



Универзитет у Београду
ИНСТИТУТ ЗА МЕДИЦИНСКА ИСТРАЖИВАЊА
Институт од националног значаја за
Републику Србију

БРОЈ: 0 166/22

Univerzitet u Novom Sadu,
Dr Zorana Đinđića 1
Novi Sad

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

Примљено 25.5.2022.			
Орг.јед.	Број	Прилог	Вредност
04-	207/1		

Beograd, 24.5.2022.

Primedbe na doktorsku disertaciju

Fakultet: Medicinski fakultet

Naslov disertacije: "Faktori rizika za infestiranje krpeljima i obolevanje od lajmske borelioze u Južnobačkom okrugu i dijagnostika u ranoj fazi bolesti"

Kandidat: assist.dr med. Pavle Banović

Uvidom u rukopis doktorske disertacije Pavla Banovića i Izveštaj komisije o oceni doktorske disertacije u sastavu spec. dr sc. med. Siniša Sević, redovni profesor, spec. dr sc. vet Aleksandar Potkonjak, redovni profesor i dr sc. Sara Savić, naučni savetnik, dostavljam sledeće primedbe.

Na strani 45. u poglavlju Metode i ispitanici, odeljku Serološke analize, kandidat navodi metodologiju za razvoj *in house* testa indirektnе имунофлуоресценције (IFA test), a kao antigen za razvoj testa navodi "...izolat *B. afzelii* 230/13CS kultivisan u BSK-H medijumu tokom 4-5 nedelja na temperaturi 33°C. Izolat je deo kolekcije Grupe za medicinsku entomologiju Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu (dar dr sci. Snežane Tomanović)." Izolat na koji se kandidat poziva, nije moj dar ni njemu lično, niti bilo kom drugom pojedincu ili instituciji. Posedovanje pomenutog izolata od strane Zavoda za antirabičnu zaštitu – Pasterov zavod, Novi Sad, je regulisano Ugovorom o naučno i tehničko-poslovnoj saradnji između Pasterovog zavoda i Instituta za medicinska istraživanja, Univerziteta u Beogradu. Predmet ovog ugovora čine naučna istraživanja i razvoj u delatnosti rada, zajednička eksperimentalna ispitivanja kao i prezentacija postignutih rezultata. Sa ovom činjenicom je bio upoznat i kandidat, kao i bar jedan potpisnik Izveštaja. Tek nakon stavljanja ove doktorske disertacije na uvid javnosti saznala sam da je izolat korišćen za njegovu izradu, te sada iznosim primedbe na metodologiju razvoja testa predstavljenu u disertaciji i posledično dobijene rezultate i način diskutovanja istih.

Naziv izolata je pogrešno naveden, njegova zvanična oznaka koja je publikovana i u radu Ćakić et al., 2019, je 230_13 c, a pod tom oznakom su navedeni i svi detalji karakterizacije ovog soja. Iako je navedeno da je test razvijen za potrebe Službe za mikrobiološku i drugu dijagnostiku Pasterovog zavoda, a u ovoj doktorskoj disertaciji je korišćen za skrining prisustva antitela u serumu kod ljudi, navedeno je da je validacija testa izvršena u skladu sa preporukama *World organisation for Animal Health-Manual of Diagnostic Test and Vaccines for terrestrial*



Animals. Zašto validacija testa nije urađena na osnovu preporuka adekvatnih za razvoj testova za humanu upotrebu kao što su na primer – CDC (1995) *Recommendations for test performance and interpretation from the Second National Conference on Serologic Diagnosis of Lyme Disease* i CDC (2019) *Updated CDC Recommendation for Serologic Diagnosis of Lyme Disease*? Takođe, dostupna je i naučna literatura na ovu temu, kao na primer Branda et al., 2018. U svakom slučaju, koja god vrsta preporuka da je korišćena, kandidat nije detaljno naveo kako je u konkretnom slučaju izvršena validacija testa.

