

**NASTAVNO NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRDU**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 11.03.2022. godine, 11/IV-3/3-MM, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„KOLONIZACIJA GASTROINTESTINALNOG TRAKTA PREVREMENO ROĐENE DECE MULTIREZISTENTNIM ENTEROBAKTERIJAMA – USPOSTAVLJANJE, ODRŽAVANJE KOLONIZACIJE I GENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA SOJEVA“

kandidata dr Marije Milić

Mentori su prof.dr Vera Mijač i doc.dr Jelena Martić

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Miloš Kuzmanović, profesor Medicinskog fakulteta u Beogradu
2. Prof. dr Slobodan Spasojević, profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu
3. Doc. dr Ina Gajić, docent Medicinskog fakulteta u Beogradu

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 Marije Milić napisana je na ukupno 115 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi rada, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 51 tabela, 14 grafikona i 6 slika. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, biografiju kandidata, podatke o komisiji i spisak skraćenica korišćenih u tekstu.

U **uvodu** su detaljno opisane karakteristike prevremeno rođenog novorođenčeta, sa posebnim osvrtom na komplikacije koje nosi prevremeno rođenje, kao i lečenje i nega ove specifične pedijatrijske populacije. Izneta su dosadašnja saznanja o kolonizaciji gastrointestinalnog trakta, značaju formiranja mikrobiote i kolonizacije multirezistentnim

bakterijama među kojima su naročito značajne enterobakterije koje proizvode beta laktamaze proširenog spektra delovanja (ESBL-E) i enterobakterije rezistentne na karbapeneme (CRE). Poseban akcenat stavljen je na povezanost kolonizacije gastrointestinalnog trakta i nastanka neonatalne sepse, čiji su etiologija, patogenezna, dijagnostika i terapija takođe navedeni. Detaljno su opisani mehanizmi rezistencije na -laktamske antibiotike. Osvrt je dat i na postojeće podatke o multirezistentnim enterobakterijama u našoj zemlji.

Ciljevi rada su jasno i precizno definisani: određivanje učestalosti kolonizacije gastrointestinalnog trakta multirezistentnim enterobakterijama (ESBL-E i CRE) kod hospitalizovane prevremeno rođene dece, određivanje faktora rizika za nastanak kolonizacije multirezistentnim enterobakterijama (ESBL-E i CRE) kod hospitalizovane prevremeno rođene dece, kao i faktora rizika za razvoj infekcija. Ciljevima je obuhvaćeno i istraživanje dinamike uspostavljanja kolonizacije gastrointestinalnog trakta multirezistentnim enterobakterijama (ESBL-E i CRE) tokom hospitalizacije i dužine njenog održavanja nakon otpusta iz bolnice kao i ispitivanje antimikrobne osetljivosti izolovanih multirezistentnih enterobakterija (ESBL-E i CRE) i određivanje genske osnove rezistencije.

U poglavlju **Materijal i metode** je navedeno da je ovo istraživanje je sprovedeno na Institutu za neonatologiju u Beogradu i na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Navedeno je da se studija se sastoji iz dva dela, a u prvom delu rađenom po tipu prospektivne kohortne studije je određivana učestalost kolonizacije i faktori rizika za kolonizaciju. Drugi deo studije, koji je takođe rađen po tipu prospektivne kohortne studije, se odnosio na praćenje dinamika uspostavljanja i održavanja kolonizacije, a izolovani sojevi su korišćeni za detekciju gena rezistencije i testiranje osetljivosti na antibiotike.

Detaljno je opisano prikupljanje informacija od značaja za studiju, kao i uzorkovanje, čuvanje, kultivisanje, identifikacija multirezistentnih sojeva i ispitivanje njihove antimikrobne osetljivosti. Detekcija gena koji kodiraju ESBL i gena koji kodiraju karbapenemaze rađena je multipleks PCR metodom, zahtevala je ekstrakciju bakterijske DNK kao i vizuelizaciju elektroforezom u gelu. U statističkoj obradi podataka korišćene su metode deskriptivne i analitičke statistike.

