиналне течности код испитаника те резултати потребних дијагностичких тестова (стандардни: *ELISA anti-Borrelia IgM* и *IgG* у серуму и цереброспиналној течности, потврдни *Immunoblot* тест *anti-Borrelia IgM* и *IgG* у серуму као и додатни: одређивање концентрације хемокина *CXCL13* и *Real-time PCR* у цереброспиналној течности).
4. Статистички су обрађени подаци.

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

У истраживање су укључени пацијенти са присуством неуролошких симптома који би могли одговарати клиничкој слици лајмске неуроборелиозе, којима је урађена лумбална пункција и цитохемијска анализа цереброспиналне течности (укупан број ћелија уз однос мононуклеара и полиморфонуклеара, протеинорахија, гликорахија), као и потребни дијагностички тестови (стандардни: *ELISA anti-Borrelia IgM* и *IgG* у серуму и цереброспиналној течности, потврдни *Immunoblot* тест *anti-Borrelia IgM* и *IgG* у серуму као и додатни: одређивање концентрације хемокина *CXCL13* и *Real-time PCR* у цереброспиналној течности), и за које је била доступна комплетна остала медицинска документација: анамнестички подаци, урађени стандардни хематолошки и биохемијски параметри крви.

Из истраживања су искључени пацијенти који су примјењивали антибиотску терапију за лајмску борелиозу прије лумбалне пункције, код којих је изостао повољан клинички одговор на примијењену антибиотску терапију за лајмску неуроборелиозу у току хоспитализације, код којих јепостављена дијагноза другог неуролошког обољења, и они пацијенти који су се повукли из истраживања.

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

Стандардни хематолошки и биохемијски параметри крви као и параметри цитохемијске анализе цереброспиналне течности су урађени у Заводу за клиничку лабораторијску дијагностику УКЦ РС.

Тестови двостепене серолошке дијагностике лајмске борелиозе у серуму (*ELISA anti-Borrelia IgM* и *IgG* и потврдни *Immunoblot* тест *anti-Borrelia IgM* и *IgG*), *ELISA anti Borrelia IgM* и *IgG* у цереброспиналној течности као и одређивање концентрација

хемокина *CXCL13* у цереброспиналној течности су урађени у Заводу за микробиологију УКЦ РС.

Реакција ланчаног умножавања у реалном времену (*PCR*) у цереброспиналној течности је урађена у Ветеринарском институту Републике Српске „др Васо Бутозан“.

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

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

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

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

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

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

- *Anti-Borrelia ELISA gM* и *Anti-Borrelia VlsE ELISA IgG* у серуму и *ELISA Anti-Borelia IgM* и *IgG* у цереброспиналној течности (*EUROIMMUN Analyzer I-2*,

EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostik AG Lubeck, Germany). Резултати су интерпретирани према препорукама произвођача да се концентрација *IgM* и *IgG* антитијела у серуму (уз истовремено одређивање у цереброспиналној течности) изнад 5 RU/ml (релативних јединица по милилитру) сматра позитивном, а концентрација испод 5 RU/ml негативном.

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

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

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

Молекуларне анализе су урађене у Ветеринарском институту Републике Српске „др Васо Бутозан“ и обухватиле су: изолацију ДНК из цереброспиналне течности испитаника и *RT PCR* детекцију ДНК *Borrelia burgdorferi sensu lato (B. afzelii, B. garinii, B. burgdorferi sensu stricto)*. Изолација ДНК из биолошког материјала је урађена у ламинарној комори. Добијени ДНК филтрат је употребљен за *RT PCR* исти дан након изолације нуклеинске киселине. Детекција и квантитација *Borrelia burgdorferi* у узорцима ликвора *RT PCR* методом је урађена тестом *RealBest DNA Borrelia burgdorferi s.l., AO Vector-Best, Новосибирск, Русија* који је дизајниран за детекцију *Borrelia burgdorferi sensu lato complex (B. afzelii, B. garinii, B. burgdorferi sensu stricto)*. Према упутству произвођача теста, позитиван налаз *Borrelia burgdorferi* је присутан уколико је *Ct* вриједност кроз канал *ROX Ct* ≤40, а за интерну контролу тест је био тумачен као позитиван уколико је *Ct* вриједност кроз канал *FAM* била већа или једнака од 40. Амплификација у реалном времену, анализа резултата и одређивање праговог циклуса су изведени помоћу *Mx3005P* програма на апарату *Stratagene Mx3005P*

(*Agilent Technologies*).

