

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 20.05.2021. godine, broj 9700/14-DK, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Genotipske, fenotipske i redoks karakteristike sojeva grupe B streptokoka izolovanih u Srbiji“

kandidata dr Dušana Kekića, zaposlenog na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Mentor je Prof. dr Lazar Ranin, a komentor Prof. dr Kristina Gopčević.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Nataša Vučković Opavski, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Lidija Izrael-Živković, vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
3. Prof. dr Aleksandra Šmitran, vanredni profesor Medicinskog fakulteta u Banja Luci

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

IZVEŠTAJ

A) Prikaz sadržaja doktorke disertacije

Doktorska disertacija dr Dušana Kekića napisana je na ukupno 124 strane i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 26 tabela, četiri grafikona i 15 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** je prikazana klasifikacija grupe B streptokoka (GBS), morfološke, kulturalne i biohemijske karakteristike, načini tipizacije, faktori virulencije koji dovode do kolonizacije i oboljenja, infekcije koje izaziva GBS, načini prevencije, razvoj vakcine i terapija navedenih oboljenja, kao i rezistencija na antibakterijske agense.

Takođe je prikazan i detaljan osvrt na dosadašnja saznanja vezana za oksidativni stres i redoks odnose kod GBS u pogledu nastanka slobodnih radikala kod bakterija, njihovog efekta na bakterijsku ćeliju, kao i antioksidativne mehanizme zaštite od njihovog uticaja.

Ciljevi rada su precizno definisani. Sastoje se od: procene učestalosti rektovaginalne kolonizacije trudnica sojevima GBS; procene učestalosti ranih i kasnih invazivnih infekcija odojčadi izazvanih sojevima GBS; ispitivanja fenotipova i genotipova rezistencije invazivnih i neinvazivnih izolata GBS na makrolide i tetracikline, kao i njihove osetljivosti na druge klase antibiotika; određivanja kapsularnih tipova invazivnih i neinvazivnih izolata GBS, kao i utvrđivanja povezanosti različitih kapsularnih tipova invazivnih i neinvazivnih izolata GBS sa fenotipovima i genotipovima rezistencije na makrolide i tetracikline. Takođe kao cilj rada navedeno je i ispitivanje redoks statusa invazivnih i neinvazivnih izolata GBS.

U poglavlju **materijal i metode** navedeno je da je studija obuhvatila izolate GBS izolovanih u rutinskom radu u periodu od januara 2015. do januara 2020. godine sa teritorije Republike Srbije iz 14 mikrobioloških laboratorija. Izolovani sojevi poslani su u Nacionalnu referentnu laboratoriju (NRL) za streptokok, Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu, gde su identifikovani do nivoa vrste (*Streptococcus agalactiae*), ispitana osetljivost na antibiotike disk difuzionim metodom antibiograma, određena minimalna inhibitorna koncentracija difuziom antibiotika u gradijentu koncentracije, određeni fenotipovi rezistencije na makrolide, ispitana genetska osnova rezistencije na makrolide i tetracikline, određen kapsularni tip i prisustvo hipervirulentnog klona ST17 PCR metodama. Takođe, za invazivne sojeve je urađena tipizacija sojeva gel elektroforezom u pulsnom polju (PFGE). Biohemijski parametri redoks statusa su urađeni na reprezentativnom uzorku invazivnih i neinvazivnih sojeva GBS metodom slučajnog uzorka. U statističkoj obradi, korišćene su metode deskriptivne statistike, Studentov t-test za nevezan i vezan uzorak, Man Vitnijev test, Viloksonov test sume rangova, χ^2 i Fišer test za procenu mogućih povezanosti i razlika između mikrobioloških karakteristika. Korišćen je test linearnih trendova (Cochran-Armitage - CA) za praćenje promena u vremenskim okvirima. Za procenu raznolikosti ispitivanih izolata korišćen je Simpsonov indeks diverziteta (SID) sa 95% intervalom poverenja. Za izračunavanje nivoa podudarnost između metoda tipizacije bakterijskih sojeva, korišćen je Wallace koeficijent (W_c). Potencijal za izazivanje invazivnog oblika bolesti kod pojedinačnih CPS tipova je izračunat na osnovu invazivnih odnosa kvota (odds ratio - OR). U svim primenjenim statističkim analitičkim metodama prihvaćeni nivo značajnosti bio je $p < 0,05$. Podaci o srpskom stanovništvu i broju živorođenih u istraživanom periodu (2015–2020), dobijeni su od Zavoda za statistiku Republike Srbije. Za organizovanje podataka i