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

Diskusija je napisana sveobuhvatno, jasno i pregledno, uz prikaz podataka sličnih istraživanja i njihovo temeljno poređenje sa rezultatima dobijenim u okviru doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz ove studije. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 361 reference.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Na osnovu Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu i nalaza u izveštaju iz programa iThenticate kojim je izvršena provera originalnosti doktorske disertacije “Kolonizacija gastrointestinalnog trakta prevremeno rođene dece multirezistentnim enterobakterijama – uspostavljanje, održavanje kolonizacije i genotipska karakterizacija sojeva” autora Marije Milić je utvrđeno podudaranje teksta 18% što je posledica korišćenja opštih pojmova i termina u mikrobiologiji i pedijatriji, opštih mesta i podataka, prethodno publikovanih rezultata doktorantnovih istraživanja koji su proistekli iz ove disertacije i podudaranja sa korišćenom bibliografijom što je u skladu sa članom 9. Pravilnika.

C) Kratak opis postignutih rezultata

U ispitivanje kolonizacije ESBL-E i CRE na otpustu iz ustanove je uključeno 350 prevremeno rođene novorođenčadi. Među ispitanicima 52% je bilo muškog pola, 60% primljenih u prvom danu života, oko 70% upućenih iz beogradskih porodilišta. U većini trudnoća do začeća je došlo spontano (79,4%), trudnoće su bile jednoplodne (65,7%) i majke su prethodno rađale (66%), a dve trećine ispitanika (66,3%) je rođeno carskim rezom. Najveći broj ispitanika je rođen nakon 32. nedelje gestacije (50%), sa Apgar skorom manjim od 7 u prvom minutu (63,1%), dok je petina bila malo za gestacionu starost. Polovina ispitanika je lečena u odeljenju neonatalne intenzivne nege (56,6%), približno polovina je imala dužinu hospitalizacije između jednog i dva meseca (48,9%) i zahtevala neinvazivnu respiratornu potporu (56,6%). Tokom hospitalizacije, od 350 ispitanika, 60 (17,14%) je imalo mikrobiološki potvrđenu sistemsku infekciju (pozitivan nalaz hemokulture), a 80 (22,8%) ispitanika je imalo kliničke znake sepse bez laboratorijske potvrde. Svi ispitanici su po protokolu ustanove primali od prvog dana hospitalizacije inicijalnu antibiotsku terapiju (ampicilin i amikacin) u trajanju od 5-7 dana. Pored ove terapije, 196 ispitanika (56%) je primalo dodatnu antibiotsku terapiju,

najčešće meropenem kao monoterapija ili u kombinaciji sa drugim antibioticima (49,4%). Retinopatija prematuriteta je nađena kod 34,6% ispitanika, zatim blaža intraventrikularna hemoragija (26,8%) i perzistentni duktus arteriozus (18,6%). Nekrotizirajući enterokolitis, bronhopulmonalna displazija i teža intraventrikularna hemoragija su bile zastupljene znatno ređe među našim ispitanicima.

