

**NAUČNOM VEŠTAČENJE U MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Naučnog veštaka Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 13.06.2016. godine, broj 5940/5, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Fenotipska i genotipska karakterizacija bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa izolovanih kod pacijenata sa cističnom fibrozom“

kandidata mr sci. med. dr Zorice Vasiljević, zaposlene na Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije “Dr Vukan Čupić” u Beogradu.

Mentor je Prof. dr Slobodanka Čukić a komentor Prof. dr Branko Jović.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Tatjana Pekmezović, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Ivana Dakić, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Jelena Lozo, profesor Biološkog fakulteta u Beogradu

Na osnovu analize priložene doktorske disertacije, komisija za ocenu završene doktorske disertacije jednoglasno podnosi Naučnom veštaku u Medicinskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

1 A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Zorice Vasiljević napisana je na ukupno 118 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 17 tabela, jedan grafikon i devet slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćena korišćenih u tekstu.

U **uvodu** su dati definicija cisti ne fibroze (CF) i kratak pregled saznanja o bakterijskim respiratornim infekcijama koje se javljaju u sklopu ovog oboljenja, sa naglaskom na njihovoj etiologiji i patogenezu. Posebna pažnja posvećena je značaju i kliničkim manifestacijama respiratornih infekcija izazvanih bakterijama *Burkholderia cepacia* kompleksa (Bcc). Prikazan je detaljan osvrt na karakteristike Bcc bakterija, njihovu kompleksnu taksonomiju i nomenklaturu, morfološke i kulturne osobine, kao i rasprostranjenost u prirodi, značaj u biotehnologiji i na njegovo širenje. Posebna pažnja je posvećena interhumanom načinu prenosa koji ima veliki značaj. Ukratko su opisani najvažniji aspekti laboratorijske dijagnostike respiratornih infekcija kod pacijenata sa CF, a detaljno su opisane metode izolacije i identifikacije Bcc bakterija, kao i metode tipizacije metodama molekularne biologije. Dat je pregled epidemiologije Bcc infekcija u sklopu CF od osamdesetih godina do danas u različitim delovima Evrope i sveta, u okviru kojega su navedeni prevalencija kolonizacije/infekcija nekad i sad, poznati epidemijski klonovi Bcc bakterija koji su bili uzročnici epidemija u centrima za lečenje CF u nekim zemljama i zastupljenost određenih vrsta u okviru Bcc kao uzročnika infekcija. Razmatran je i doprinos metode tipizacije sekvenciranjem više lokusa (MLST) u ispitivanju epidemiologije Bcc bakterija. Imaju na umu da se u razvijenim zemljama širom sveta kontinuirano prati epidemiologija infekcija izazvanih Bcc u kontekstu CF, napravljen je osvrt na epidemiološku situaciju u zemljama Balkanskog poluostrva koja nije dovoljno poznata i situaciju u Srbiji i nacionalnom referentnom Centru za cisti nu fibrozu u kome se vrši sistematski skrining pacijenata sa CF na kolonizaciju Bcc bakterijama u respiratornom traktu. Dat je i pregled faktora koji uslovljavaju virulenciju i patogenetski potencijal Bcc bakterija, uključujući i njihovu rezistenciju na antimikrobne lekove.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od utvrđivanja uestalosti kolonizacije Bcc bakterijama kod pacijenata obolelih od CF; genotipizacije izolata Bcc bakterija i analize klonske distribucije i povezanosti ispitivanih izolata; identifikacije izolata predstavnika različitih genotipova do nivoa vrsta Bcc bakterija; analize populacione strukture i klonske povezanosti pomoću MLST analize; ispitivanja patogenog potencijala predstavnika genotipova Bcc na prisustvo gena koji kodiraju faktore virulencije – „cable“ pile, BCESM, quorum sensing, flagelin, efluks pumpu, lipopolisaharid i sekretorni sistem tipa III; ispitivanja sposobnosti adherencije za

plastiku i produkcije biofilma; fenotipskog ispitivanje osetljivosti na relevantne antimikrobne lekove E-test metodom.

U poglavlju **materijal i metode** navedeno je da se radi o prospektivnoj studiji koja je sprovedena na Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije “Dr Vukan upi ” i Institutu za molekularnu genetiku i geneti ko inženjerstvo u Beogradu. Opisana je ispitivana populacija pacijenata i data definicija hroni ne kolonizacije Bcc bakterijama. Naveden je na in odabira sojeva i testovi koriš eni za njihovu identifikaciju, kao i na in konzerviranja sojeva. Detaljno je opisana metodologija primenjena u eksperimentima. Genotipizacija izolata izvršena je metodom elektroforeze na gelu u pulsiraju em polju (PFGE). Identifikacija predstavnika svakog od genotipova izvršena je primenom PCR metode za amplifikaciju gena za 16S rRNK, PCR metode za amplifikaciju *recA* gena i filogenetskom analizom *recA* gena, kao i MLST metode PCR amplifikacijom i sekvenciranjem sedam genskih lokusa (*atpD*, *gltB*, *gyrB*, *recA*, *lepA*, *phaC* i *trpB*) koji pripadaju “housekeeping” genima. Izvršena je i filogenetska analiza na osnovu konkatenata sekvenci sedam alela koriš enih u MLST analizi. Ispitivanje prisustva markera epidemijskih sojeva, „cable“ pila i BCESM, izvršeno je skriningom PCR metodom. Ispitivanja patogenog potencijala predstavnika genotipova Bcc izvršeno je PCR metodom na prisustvo gena koji kodiraju faktore virulencije (quorum sensing, flagelin, efluks pumpu, lipopolisaharid i sekretorni sistem tipa III). Ispitivanje produkcije biofilma izvršeno je metodom na mikrotitarskim plo ama kojom se meri sposobnost adherencije za plastiku. Fenotipsko ispitivanje osetljivosti na relevantne antimikrobne lekove izvršeno je E-test metodom.