Статистичка обрада прикупљених података је била адекватна, савремена и тачна, омогућила је да се дође до резултата на основу којих су донесени конкретни закључци у складу са постављеном хипотезом и циљевима истраживања. Подаци су представљени стандардним дескриптивним статистичким мјерама у складу са типом података. Анализа и поређење испитиваних група су урађени у складу са типом података. Фреквенције су поређене одговарајућим хи-квадрат тестом. Корелација резултата је утврђена коефицијентом корелације по Спирману. Повезаност резултата установљена је Дајсовим коефицијентом сличности, на основу којег је сачињен и дендрограм. Статистичка значајност испитиваних разлика је установљена за $p < 0.05$. Статистичка анализа и графичко представљање података урађену уз помоћ статистичког софтверског пакета *SPSS 22 (IBM, 2013)*.

VI РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА

Резултати дисертације су приказани на 23 стране и анализирани су кроз дискусију која је написана јасно и прегледно на 16 страна, уз приказ података других истраживања.

Од испитиваних пацијената њих 34 (66.67%) је било женског пола, а њих 17 (33.33%) мушког пола што представља статистички значајно ($p=0.017$) већи удио испитаника женског пола у односу на испитанике мушког пола. Највише испитаника је било старости између 50 и 60 година, млађи испитаници су знатно мање заступљени, и само један у категорији до 20 година. Највише су заступљени пензионери, којих је било 16. Затим по заступљености занимања испитаника слиједе пољопривредници и медицински техничари. Остала занимања која су забиљежена су шумски радници, студенти, трговци, фризер и домаћице.

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

Највећи број испитаника није имао податке о претходној промјени на кожи која одговара првом стадијуму лајмске борелиозе (*erythema migrans*), њих 37 (72.55%). Само пет испитаника је имало податке о *erythema migrans*.

Највећи број испитаника се жалио на осјећај трњења и слабост екстремитета, затим у нешто мањој мјери на главобољу, офталмолошке тегобе и вртоглавицу. Мање су били присутни поремећај свијести, говора, те пареза *n. facialis*, крстачна бол и нервоза. Највећи број испитаника је имао симптоме у трајању до три мјесеца прије него што је примљен у болницу. Убједљиво највећи број испитаника се жалио на симптоме тачно мјесец дана. Од осталих тегоба испитаници су се највише жалили на малаксалост - њих шест, затим осип пет пацијената и редом на бол у зглобовима, кардиолошке тегобе и увећане лимфне чворове. Од коморбидитета најчешће је био заступљен повишен крвни притисак и то код 11 испитаника, најмање су биле заступљене друге неуролошке болести и имунодефицијентна стања.

Просјечне вриједности параметара крвне слике испитаника су били у референтним вриједностима изузев нешто више просјечне вриједности моноцита у диференцијалној крвној слици (13.86%). Просјечне вриједности аспартат аминотрансферазе и аланин аминотрансферазе биле у референтним вриједностима, а гликемије (6.07mmol/l) и C-реактивног протеина (5.87mg/L) које су биле незнатно изнад горње границе.

Од 51 испитаника, њих 18 (35.3%) је имало плеоцитозу (повећан број ћелијских елемената у цереброспиналној течности) и то њих 15 са вриједностима укупног броја ћелијских елемената од 5 до 100, а њих три са вриједностима од 100 до 1000. Доминирали су мононуклеари. Хиперпротеинорахију (повишене вриједности протеина у цереброспиналној течности) је имало 19 (37.25%) наших испитаника, распон повишених вриједности је био од 0.48 до 3.6 g/L. Девет испитаника је имало незнатно снижене вриједности гликорахије (у односу на гликемију).

Од 51 нашег испитаника њих 13 (25.5%) је имало *ELISA* тестом у серуму позитивна *anti Borrelia burgdorferi IgM* антитијела. Код 39 испитаника (76.47%) су у серуму била позитивна *anti Borrelia burgdorferi IgG* антитијела *ELISA* тестом. *Anti Borrelia burgdorferi IgM ELISA* тестом у цереброспиналној течност је био позитиван код седам наших испитаника (13.7%). *Anti Borrelia burgdorferi IgG ELISA* тестом у цереброспиналној течност је био позитиван код 20 (39.2%) наших испитаника.

Резултат *Immunoblot* теста *anti Borrelia burgdorferi IgM* у серуму код наших испитаника био граничан код четири испитаника, позитиван код њих пет а за њих 18 није било

података. Резултат *Immunoblot* теста anti *Borrelia burgdorferi* IgG у серум код наших испитаника био позитиван код њих 28 а за 19 није било података.

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

Анализом корелације резултата појединих серолошких тестова уочена је јака веза резултата *ELISA* anti *Borrelia burgdorferi* IgM у серуму и у цереброспиналној течности ($\rho=0,802$, $p<0.001$). Такође јака веза се уочава и између *ELISA* anti *Borrelia burgdorferi* IgG у серуму и *Immunoblot* anti *Borrelia burgdorferi* IgG ($\rho=0,787$, $p<0.001$). Уочено је груписање очекивано по типу IgG и IgM. Ипак, код IgG најбоље се слажу резултати *ELISA* у серуму и *Immunoblot*, док код IgM најбоље слагање резултата теста уочава се између *ELISA* у серуму и *ELISA* у цереброспиналној течности. Иако постоје неке статистички значајне везе, коефицијент корелације између појединих клиничких манифестација и антитијела на поједине специфичне антигене *B. burgdorferi* је низак и стога те везе нису значајне за практичну анализу.