U prikazanoj studiji, učestalost kolonizacije prevremeno rođene novorođenčadi na otpustu iz Instituta za neonatologiju je bila veoma visoka (98,2%). Kod najvećeg broja ispitanika (68%) su istovremeno bile prisutne dve multirezistentne vrste bakterije, a najčešća kombinacija prisutna kod 35,4% ispitanika je bila ESBL-produkujuća *E. coli* (ESBL-EC) i ESBL-produkujuća *K. pneumoniae* (ESBL-KP). Kod svih kolonizovanih ispitanika su bile prisutne ESBL-E (*E. coli* 88,3%, *K. pneumoniae* 58,6%), dok je četvrtina ispitanika (25,1%) bila kolonizovana i sa CRE (svi izuzev jednog pacijeta sa *E. coli* su nosili *K. pneumoniae*). Kolonizovani ispitanici sa ESBL-EC su češće bili rođeni pre 32. nedelje gestacije ($p=0,005$) i imali su telesnu masu $< 1500\text{g}$, i Apgar skor < 7 u prvom minutu ($p=0,006$), značajno su češće primali meropenem i ampicilin-sulbaktam ($p=0,038$) i boravili na prijemnom odeljenju ($p=0,001$). Takođe, učestalost ROP je bila značajno viša u odnosu na nekolonizovane. Kolonizovani sa ESBL-KP su češće bili ženskog pola ($p=0,026$), češće boravili na prijemnom odeljenju ($p=0,002$), i značajno ređe su imali plasiran venski umbilikalni kateter ($p=0,016$), a primali meropenem i ampicilin-sulbaktam češće u odnosu na nekolonizovane ($p=0,04$). Kolonizovani ispitanici sa CRE su značajno češće imali manju telesnu masu na rođenju ($p=0,001$), niži Apgar skor ($p<0,01$), bili manje gestacijske zrelosti ($p=0,026$) i rođeni iz blizanačke trudnoće ($p=0,008$). Ispitanici kolonizovani sa CRE su bili značajno duže hospitalizovani ($p<0,001$), duže boravili u OIN ($p<0,001$) i imali značajno češće plasiran VUK ($p<0,001$), značajno češće primali karbapeneme u kombinaciji sa drugim antibiotskim agensima, vankomicin ($p=0,001$), ampicilin sulbaktam i kolistin ($p=0,01$). Novorođenčad kolonizovana sa CRE su češće imala nekrotični enterokolitis ($p=0,001$) i blažu intraventrikularnu hemoragiju ($p=0,002$). Kod šest ispitanika na otpustu nije detektovana kolonizacija sa ESBL-E ili CRE. Među nekolonizovanim ispitanicima svi su bili veće telesne mase i veće gestacijske zrelosti, sa višim Apgar skorom na rođenju. Svi ispitanici koji su imali infekcije tokom hospitalizacije su bili kolonizovani ili sa ESBL-E ili sa CRE, a većina je imala više vrsta rezistentnih bakterija u kolonizaciji. Kolonizacija sa CRE je značajno učestalija kod ispitanika sa sepsom, i u slučaju kliničke ($p=0,008$), kao i kod sepse potvrđene pozitivnom hemokulturom ($p<0,0001$).

Uspostavljanja kolonizacije ESBL-E i CRE i njeno održavanje tokom hospitalizacije je praćeno u kohorti koja je uključila 88 prevremeno rođene novorođenčadi. Na prijemu u Institut za neonatologiju, i u definisanim vremenskim intervalima tokom hospitalizacije (u prvoj nedelji, četvrtog i sedmog dana, krajem četvrte, krajem osme i krajem dvanaeste nedelje) su uzorkovani rektalni brisevi od pacijenata koji su prospektivno praćeni. Ispitanici kod kojih je praćena kolonizacija od prijema u ustanovu su bili nešto češće muškog pola (56,8%), primljeni u ustanovu najčešće prvog dana posle rođenja (64,7%), uglavnom su rođeni u velikim ginekološko-akušerskim centrima u zemlji (73,9%), rođeni carskim rezom (62,5%), kod 34,1% porođaj je nastao usled prevremenog prsnuća plodovih ovojaka. Većina je ispod 32 nedelje gestacije (51,1%), imala Apgar skor niži od 7 na rođenju i bili telesne mase na rođenju manje od 1500g (64,8%). Oko 45,5% je boravilo na odeljenju intenzivne nege, kod 37,5% je primenjvana mehanička ventilacija. Kolonizacija sa ESBL-E na prijemu je nađena kod 15 ispitanika (17%), a posle 7 dana boravka u ustanovi ukupno oko polovine ispitanika (47,7%) bilo kolonizovano, što je značajno povećanje učestalosti kolonizacije ESBL-E kod prospektivno praćenih ispitanika ($p < 0,001$). Krajem prvog meseca kolonizacija je uspostavljena kod još 33 ispitanika (37,5%) koji prethodno nisu bili kolonizovani, a krajem drugog meseca, kod još 8 ispitanika (9,1%). Ukupna učestalost kolonizacije sa ESBL-E u kohorti od 88 ispitanika (u bilo kojoj vremenskoj tački tokom hospitalizacije) iznosila je 94,3%. Vrste ESBL-E detektovane kod prospektivno praćenih ispitanika su bile *E. coli* i *K. pneumoniae*, dok su svi CRE sojevi bili *K. pneumoniae*. Zbog činjenice da je dužina boravka u bolnici bila različita kod ispitanika i da nije bilo moguće svim ispitanicima u svim definisanim vremenskim tačkama uzeti uzorke, trend kolonizacije po vrstama ESBL-E je analiziran u prvoj nedelji hospitalizacije, sa značajnim porastom kolonizacije i ESBL-EC i ESBL-KP ($p < 0,001$). Dužina održavanja ESBL-E i CRE kolonizacije je ispitivana na kontrolnim pregledima po otpustu iz Instituta za neonatologiju i to posle mesec dana, tri meseca, šest meseci i godinu dana. Sedamdeset pet od 83 kolonizovana ispitanika (90,4%) je došlo na jedan ili više kontrolnih pregleda. Post-hoc analizom je pokazano da učestalost kolonizacije ESBL-EC nije značajno opadala na drugom u odnosu na prvi kontrolni pregled ($p = 1,0$), kao ni na trećem u odnosu na drugi pregled ($p = 0,063$). Posle godinu dana, kod oko trećine ispitanika kolonizovanih sa ESBL-EC, kolonizacija je perzistirala, dok je kod oko četvrtine došlo do dekolonizacije. Posle godinu dana, kod najvećeg broja ispitanika kolonizovanih sa ESBL-KP (88,6%) kolonizacija više nije bila prisutna, kod 5 je i dalje perzistirala (11,3%), a za dva ispitanika status nije bio poznat.