pravljen je tabela, primenjen je Microsoft Excel 2016 (Microsoft, SAD), a u obradi podataka i statističkim analizama, korišćen je softver SPSS, verzija 20.0 (SPSS Inc, IBM, SAD). Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

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.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 295 reference.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Proverom originalnosti doktorske disertacije, korišćenjem programa iThenticate utvrđeno je da podudaranje teksta, odnosno vrednost Similarity indexa iznosi 7%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je: prethodno publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja, koji su proistekli iz rada na disertaciji; opštih podataka upotrebljenih u opisivanju univerzalne metodologije uspostavljene u rutinskom radu istraživačke laboratorije Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu i bibliografskih podataka o korišćenoj literaturi, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18). Na osnovu svega iznetog, a u skladu sa članom 8. stav 2. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu, saglasni smo da izveštaj ukazuje na originalnost doktorske disertacije, te da se propisani postupak pripreme za njenu odbranu može nastaviti.

C) Kratak opis postignutih rezultata

Tokom pet godina studije od januara 2015. godine do januara 2020. godine, prikupljen je i obrađen 1071 izolat GBS, od čega 80 invazivnih izolata i 991 neinvazivnih. Što se vrste kliničkog materijala tiče, među invazivnim izolatima najčešći uzorak je bila krv (85%), a ređi likvor (10%), pleuralni punkt (2,5%) i sinovijalna tečnost (2,5%); među neinvazivnim uzorcima, najveći broj se odnosio na rektovaginalni bris (88,5%), a u manjem broju genitalni bris (9,5%) i urin (2%). Većinu invazivnih sojeva pacijenata su činili neonatalni uzorci rane i kasne neonatalne bolesti (75%), dok su preostale činili sojevi GBS izolovani od odraslih pacijenata (25%). Utvrđena je stopa asimptomatske kolonizacije trudnica koja je iznosila 15,6% u toku trajanja studije, kao incidencija invazivnih neonatalnih bolesti GBS od 0,18 na 1000 živorođene dece. Detektovana je veća incidencija rane neonatalne bolesti (EOD - 0,12

na 1000 živorođene dece) u odnosu na kasnu neonatalnu bolest (LOD - 0,05 na 1000 živorođene dece).

Po pitanju rezistencije na antibiotike, utvrđeno je da su svi testirani izolati GBS bili osetljivi na penicilin, vankomicin, norfloksacin, hloramfenikol i gentamicin visoke doze. Rang MIK vrednosti za penicilin se kretao od 0,006 µg/ml do 0,094 µg/ml. Ukupna rezistencija svih testiranih sojeva GBS na eritromicin je iznosila 26,7% i za klindamicin 22,1%, dok je 85,2% sojeva GBS bilo rezistentno na tetraciklin. Najčešći fenotip rezistencije na makrolide kod sojeva GBS rezistentnih na makrolide, bio je konstitutivni (cMLS 60,8%), zatim inducibilni (iMLS 22%) i M fenotip (17,1%). Rang vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIK₅₀ i MIK₉₀) za eritromicin su se kretale od 2 µg/ml do ≥256 µg/ml i za klindamicin od 8 µg/ml do ≥256 µg/ml. Genetska osnova rezistencije je kod M fenotipova bila posredovana uglavnom posredstvom *mefA* gena, dok je kod sojeva sa cMLS i iMLS fenotipom rezistencije na makrolide to bili *ermB*, odnosno *ermA* gen. Kod svih izolata GBS rezistentnih na makrolide, utvrđena je istovremena rezistencija (korezistencija) na tetraciklin. Rezistencija na tetraciklin je bila većinski posredovana *tetM* i *tetO* genima, dok je kod jednog samo izolata detektovano prisustvo *tetL* gena. Tokom perioda trajanja studije detektovani su trendovi porasta rezistencije na eritromicin, klindamicin i tetraciklin koji su statistički značajni.