U poglavlju **rezultati** detaljno su opisani i jasno predstavljeni svi dobijeni rezultati.

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaklju ci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada.

Koriš ena **literatura** sadrži spisak od 168 referenci.

2 B) Kratak opis postignutih rezultata

Ispitivanje je pokazalo ve u prevalenciju Bcc infekcija u našoj populaciji pacijenata sa CF u odnosu na ve inu evropskih zemalja za koje su dostupni podaci. U periodu trajanja istraživanja ukupna prevalencija je bila 27,2% a prevalencija hroni nih infekcija 18,5%. Genotipizacijom je identifikovano 14 genotipova/pulsotipova ali je ve ina izolata pripadala jednom od dva genotipa. Preliminarna molekularna identifikacija na osnovu umnožavanja 16S rRNA gena PCR metodom i sekvenciranjem potvrdila je da svi izolati predstavnici razli itih genotipova pripadaju Bcc vrstama. PCR metodom za amplifikaciju Bcc *recA* gena i naknadnim sekvenciranjem svi izolati su identifikovani kao Bcc vrste. Filogenetskom analizom *recA* sekvenci pore ene su sekvence *recA* gena izolata i *recA* sekvence referentnih sojeva iz LMG kolekcije ime je utvr eno da izolati pripadaju vrstama *B. cenocepacia* IIIA linije, *B. multivorans* i *B. stabilis*. MLST analizom izolati su identifikovani kao dve vrste klasifikovane u etiri nova ST-a, *B. cenocepacia* ST856, *B. cenocepacia* ST858, *B. cenocepacia* ST859 i *B. stabilis* ST857. Soj *B. cenocepacia* ST856 je najsl niji epidemijskom soju *B. cenocepacia* ST32. On je bio izrazito dominantan i na en je kod 96% pacijenata. Epidemijski markeri “cable” pilin i BCESM su detektovani kod svih izolata *B. cenocepacia* ST856. Geni za faktore virulencije, *cepI* i *cepR* koji regulišu quorum sensing, gen *wbiL* koji u estvuje u sintezi lipopolisaharida i gen *bcscV* koji je odgovoran za sintezu sekretornog sistema tipa III su detektovani kod svih izolata. Gen *llpE* koji u estvuje u sintezi efluks pumpe detektovan je kod svih sojeva osim kod dva koji pripadaju *B. cenocepacia* ST858 i *B. cenocepacia* ST859. Najve i broj izolata (74,2%) pripadao je slabim proizvo a ima biofilma. Od ispitivanih antibiotika, meropenem je imao najbolju inhibitornu aktivnost (72,6 % osetljivih sojeva), pra en ceftazidimom (71,6%). Najslabiju aktivnost pokazali su tikarcilin/klavulanat i trimetoprim/sulfametoksazol sa 1,1% odnosno 4,2% osetljivih sojeva.

3 C) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Za razliku od zemalja zapadne i severne Evrope, u zemljama balkanskog regiona i isto noevropskim zemljama je epidemiologija Bcc infekcija uglavnom nepoznata. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je prevalencija kolonizacije Bcc bakterijama u našoj sredini ve a nego u drugim zemljama Evrope za koje su dostupni podaci (Zolin