Antimikrobna osetljivost je testirana kod ispitanika kod kojih je kolonizacija prospektivno praćena (N=88), za svaki prvi izolat ESBL-E i/ili CRE. Ukupno je ispitano 59 sojeva ESBL-EC, 44 soja ESBL-KP i 13 sojeva CRE. Svi testirani izolati su bili multirezistentni i rezistencija je bila ćesta na sve klase antibiotika, sa izuzetkom kolistina, na koga rezistencija nije detektovana.

Molekularna detekcija najćećih ESBL gena je uraćena za 34 izolata ESBL-EC i 34 izolata ESBL-KP. Kod svih ispitanih sojeva detektovani su *bla*TEM, *bla*SHV ili *bla*CTX-M-15, sami ili u kombinaciji, dok *bla*CTX-M-2, *bla*CTX-M-9 i *bla*CTX-M-14 nisu naćeni ni kod jednog testiranog izolata. Kod oko polovine izolata ESBL-EC (44,1%) naćen je *bla*CTX-M-15, dok je kod ostalih izolata bilo prisutno najćeće dva razlićita gena (52,9%), a kod jednog soja su detektovana sva tri testirana gena rezistencije. Kod najvećeg broja izolata ESBL-KP je naćen *bla*TEM i *bla*SHV (32,3%), zatim *bla*TEM i *bla*CTX-M-15 (29,4%), a kod preostalih sojeva je detektovan po jedan od ispitivanih gena ili sva tri zajedno. Kod sojeva *K. pneumoniae* koji su bili rezistentni na karbapeneme, kod osam izolata je detektovan *bla*OXA-48, (uvek sa *bla*CTX-M-15), dok je kod preostalih sedam naćen *bla*KPC (zajedno sa i *bla*TEM i *bla*SHV genima). Svi sojevi sa *bla*OXA-48 su bili osetljivi na amikacin, sulfametoksazol trimetoprim i hloramfenikom i rezistentni na gentamicin i fluorohinolone. Sojevi sa *bla*KPC su bili rezistentni na fluorohinolone, većinom rezistentni na gentamicin i amikacin, dok je osetljivost na sulfametoksazol trimetoprim bila prisutna kod tri, a na hloramfenikol kod ćetiri soja.

Univarijantna i multivarijantna logistićka regresija su primenjene kako bi se identifikovali prediktori kolonizacije multirezistentnim enterobakterijama. S obzirom da je ućestalost nalaza ESBL-EC bila izuzetno visoka, nije bilo moguće izdvojiti prediktore za kolonizaciju ovom bakterijom. Prediktori kolonizacije su odrećivani za kolonizaciju sa ESBL-KP (ćenski pol, boravak na prijemnom odeljenju, dok je primena venskog umbilikalnog katetera protektivan faktor) i za kolonizaciju sa CRE (dućina boravka u bolnici, boravak na OIN, primena VUK i boravak na odeljenju izolacije i Prvom odeljenju specijalizovane nege). Primena antibiotika je bila znaćajan prediktor kolonizacije. Izuzev duće primene inicijalne terapije (> 7 dana) i primene ampicilin sulbaktama sa kolistinom, sve ostali antibiotski agensi i/ili kombinacije agenasa su bili prediktori CRE kolonizacije, a pre svega primena meropenema, samog ili u kombinaciji.