Od svih testiranih sojeva, detektovano je prisustvo šest kapsularnih tipova (KT), Ia, Ib i od II do V), od kojih su najčešći bili tip V (26%) i III (25,8%). Među invazivnim sojevima, dominantan je bio tip III (51,3%), dok je među neinvazivnim bio tip V (26,3%). Detektovane su značajne razlike u zastupljenosti određenih KT sojeva među određenim grupama pacijenata: KT III je bio statistički značajno češći kod invazivnih u odnosu na neinvazivne sojeve, neonatalnim (EOD+LOD) u odnosu na odrasle invazivne, LOD u odnosu na EOD, kao i kod neonatalnih sojeva u odnosu na izolate asimptomatskih trudnica. Tip II je bio značajno češći kod neinvazivnih u odnosu na invazivne sojeve, kao i kod asimptomatskih trudnica u odnosu na netrudne odrasle pacijente sa urogenitalnim infekcijama. Takođe, među invazivnim izolatima novorođenčadi, tipovi Ia i II su bili registrovani samo u slučajevima EOD novorođenčadi. Tip V je bio značajno češći kod invazivnih izolata odraslih u odnosu na neonatalne izolate, kao i kod asimptomatskih trudnica u odnosu na neonatalne uzorke. Izračunati potencijal za izazivanja invazivnih bolesti pokazao je da samo izolati GBS KT III imaju izražen potencijal izazivanja takvih oboljenja. Tokom perioda trajanja studije, registrovane su statistički značajne promene prisustva KT, odnosno povećanja KT II i pad KT V. Registrovana je i statistički veća zastupljenost ST17 sojeva među invazivnim u odnosu na neinvazivne, odnosno kod neonatalnih u odnosu na izolate odraslih pacijenata. Tokom trajanja

studije, takođe je detektovan značajan porast broja izolata hipervirulentnog klona III/ST17 među neonatalnim sojevima. Većina sojeva GBS rezistentnih na makrolide, odnosno tetracikline je pripadala KT V i III.

Genetička povezanost 69 odabranih invazivnih sojeva GBS je ispitana PFGE metodom kojom je dobijeno 47 pulsotipova sa visokim indeksom diverziteta (SID = 0,971). Dendrogram ispitanih sojeva je profilisao sojeve u šest klastera (A, B, C, D, E i F), koji su činili skoro 70% sojeva, dok su preostali profilisani kao manje grupe i jedinstveni profili. Pet klastera je bilo homogeno po pitanju KT, dok je jedan imao različite KT. Najveći klaster E sa 16 sojeva je bio sastavljen od izolata hipervirulentnog klona III/ST17, a najveći nivo homologije među KT u odnosu na PFGE je imao KT V. Rezistentni sojevi na makrolide su pokazali i u PFGE profilima veću zastupljenost u klasterima koji su bili sastavljeni od izolata KT V.

Analiza biohemijskih markera redoks statusa testiranih sojeva ukazala je na razlike u totalnom antioksidativnom statusu (TAS) invazivnih i neinvazivnih sojeva, indeksu oksidativnog stresa (IOS), kao i u nivou lipidne peroksidacije i aktivnosti superoksid dizmutaze (SOD). Slične značajne razlike su detektovane i među lizatima sojeva različitih grupa pacijenata, gde je i ukupan sadržaj tiola bio parametar koji se značajno razlikovao. U funkciji rezistencije na makrolide, ispitivani sojevi su se razlikovali u totalnom oksidativnom statusu (TOS) koji je bio veći kod rezistentnih sojeva i većeg sadržaja završnih proizvoda oksidacije proteina (AOPP) kod osetljivih sojeva. Razlike u biohemijskim parametrima u funkciji rezistencije na tetracikline i različitih KT nije bilo. Sa druge strane, aktivnost SOD se pokazala kao značajno manja kod sojeva GBS hipervirulentnog klona ST17 u odnosu na ostale sojeve GBS.

D) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

U okviru ove doktorske disertacije je po prvi put urađeno sveobuhvatno praćenje u petogodišnjem periodu učestalost asimptomatske kolonizacije trudnica, incidencija neonatalnih bolesti, distribucija rezistencije, kapsularnih tipova i prisustva hipervirulentnog klona sa trendovima među invazivnim i neinvazivnim sojevima GBS u Srbiji. Takođe, po prvi put se ispituju parametri redoks statusa kliničkih izolata GBS u funkciji doprinosa mehanizmu asimptomatske kolonizacije, odnosno izazivanja invazivni ili neinvazivne bolesti ljudi.

Procenjena prevalencija asimptomatske kolonizacije trudnica sojevima GBS u Srbiji od 15,6% je slična ili blago niža od zabeleženih vrednosti za evropske zemlje (Russell i sar., 2017). Takođe, procenjena vrednost incidencije invazivnih neonatalnih bolesti, kao i udeli EOD i LOD u našoj zemlji su nešto niži u odnosu na evropski prosek i odgovaraju zemljama sa niskim incidencijama ovakvih oboljenja (Madrid i sar., 2017). Generalno, uzrok niskih

incidencija je i primena preventivnih mera sprečavanja i praćenja javljanja neonatalnih bolesti. Kako u Srbiji opštih preporuka i vodiča nema i studija nije obuhvatila celu teritoriju Republike Srbije, procenjene vrednosti invazivnih neonatalnih bolesti su verovatno potcenjene. Ipak, i ova vrednost incidencije neonatalnih bolesti odgovara vrednostima objavljene studije sa Krita (Vergadi i sar., 2018). Nepostojanje preventivnih mera za sprečavanje neonatalnih bolesti, ogleda se i kroz odnos parametara EOD i LOD u ovoj studiji, gde je kod zemalja koje koriste preventivne mere došlo do inverzije i veće zastupljenosti LOD u odnosu na EOD na koji preventivne mere imaju efekta.

Rezultati studije u pogledu rezistencije na antibiotike ukazuju na osetljivost sojeva na penicilin, vankomicin, norfloksacin, hloramfenikol i gentamicin visoke doze. Obzirom na veliki broj ispitanih sojeva i odsustvo detekcije rezistencije na navedene antibiotike, kao i pojavu sojeva GBS sa smanjenom osetljivošću na penicilin (više MIK vrednosti) koji se kao i multirezistentni sojevi sve češće prijavljuju širom sveta, ovakvi rezultati su zadovoljavajući. Ipak, sa druge strane, procenti zastupljenosti rezistencije na eritromicin, klindamicin i tetraciklin sa jasnim rastućim trendovima ukazuju da rezistencija cirkulišućih sojeva GBS odgovara pojedinim evropskim zemljama, kao što je Irska 2017. godine (22,5% rezistentnih sojeva na eritromicin i 21,3% na klindamicin) ili Holandija 2020. godine (86% rezistentnih na tetraciklin) (Hayes i sar., 2017; Jamrozy i sar., 2020). I trendovi porasta rezistencije na navedene antibiotike su prijavljeni širom evropskih država, od kojih one vrednosti u ovoj studiji su najpribližniji onim objavljenim od strane Poljskih autora 2020. godine (Kaminska i sar., 2020). Distribucija fenotipova rezistencije na makrolide, kao i dominantnost cMLS fenotipa je već opisana i kod drugih autora u Evropi, kao i genetička osnova ove rezistencije, koja se ogleda kroz dominantnost pre svega *ermB* gena (Lopes i sar., 2018; Genovese i sar., 2020).

