

NAU N O M V E U M E D I C I N S K O G F A K U L T E T A
U N I V E R Z I T E T A U B E O G R A D U

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj dana 16.06.2015. godine, broj 4600/15, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom: „**Validnost razli itih laboratorijskih metoda za dijagnozu onihomikoza i identifikacija faktora rizika**“, kandidata dr Eleonore Dubljanin, zaposlene na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao aistent na katedri za Mikrobiologiju. Mentor doktorske disertacije je Doc. dr Ivana olovi alovski, komentor je Prof. dr Sandra Šipeti -Gruji i .

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Aleksandar Džami , Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Doc. dr Snežana Mini , Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Doc. dr Nataša Maksimovi , Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
4. Prof. dr Zorana Gledovi , Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, u penziji
5. Prof. dr Nataša Miladinovi -Tasi , Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu slede i

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorske disertacije

Doktorska disertacija pod nazivom „Validnost razli itih laboratorijskih metoda za dijagnozu onihomikoza i identifikacija faktora rizika“ sadrži slede a poglavlja: Uvod, Ciljevi rada, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaklju ci i Literatura. Disertacija je napisana na 133 strane, na kojima je prikazano 15 slika, 17 tabela i 9 grafikona. U poslednjem poglavlju je iznet pregled literature koja je citirana u doktorskoj disertaciji i sadrži 187 navoda. Doktorska

disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, podatke o komisiji, biografiju kandidata, i spisak skraćenica korištenih u tekstu.

UVOD se sastoji iz trinaest delova koji su napisani jasno i koncizno. Navedena je savremena definicija i terminologija onihomikoza. Detaljno je prikazana epidemiologija i etiologija onihomikoza, sa posebnim osvrtom na taksonomiju dermatofita. Opisan je na in-prenosa i dat detaljan prikaz patogeneze oboljenja kao i imunski odgovor koji se javlja u toku infekcije. Prikazana je podela i klasifikacija kliničkih tipova onihomikoza. Detaljno su opisani faktori rizika za nastanak onihomikoza kao što su: uzrast, pol, genetski faktori, imunosupresija, šećerna bolest, psorijaza, kompromitovana periferna cirkulacija i upražnjavanje sportskih aktivnosti. Opisana je upotreba Scoring Clinical Index of Onychomycosis (SCIO indeks) u cilju jedinstvenog procenjivanja oštećenja nokta. Detaljno je prikazana laboratorijska dijagnoza onihomikoza uz pomoć kako konvencionalnih laboratorijskih metoda tako i primenom metoda molekularne biologije. Poseban deo se odnosi na terapiju onihomikoza i upotrebu antimikotika za lokalnu i sistemsku primenu. Dat je kratak osvrt na prevenciju onihomikoza.

CILJEVI RADA su precizno navedeni na jednoj strani i obuhvataju određivanje uestalosti javljanja onihomikoza, kao i najčešćih uzroka onihomikoza, analizu validnosti različitih laboratorijskih metoda za dijagnozu onihomikoza, ispitivanje primene tripsina na bolju identifikaciju uzroka onihomikoza, kao i identifikovanje faktora koji doprinose nastajanju onihomikoza.

Poglavlje **MATERIJAL I METODE** sadrži prikaz studije slučajeva 374 pacijenata sa kliničkom sumnjom na onihomikozu iz šest ustanova: Institut za Mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu; Zavod za javno zdravlje, Pančevo; Opšta bolnica „Doktor Jožanić“, Zrenjanin; Opšta bolnica, Užice; Zavod za javno zdravlje „Timok“, Zaječar; Zavod za javno zdravlje, Kraljevo. Etički komitet Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu odobrio je istraživanje. Podaci od pacijenata su prikupljeni odgovarajućim anketnim upitnikom. Od svakog pacijenta uzet je uzorak nokta u zavisnosti od kliničkog tipa onihomikoze i poslat u Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog

fakulteta Univerziteta u Beogradu gde je vršena dalja obrada materijala. U cilju identifikovanja uzro nog faktora onihomikoze za svaki uzorak nokta ura eni su slede i laboratorijski testovi, sa i bez prethodnog tretiranja tripsinom: direktan mikroskopski preparat (DMP) sa KOH i *Blankophor*, kultivisanje na neselektivnim mikološkim podlogama Sabouraud dekstrozni agar (SDA) i razblaženi SDA, kao i selektivnoj podlozi za dermatofite dermatofit test medijum (DTM). Svaki uzorak nokta je testiran i pomo u Dermatophyte PCR kita kojim je mogu e identifikovati dva specifi na markera, jedan za *Trichophyton rubrum*, a drugi za ostale dermatofite (panderm marker). Kriterijum za postavljanje dijagnoze onihomikoze podrazumevao je postojanje jasne klini ke sumnje na onihomikozu uz pozitivnost bilo kog laboratorijskog testa. Na osnovu laboratorijske dijagnoze ispitanici su podeljeni u dve grupe: osobe sa laboratorijski potvr enom dijagnozom onihomikoze i pacijenti bez ovog oboljenja, u cilju identifikacije faktora rizika za nastajanje onihomikoze. Kod svakog pacijenta odre ivan je klini ki SCIO indeks. U statisti koj obradi podataka primenjene su univarijantna i multivarijantna logisti ka regresiona anliza. Statisti ka analiza zna ajnosti uo enih razlika vršena je primenom χ^2 testa. Za svaki ispitivani test, odnosno njihove kombinacije, odre ivana je osetljivost, specifi nost, pozitivna i negativna prediktivna vrednost, pozitivni i negativni faktori verovatno e kao i dijagnosti ki unakrsni odnos. Odnos izme u osetljivosti i specifi nosti ispitivanih metoda predstavljena je pomo u ROC krive.

REZULTATI su prikazani u vidu 25 priloga tj. 9 grafikona, 3 slike i 13 tabela uz propratni tekst, iji sadržaj u potpunosti odgovara sadržaju priloga. Rezultati su prikazani u pet delova. U prvom delu su prikazani rezultati koji se odnose na demografske i klini ke karakteristike osoba sa sumnjom na onihomikozu, dok su u drugom delu predstavljeni rezultati u estalosti javljanja i naj eš ih izaziva a onihomikoza. Tre i deo rezultata sadrži prikaz validnosti razli itih laboratorijskih metoda za dijagnozu onihomikoza, kako na noktima na nogama tako i na noktima na rukama. U etvrtom delu su prikazani rezultati pore enja tripsinizacije metodom po Xess-u sa konvencionalnim metodama za dijagnozu onihomikoza dok su petom delu prikazani faktori koji doprinose nastanku onihomikoza.

U poglavlju **DISKUSIJA** kandidat je na sveobuhvatan i detaljan na in povezao i uporedio svoje rezultate sa rezultatima drugih autora.

U poglavlju **ZAKLJU CI** navedeni su najzna ajniji zaklju ci koji su potpuno u skladu sa dobijenim rezultatima i navedenim ciljevima istraživanja.

U poglavlju **LITERATURA** navedene su 187 bibliografske jedinice iz stranih i doma ih publikacija, udžbenika, pretežno novijeg datuma.

B) Kratak opis postignutih rezultata

Rezultati ove studije slu ajeva ukazuju da je naj eš i klini ki tip onihomikoze bio distalna i lateralna subungvalna onihomikoza (DLSO) (92,51%), a da je na osnovu vrednosti SCIO indeksa 178 (47,59%) pacijenata indikovano za sistemsku terapiju. Od ukupno 374 pacijenata sa sumnjom na onihomikozu, oboljenje je potvr eno laboratorijskim testovima kod 190 (50,8%), dok je kod ak 20% pozitivnih pacijenata bio pozitivan samo PCR. Naj eš i izaziva i onihomikoze su bili dermatofiti (88,95%), od kojih su naj eš i bili *T. rubrum* (89,35%) i *T. interdigitale* (8,28%). U manjem procentu identifikovane su i kvasnice (6,84%), kao i nedermatofitne plesni (4,21%). Onihomikoza je bila 6 puta eš e lokalizovana na noktima na nogama u odnosu na nokte na rukama (163:27). Izaziva i onihomikoze na noktima na nogama su bili dermatofiti kod 95,1% pacijenata, od kojih je najzastupljeniji bio *T. rubrum* (86,6%). Na noktima na rukama dermatofiti su bili potvr eni u 52%, a kvasnice u 44% slu ajeva. Za izra unavanje validnosti ispitivanih metoda na noktima na nogama PCR je uzet za zlatni standard. Dok je za izra unavanje validnosti ispitivanih metoda na noktima na rukama kao zlatni standar uzeta kombinacija *Blankophor* i RSDA.

Tripsinizacijom metodom po Xess-u zna ajno je pove an stepen pozitivnosti kako DMP ($p < 0,001$), tako i kultivisanja na svim ispitivanim mikološkim podlogama (SDA, RSDA, DTM) ($p < 0,001$).