Kroz dalji opis metodologije izvođenja samog testa, na strani 46, navodi da je na svakoj mikroskopskoj pločici postavljana pozitivna i negativna kontrola. Za pozitivnu kontrolu navodi da je u antigeno polje nanešena kultura borelija, na koju je nanešeno poliklonalno antitelo usmereno protiv antigena *B. burgdorferi* sensu lato kompleksa konjugovano sa FITC, dok je za postavljanje negativne kontrole korišćeno antigeno polje borelija na koje je primarno nanešen serum zdravog NMRI miša, na koje je nakon inkubacije naneto anti-humano anti-IgM ili anti IgG antitelo konjugovano sa AlexaFluor 488. Takva postavka testa je u osnovi pogrešna. Što se tiče pozitivne kontrole na način opisan u metodologiji moguće je izvršiti samo kontrolu antigena, ali ne i samog testa. Korišćenje humanog seruma sigurno pozitivnog na prisustvo antiborelijskih antitela i adekvantog sekundarnog antitela na humani IgM/IgG je jedini način na koji je moguće obezbediti pouzdanost dobijenih rezultata. Korišćenje nekompatibilnog mišjeg seruma (kao izvora primarnog antitela) i sekundarnog antitela na humani IgM/IgG u slučaju negativne kontrole takođe kompromituje rezultate dobijene testom (Jovićić Vilma, 1999 i Jovićić et al., 2003). Svaka dalja analiza rezultata dobijenih na način opisan u metodologiji ove doktorske disertacije je krajnje sporna.

Kao druga serološka analiza korišćena u doktorskoj disertaciji navodi se ELISA test, za koji u poglavlju Metode i Ispitanici nisu navedeni nikakvi detalji o tipu, proizvođaču i slično.

Nadalje, u poglavlju Rezultati (strana 70), predstavljeni su samo rezultati prediktivne vrednosti i drugih karakteristika seroloških analiza korišćenih u ovoj disertaciji, bez navođenja konkretnih pojedinačnih rezultata, broja ispitanika testiranih svakim od navedenih testova (IFA i ELISA), rezultata za svaki pojedinačni test, niti bilo kakvih drugih izvornih podataka koji su morali da budu osnova za ovaj set rezultata. Posledično je vrlo teško obezbediti reproducibilnost rezultata, što dovodi u pitanje i samu verodostojnost predstavljenih rezultata, diskusiju i zaključke.

Predlažem da se iz doktorske disertacije isključe svi rezultati za koje nije moguće obezbediti dokaz o adekvatnosti metodologije i sledljivosti dobijenih rezultata.

Generalna primedba koja se odnosi na čitavo poglavlje Rezultati (strana 51-72) je da su originalni rezultati doktorske disertacije vrlo šturo i parcijalno prikazani. Čak i u delovima koji su navedeni u metodologiji, kao što je na primer zoološki pregled krpelja, gde je opisano da je na osnovu odgovarajućih ključeva vršena identifikacija vrste, razvojne faze i perioda parazitiranja (strana 43), podatak o periodu parazitiranja (procenjeno vreme koje je krpelj proveo parazitirajući na pacijentu – pretpostavljam da se odnosi na ovo) se kao rezultat nigde



dalje kroz tekst ne pojavljuje, iako je jedan od ključnih elemenata za procenu rizika od obolevanja od lajmske borelioze nakon uboda krpelja. Dalje analize prediktivne vrednosti i drugih dijagnostičkih karakteristika molekularne PCR analize detekcije *Borrelia burgdorferi* s.l. u krpeljima uklonjenim sa pacijenata (strana 72), zasnovanih samo na osnovu podatka o prisustvu i odsustvu DNK borelija u uzorku su u osnovi izuzetno limitirane i neodržive, jer se kao element u proceni rizika i prediktivne vrednosti mora uzeti u obzir minimalno i podatak o procenjenom vremenu koje je krpelj proveo parazitirajući na čoveku (Meiners et al., 2006, Hofhuis et al., 2017, Wilhelmsson et al., 2016). Još jedan od bitnih činilaca u proceni rizika koji nedvosmisleno moraju biti uzeti u obzir pri razmatranju prediktivne vrednosti ovakve vrste testova je i način uklanjanja krpelja, što je detaljno analizirano i u doktorskoj disertaciji Mladenović J., 2014. Veoma je upitna kategorizacija rezultata detekcije borelija u krpeljima na stvarno pozitivne, lažno negativne, lažno pozitivne i stvarno negativne nalaze, i dalje tumačenje tih rezultata u kontekstu korelacije sa razvojem lajmske borelioze (strana 72). Detekcija patogena, u ovom slučaju *Borrelia burgdorferi* s.l. u krpeljima nije dijagnostička procedura, što kandidat kroz tekst kontinuirano navodi, već je indirektno biološko ispitivanje koje može eventualno doprineti proceni rizika za razvoj lajmske borelioze. Procena rizika koja uključuje i ovu analizu mora da obuhvata i determinaciju vrste i razvojnog stadijuma krpelja, procenu vremena koje je krpelj proveo parazitirajući, i eventualno procenu adekvatnosti uklanjanja krpelja. Iako su neki od ovih podataka navedeni u delovima rezultata (vrsta i razvojni stadijum krpelja), a neki su, kao što je već prethodno napomenuto, navedeni u metodologiji a ne i u rezultatima (da li omaškom ili zato što nisu ni dobijeni), u razmatranju prediktivne vrednosti i proceni rizika analize krpelja uzet je samo podatak o prisustvu/odsustvu borelija.