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

Резултати истраживања су приказани на прегледан начин. Јасно су и објективно тумачени, а кандидат је показао објективан и критичан став у процјени резултата, посебно у дијелу који се односи на поређење са резултатима сличних истраживања. Дискусија резултата показује да је кандидат успио да систематично прикупи, обради и представи резултате, као и да их на јасан и свеобухватан начин разматра и упореди са постојећим литературним подацима.

Ова дисертација је проширила постојећа знања и дала додатне доказе да су тестови двостепене серолошке дијагностике (*ELISA*, *Immunoblot*) веома значајни код пацијената са сумњом на лајмску нсуборелиозу, али да их треба тумачити са опрезом и у корелацији са клиничком сликом и другим доступним тестовима. Није доказан значај

одређивања концентрације хемокина *CXCL13* у цереброспиналној течности као маркера у дијагностици лајмске неуроборелиозе. Такође, осјетљивост *RT PCR* у цереброспиналној течности код обољелих са сумњом на лајмску неуроборелиозу је веома ниска и није од великог значаја у дијагностици, те нема основе да се ради рутински.

Резултати ове дисертације дају одговоре на постављени проблем истраживања, и утврђују нове правце истраживања. Потребне су додатне проспективне студије са већом популацијом и за нове поуздане дијагностичке тестове у циљу унапређења дијагностике лајмске неуроборелиозе и разликовања активне од инактивне форме лајмске неуроборелиозе као и од других болести са сличним клиничким манифестацијама.

VII ЗАКЉУЧАК И ПРИЈЕДЛОГ

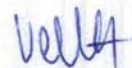
Докторска дисертација под називом „Значај *ELISA*, *IMMUNOBLOT* теста, хемокина *CXCL13* и *REAL-TIME PCR* у дијагностици лајмске неуроборелиозе“ кандидата мр сц. мед. Татјане Рогановић је урађена према правилима и принципима израде научно-истраживачког рада, а резултат је изворног научног и стручног рада кандидата. Истраживање је методолошки добро постављено, те су из тога проистекли валидни резултати на основу којих су донесени јасни закључци. Закључено је да су тестови двостепене серолошке дијагностике (*ELISA*, *Immunoblot*) веома значајни код пацијената са сумњом на лајмску неуроборелиозу, али да их треба тумачити са опрезом и у корелацији са клиничком сликом и другим доступним тестовима. Није доказан значај одређивања концентрације хемокина *CXCL13* у цереброспиналној течности као маркера у дијагностици лајмске неуроборелиозе. Такође, осјетљивост *RT PCR* у цереброспиналној течности код обољелих са сумњом на лајмску неуроборелиозу је веома ниска и није од великог значаја у дијагностици, те нема основе да се ради рутински. Мишљења смо да резултати и закључци ове докторске дисертације представљају оригиналан допринос науци и струци, јер проширују постојећа знања у инфектологији која су везана за дијагностику лајмске неуроборелиозе.

Комисија за оцјену урађене докторске дисертације даје позитивну оцјену за докторску дисертацију под називом „Значај *ELISA*, *IMMUNOBLOT* теста, хемокина *CXCL13* и *REAL-TIME PCR* у дијагностици лајмске неуроборелиозе“ кандидата мр сц.мед. Татјане Рогановић и предлаже Наставно-научном вијећу Медицинског факултета Универзитета у Бањој Луци и Сенату Универзитета у Бањој Луци да прихвате овај извјештај и омогуће кандидату да јавно брани докторску дисертацију.

ПОТПИС ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

Датум: 21.04.2022. године

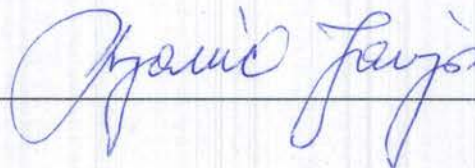
1. Др Антонија Верхаз, ванредни професор,
ужа научна област Инфектологија,
Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци,
предсједник



2. Др Милош Кораћ, ванредни професор,
ужа научна област Инфектологија,
Медицински факултет Универзитета у Београду,
члан



3. Др Јања Бојанић, редовни професор,
Ужа научна област Епидемиологија,
Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци,
члан



4. Др Маја Травар, ванредни професор,
Ужа научна област Медицинска и клиничка
микробиологија,
Медицински факултет Универзитета у Бањој Луци,
резервни члан