U kona ni model multivarijantne logisti ke regresione analize bilo je uklju eno šesnaest varijabli: uzrast, zanimanje, kompromitovana periferna cirkulacija, ranije prisustvo onihomikoze, pozitivna porodi na anamneza za onihomikozu, putovanje u poslednjih godinu dana, bavljenje sportom, kontakt sa zemljom, poja ano znojenje nogu, stepen zahva enosti

nokta, stepen zadebljanja nokta, broj zahva enih noktiju, lokalizacija onihomikoze, SCIO indeks, paronihija i deformacija nokta. Na osnovu rezultata multivarijantne logisti ke regresione analize nezavisni faktori rizika, koji su bili zna ajno povezani sa nastankom onihomikoze su: stariji uzrast (UO=2,33; $p<0,001$), pozitivna porodi na anamneza za onihomikozu (UO=2,71; $p=0,001$), poja ano znojenje nogu (UO=2,28; $p=0,001$) i ve i stepen zadebljanja nokta (UO=2,04; $p<0,001$).

C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Epidemiološki podaci iz najve eg broja zemalja severne i centralne Evrope pokazuju da su dermatofiti vode i uzro nici onihomikoze. Sli na epidemiološka situacija sa predominacijom dermatofita prime ena je i u zemljama iz našeg okruženja gde je oboljenje eš e lokalizovano na noktima na nogama. U velikom broju studija koje su se bavile definisanjem izolata dermatofita kao uzro nika onihomikoze noktiju na nogama, naj eš i uzro nik je bio *T. rubrum*, koji je izolovan kod 60-90% slu ajeva onihomikoze. Trend sa predominacijom *T. rubrum* prime en je u ve ini evropskih zemalja u poslednjih pedeset godina. Kada su u pitanju nokti na rukama dermatofiti tako e predstavljaju vode e uzro nike, mada je broj studija iz ove oblasti znatno manji. Kvasnice su pretežno izolovane sa noktiju na rukama, sa predominacijom *C. albicans*, dok su nedermatofitne plesni u manjem procentu izolovane uglavnom sa noktiju na nogama što je u skladu sa rezultaima iz Severne Amerike i ve ine zemalja centralne i severne Evrope.

U rutinskom laboratorijskom radu, dijagnoza onihomikoze se naj eš e postavlja i dalje na osnovu DMP sa KOH i zasejavanjem na SDA. Ovi testovi me utim, pokazuju nisku osetljivost kada se koriste pojedina no pa se naj eš e kombinuju. Kultivisanje i dalje predstavlja “zlatni standard” u laboratorijskoj potvrdi dijagnoze onihomikoza uprkos nedovoljnoj osetljivosti ove metode (30-50%) jer je jedini metod koji u rutinskom radu omogu ava identifikaciju uzro nika do nivoa roda/vrste. Procenat lažno negativnih pacijenata primenom konvencionalne dijagnostike prema ve ini studija se kre e do 30%. Kod 20% pacijenata iz ove studije, kod kojih nijedan od konvencionalnih mikoloških testova nije bio

pozitivan, PCR je jedina metoda koja je dokazala prisustvo dermatofita u ispitivanim uzorcima. Veliki broj studija ukazuje da gljivi ni elementi iako prisutni u uzorku i uo eni u DMP esto ne dovode do porasta gljiva na kulturi usled “zarobljenosti” gljivi nih elemenata u keratinu kao i usled smanjene vijabilnosti gljiva. Pojedini istraživa i su tako e primetili ve i procenat pozitivnih nalaza kultura u kojima su uzorci noktiju prethodno bili tretirani tripsinom, što je u skladu sa rezultatima ove studije. Nekoliko skorašnjih studija, koje su koristile komercijalne multipleks PCR kitove za dijagnozu onihomikoza, pokazale su višu osetljivost u pore enju sa konvencionalnim metodama dijagnostike kada postoji visoka prevalencija dermatofita sa predominacijom *T. rubrum*, što je u skladu sa rezultatima ove studije. Ovakva situacija je prime ena i u zemljama severne Evrope u kojima je dermatofit PCR kit uspešno uveden u rutinsku dijagnozu onihomikoze.