Procena vremena koje je krpelj proveo parazitirajući na čoveku je značajna i za verodostojnost rezultata koji se tiču pregleda lokaliteta u kojima je uspostavljena infestacija krpeljom (strana 64). Pokazano je, a poznato je i iz entomološke prakse, da podatak o vremenu koje je krpelj proveo prikačen a koga iznosi pacijent može često da odstupa od perioda procenjenog na osnovu morfološkog pregleda krpelja i npr. određivanja skutalnog indeksa (Logar et al., 2002).

Predlažem da kandidat jasno i nedvosmisleno iznese kompletne rezultate dobijene tokom izrade doktorske disertacije, i da u tumačenje i analizu rezultata uključi sve elemente koji će obezbediti verodostojnost zaključaka kao finalnog doprinosa disertacije.

Doktorska disertacija je napisana stilom i jezikom koji često nisu adekvatni za akademski naučno-istraživački rad, te predlažem da se nakon uobličavanja i korekcija po prethodno iznetim primedbama i ovaj segment doktorske disertacije unapredi.

Doktorsku disertaciju koja je predmet iznesenih primedbi su pročitali, a u sastavljanju istih pored mene su učestvovali i saradnici Grupe za medicinsku entomologiju, Centra izuzetnih vrednosti za zoonoze prenošene hranom i vektorima, Instituta za medicinska



истраživanja, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju - dr sci. Darko Mihaljica, naučni saradnik, dr sci med. Ana Vasić, naučni saradnik, dr sci med. Gorana Veinović, naučni saradnik, dr sci med. Ratko Sukara.

Literatura korišćena za prikaz naučne zasnovanosti iznetih primedbi:

Čaklć S, Veinović G, Cerar T, Mihaljica D, Sukara R, Ružić-Sabljić E, Tomanović S. Diversity of Lyme borreliosis spirochetes isolated from ticks in Serbia. Med Vet Entomol. 2019 Dec;33(4):512-520.

Branda et al., Advances in Serodiagnostic Testing for Lyme Disease Are at Hand. Clin Infect Dis. 2018; 66(7):1133–9.

Jovičić Vilma. Dijagnostika lajmske borelioze primenom sojeva *B. Burgdorferi* sa našeg geografskog područja kao antigena u savremenim imunodijagnostičkim testovima. Doktorska disertacija. Vojnomedicinska akademija 1999.

Jovičić V, Grego E, Lako B, Ristović B, Lepšanović Z, Stajković N. Improved serodiagnosis of early Lyme borreliosis: Immunoblot with local *Borrelia afzelii* strain. APMIS. 2003; 111: 1053-9.

Meiners T, Hammer B, Gobel U, Kahl O. Determining the tick scutal index allows assessment of tick feeding duration and estimation of infection risk with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in a person bitten by an *Ixodes ricinus* nymph. Int J of Med Microb. 2006; 296: S1, 103–107

Hofhuis A et al. Predicting the risk of Lyme borreliosis after a tick bite, using a structural equation model. PLoS ONE 2017; 12(7): e0181807

Wilhelmsson P, 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 and Tick-Borne Diseases. 2016; 7(1): 71–79

Mladenović Jovan. Epidemiološki aspekti lajmske bolesti na teritoriji grada Beograda. Doktorska disertacija. Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet, 2014.

Logar M, Ružić-Sabljić E, Strle F. Comparasion of self-assessment and scutal index for the duration of *Ixodes ricinus* tick attachment. Wien Klin Wochenschr. 2002; 114 (13–14): 489-92.

Dr sci. Snežana Tomanović, naučni savetnik
rukovodilac Grupe za medicinsku entomologiju
i Centra izuzetnih vrednosti
za zoonoze prenošene hranom i vektorima