Od postojećih 10 KT GBS, detektovano je šest koji se ubrajaju u najčešće detektovane širom sveta (Ia, Ib i od II do V). Više od polovine ispitanih sojeva GBS predstavljaju KT V i III. Zastupljenost određenog tipa, kao i odnosi detektovanih tipova među određenim grupama pacijenata možemo porediti sa mataanalizama koje uzimaju u obzir geografsku distribuciju, specifičnost određenih populacija, prisustvo ili odsustvo preventivnih mera, uticaj i poreklo uzoraka i sl. (Song i sar., 2018; Bianchi-Jassir i sar., 2020). Osim podudarnosti rezultata ove studije po pitanju distribucije KT i generalne predominacije određenih KT u grupama pacijenata, nalaz i ove studije se slaže u oceni potencijala sojeva KT III u povišenoj mogućnosti za izazivanje invazivnih bolesti (Song i sar., 2018). Promene u trendovima različitih KT se takođe registruju širom Evrope ili kao posledica predominacije određenog

klona ili kao fenomen zamene kapsule, posebno u okviru ST1 (Lopes i sar., 2018). Kapsularna zamena je opisana i kao jedan od mehanizama javljanja *hvgA* gena u okviru KT IV, a ne samo III. Na osnovu PFGE analize invazivnih sojeva, klasterovanje sojeva III/ST17 i IV/ST17, ukazalo je na potencijalno postojanje mogućnosti sticanja *hvgA* gena ovi sojeva ili rekombinacijom ili kapsularnom izmenom (Bellais i sar., 2012). Dominantni genotipovi sojeva GBS rezistentnih na makrolide u ovoj studiji (V/*ermB/tetM*, IV/*ermB/tetM*, III/*ermB/tetM*, II/*ermB/tetM*, Ia/*mefA/tetM* i Ib/*ermB/tetM*) odgovaraju globalno cirkulišućim genotipovima u brojnim studijama i posledica su ne samo klonalne selekcije već i uticaju transfera mobilnih genetičkih elemenata među sojevima (Oppegaard i sar., 2020). Biohemijski parametri redoks statusa su pokazali značajne razlike u pogledu antioksidativnih kapaciteta između neinvazivnih i invazivnih sojeva, kao i različit uticaj određenih mehanizama zaštite kod određenih izolata iz različitih regija ili grupa pacijenata. U pogledu rezistencije na makrolide, parametri oksidacije su bili veći kod rezistentnih u odnosu na osetljive sojeve. Među sojevima hipervirulentnog klona III/ST17 zabeležena je smanjena antioksidativna sposobnost SOD u odnosu na ostale sojeve GBS.

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Dušan Kekic, Ina Gajic, Nataša Opavski, Milan Kojic, Goran Vukotic, Aleksandra Smitran, Lidija Boskovic, Marina Stojkovic and Lazar Ranin. Trends in molecular characteristics and antimicrobial resistance of group B streptococci: a multicenter study in Serbia, 2015–2020. Scientific Reports (2021) 11:540

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Genotipske, fenotipske i redoks karakteristike sojeva grupe B streptokoka izolovanih u Srbiji“ dr Dušana Kekića, je prva nacionalna studija koja se bavila molekularnom epidemiologijom invazivnih i neinvazivnih sojeva GBS u višegodišnjem periodu, kao i ispitivanjem redoks statusa izolovanih sojeva. Dobijeni rezultati prevalencije asimptomatske kolonizacije trudnica, incidencije neonatalnih bolesti, zastupljenosti rezistencije i cirkulišućih kapsularnih tipova, kao i prisutnost hipervirulentnih klonova ST17, predstavljaju značajne parametre za stvaranje nacionalne strategije u pogledu prevencije i lečenja infekcija izazvanih GBS. Takođe, dobijeni parametri redoks statusa se mogu koristiti u daljnjem razumevanju patogeneze bolesti i potencijalnom razvijanju novih terapijskih strategija.

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, i imajući u vidu dosadašnji naučni rad kandidata, komisija predlaže Naučnom veću Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju dr Dušana Kekića i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 08.06.2021.

Članovi Komisije:

Prof. dr Nataša Vučković Opavski

Prof. dr Lidija Izrael-Živković

Prof. dr Aleksandra Šmitran

Mentor:

Prof. dr Lazar Ranin

Komentor:

Prof. dr Kristina Gopčević