Na osnovu rezultata ove studije, faktori rizika za nastanak onihomikoze su u saglasnosti sa rezultatima drugih istraživanja. Mnoge studije su ukazale da u estalost javljanja onihomikoze raste sa godinama i da je najve a ušestalost kod osoba starijih od 60 godina, što je u skladu i sa rezultatima ove studije. Prema rezultatima ove studije postojanje onihomikoze kod još nekog lana porodice je bilo zana ajno povezano sa nastankom ovog oboljenja, nezavisno od ostalih faktora rizika. Pojedini autori smatraju da genetska predispozicija igra veoma zna ajnu ulogu za nastanak onihomikoze i da se oboljenje nasle uje po autozomno dominantnom tipu nasle ivanja. S druge strane u zemljama gde esto dve ili više generacija žive zajedno postoji mogućnost prenosa onihomikoze me u lanovima zajedni kog doma instva putem direktnog i indirektnog kontakta. Brojne studije su pokazale da poja ano znojenje nogu uti e na ve u verovatno u nastanka onihomikoze usled nošenja zatvorene obu e, naro ito tokom upražnjavanja sportskih aktivnosti, što je u skladu sa rezultatima ove studije. Na osnovu rezultata ove studije viši stepen zadebljanja nokatne plo e je bio nezavisno povezan sa nastankom onihomikoze. Pojedini autori su pokazali da je ak 4 puta ve a verovatno a da osobe sa zadebljanjem nokatne plo e obole od onihomikoze.

D) Objavljeni i saopšteni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Objavljeni radovi:

1. **Dubljanin E**, Džami A, Mitrovi S, Arsi Arsenijevi V, Čolović I. Onychomycosis: clinical findings, etiological agents and evaluation of laboratory methods. *Arch Biol Sci* 2014;66:587-94.
2. **Dubljanin E**, Calovski IC, Vujčić I, Džamić A, Arendrup MC, Petersen RF, Jensen RH. Clinical evaluation of a *T. rubrum*-specific polymerase chain reaction and pan-dermatophyte polymerase chain reaction in the diagnosis of suspected onychomycosis in 183 Serbian patients [letter]. *Br J Dermatol* 2014;171:1593-5.

Saopštenja:

1. **Dubljanin E**, Vujčić I, Colović Calovski I, Arendrup MC, Petersen RF, Jensen RH. Comparison of *T. rubrum* specific PCR and pan-dermatophyte PCR with conventional methods in patients with suspected onychomycosis. 24th *ECCMID*, Barcelona, Spain 2014: eP389.
2. **Dubljanin ES**, Čolović IV, Džamić AM, Mitrovi S, Arsi -Arsenijevi VS. Comparison of different laboratory methods in the diagnosis of onychomycosis. 6th Trends in Medical Mycology. Copenhagen, Denmark. *Mycoses* 2013;56:76.

E) ZAKLJUČAK (obrazloženje naučnog doprinosa)

Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju značajan naučni doprinos i pružaju nova saznanja koje se odnose na sagledavanje frekvencije onihomikoza, identifikaciju najčešćih uzročnih faktora kao i potencijalnih faktora rizika. Značajan doprinos predstavlja i uvid o značaju primene pojedinih konvencionalnih, kao i metoda molekularne biologije u dijagnozi onihomikoza s obzirom da je u ovoj studiji po prvi put u Srbiji korišćena molekularna metodologija u cilju laboratorijske potvrde dijagnoze onihomikoza. Rezultati ove doktorske disertacije bi mogli da pomognu u određivanju najpovoljnijeg laboratorijskog protokola za pouzdanu identifikaciju uzročnika onihomikoza prilagođenog našoj lokalnoj epidemiološkoj situaciji kao i ekonomskim prilikama.

F. Predlog komisije za ocenu završene doktorske disertacije

Doktorska disertacija pod nazivom „Validnost različitih laboratorijskih metoda za dijagnozu onihomikoza i ispitivanje faktora rizika“, kandidata dr Eleonore Dubljanin po svom sadržaju i formi, dobro napisanom uvodnom delu, jasno postavljenim istraživačkim ciljevima, dobro osmišljenoj savremenoj metodologiji, precizno iznetim rezultatima rada, razložnoj diskusiji i dobro formulisanim zaključcima ispunjava kriterijume dobro napisanog naučnog rada pa Komisija predlaže Naučnom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju kandidata dr Eleonore Dubljanin i da odobri javnu odbranu.

U Beogradu, 11.04.2016.

Mentor:

Doc. dr Ivana Čolović Čolovski

Komentor:

Prof. dr Sandra Šipeti -Grujić

Članovi Komisije:

Prof. dr Aleksandar Džamić

Doc. dr Snežana Minić

Doc. dr Nataša Maksimović

Prof. dr Zorana Gledović

Prof. dr Nataša Miladinović -Tasić