et al., 2014; Zolin et al., 2016). Najveći broj pacijenata je razvio hroničnu kolonizaciju, što je ustanovljeno i kod drugih istraživača (Coutinho et al., 2011; De Boeck et al., 2004; Horsley et al., 2011). Zapažena je velika zastupljenost Bcc kolonizacije u pedijatrijskom uzrastu dok se u većini razvijenih zemalja i do četiri puta češće kod adultnih pacijenata, (Horsley et al., 2011). *B. cenocepacia* je dominantna u našoj sredini, kao i u studijama većeg broja istraživača iz drugih zemalja (Drevinek i Mahenthiralingam, 2010; Govan, 2006; Agodi et al., 2001), mada postoje razlike među zemljama, i u nekim sredinama je *B. cenocepacia* potisnuta drugim vrstama u okviru Bcc (Martina et al., 2013; Nørskov-Lauritsen et al., 2010). Genetička raznovrsnost izolata u ovoj studiji može da se smatra skromnom jer je većina izolata pripadala jednom od dva genotipa, što ukazuje na epidemijsko širenje sojeva. Dominantni klon koji je bio zastupljen kod 96% pacijenata, *B. cenocepacia* ST856, prvi put je opisan u ovom istraživanju. On je sličan klonu CZ1 (ST32) koji je prethodno opisan od strane istraživača u Češkoj (Drevinek et al., 2005) ali i drugim zemljama (Drevinek i Mahenthiralingam, 2010). U studiji je ispitivano i prisustvo markera epidemijskih sojeva, gena za "cable" pilin (*cbIA*) i BCESM koji su i dokazani kod izolata dominantnog klona *B. cenocepacia* ST856. Oni su ranije opisani i kod nekih drugih visokotransmisivnih sojeva *B. cenocepacia* (Govan, 2006; Agodi et al., 2001). Uočene su razlike u identifikaciji dva soja na osnovu analize *recA* gena (grupisani su kao *B. multivorans*) i MLST analize (označeni kao *B. cenocepacia*). Ovakva neslaganja nisu neuobičajena, i ukazuju na ograničenja u identifikaciji genomovara na osnovu analize sekvence *recA* gena koja su uočena i ranije kod *B. multivorans* (Slinger et al., 2011), a osnovu imaju u velikoj genetici srodnosti Bcc bakterija (Vandamme i Dawyndt, 2011). *B. stabilis* je izolovana u malom procentu, što je u skladu sa studijama većine autora iz drugih zemalja, mada postoje i drugačiji podaci (Drevinek et al., 2003; Cunha et al., 2003; Campana et al., 2005; Martina et al., 2013). Svi pacijenti su bili kolonizovani genetički srodnim sojevima tokom perioda istraživanja, što je u skladu sa većinom prethodnih studija (Mahenthiralingam et al., 1996). Kod jednog broja pacijenata kolonizacija Bcc bakterijama ne može da se objasni kontaktom sa drugim pacijentima sa CF i razmatrana je mogućnost da je do kolonizacije došlo iz spoljašnje sredine, o čemu su spekulisali i drugi autori (Drevinek i Mahenthiralingam, 2010; Baldwin et al., 2007;). Ispitivano je prisustvo gena za određene faktore virulencije

(*bcsV*, *fliG*, *wbiI*, *llpE*, *cepI* i *cepR*) i dobijeni rezultati su u skladu sa postojećom literaturom (Graindorge et al., 2010; O'Grady i Sokol, 2011; Vinion-Dubiel et al., 2004; Nair et al., 2005). Većina izolata Bcc je pokazala sposobnost produkcije biofilma, što je u skladu sa podacima iz literature (Caraher et al., 2007; Conway et al., 2002; Savoia i Zucca, 2007). Ispitivanjem osetljivosti na antimikrobne lekove kolekcije Bcc izolata uočeno je visoka udeo rezistencije, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u drugim studijama (Mackenzie et al., 2004; Pitt et al., 1996; Zhou et al., 2007). Najefikasniji kao grupa su bili beta-laktamski antibiotici, meropenem i ceftazidim, što je pokazano i od strane drugih istraživača (Pitt et al., 1996; Zhou et al., 2007). Izolati *B. cenocepacia* ST856 su bili uniformno rezistentni na trimetoprim/sulfametoksazol, koji se smatra jednim od lekova izbora u terapiji infekcija Bcc bakterijama (Avgeri et al., 2009) i pokazao je dobru efikasnost u studijama izvesnih autora (Bonacorsi et al., 1999; Leitão et al., 2008).

4 D) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Vasiljevic ZV, Novovic K, Kojic M, Minic P, Sovtic A, Djukic S, Jovic B (2016) *Burkholderia cepacia* complex in Serbian patients with cystic fibrosis: prevalence and molecular epidemiology. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. doi 10.1007/s10096-016-2662-4

5 E) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Fenotipska i genotipska karakterizacija bakterija *Burkholderia cepacia* kompleksa izolovanih kod pacijenata sa cističnom fibrozom“ dr Zorice Vasiljević, kao prvi ovakav rad u našoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju epidemiologije respiratornih infekcija kod pacijenata sa CF u našoj sredini, ali ima i značaj za regionalnu i globalnu epidemiologiju ovih infekcija jer pruža informacije o regionu za koji do sada nisu postojali podaci. Identifikovan je novi epidemijski klon *B. cenocepacia* što će doprineti globalnom razumevanju ovog problema ali i omogućiti da se u ispitivanoj populaciji pacijenata primene adekvatni načini prevencije i kontrole infekcija. Ustanovljene teškoće u identifikaciji nekih vrsta Bcc će potencijalno doprineti daljem radu na istraživanjima taksonomije i identifikacije ovih mikroorganizama.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, a metodologija rada je bila savremena. Rezultati su pregledno i sistematično prikazani i diskutovani, a iz njih su izvedeni odgovarajući zaključci.

Na osnovu svega navedenog, imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom vešću u Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Zorice Vasiljević i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 4.7.2016.

Članovi Komisije:

Prof. dr Tatjana Pekmezović

Prof. dr Ivana Đakić

Prof. dr Jelena Lozo

Mentor:

Prof. dr Slobodanka Ćukić

Komentor:

Prof. dr Branko Jović