Prediktori nastanka kliniće sepe odrećeni univarijantnom logistićkom regresijom su bili asfiksija na roćenju (Apgar skor <7), hospitalizacija duća od mesec dana, boravak na OIN,

boravak na OIN (>7 dana), svi oblici invazivne i neinvazivne respiratorne potpore (mehanička ventilacija, HFOV, NCPAP) i venski umbilikalni kateter. Intraventrikularna hemoragija, bronhopulmonalna displazija, perzistentni duktus arteriozus, retinopatija prematuriteta je takođe bila značajan prediktor sepse. Značajno se češće javljala i kod ekstremno nezrele novorođenčadi i one manje od 1000 g. Kao prediktori nastanka sepse potvrđene hemokulturom identifikovani su nekrotički enterokolitis, retinopatija prematuriteta.

D) Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Prevremeno rođena deca predstavljaju izuzetno vulnerabilnu humanu populaciju, koja zbog opšte fiziološke nezrelosti ima potrebu za produženom negom do uspostavljanja funkcija organa i organskih sistema, a nosi rizik od nastanka brojnih patoloških stanja koja su posledica nezrelosti. Izloženost bolničkoj sredini i njenim mikroorganizmima predstavlja rizik za uspostavljanje kolonizacije multirezistentnim bakterijama (Folgori i sar., 2019), a učestalost raste sa produženjem hospitalizacije (Stoll i sar., 2013). U Srbiji je malo studija rađeno o kolonizaciji rezistentnim bolničkim patogenima, a dostupni podaci se odnose uglavnom na kolonizaciju vankomicin rezistentnim enterokokom i odnose na pacijente u odeljenjima adultne intenzivne nege (Mioljević i sar., 2013; Janjušević i sar., 2021). U svetu, brojne studije su istraživale kolonizaciju ESBL-E i CRE, ali prema dostupnim podacima iz savremene medicinske literature, ovako visoke stope nisu nađene u drugim odeljenjima neonatoloških intenzivnih nega. U Engleskoj i Velsu je četvrtina novorođenčadi kolonizovana (Mitra i sar., 2011), u Palermu 12% (Giuffrè i sar., 2016), u Nemačkoj 26% (Baier i sar., 2019). U Izraelu, učestalost kolonizacije ESBL-*K. pneumoniae* u neonatalnoj intenzivnoj nezi je snižena sa 24% na 11% (Benenson i sar., 2013) četiri godine posle uvođenja rektalnog skrininga i izolacije kolonizovane novorođenčadi. Značajno više stope kolonizacije su pokazane u manje razvijenim zemljama. Rekordne stope kolonizacije od čak 59% su pokazane u centralnoj Africi i to kod zdrave dece (Farra i sar., 2016). Studija u Keniji je pokazala porast stope kolonizacije od 10% na prijemu do 55% na otpustu (Kagia i sar., 2019). U Maroku je na prijemu u OIN kolonizacija ESBL-E bila prisutna kod 22% novorođenčadi, koja su uglavnom prethodno već boravili na odeljenjima intenzivne nege u porodilištima (Arhoune i sar., 2021). Na neonatološkim odeljenjima u Ekvadoru je zabeležena učestalost kolonizacije od 56% (Nordberg i sar., 2013), slično kao i na Haitiju (Chaintarli i sar., 2018). U poređenju sa istraživanjima kolonizacije ESBL-E, o kolonizaciji izazvanoj CRE ima daleko manje objavljenih podataka (Chiotos i sar., 2017; Folgori i sar., 2017). Učestalosti kolonizacije sa CRE u pedijatrijskoj populaciji su kao i za ESBL-E znatno niže u razvijenim zemljama u odnosu na

manje razvijene sredine. U SAD je u nekoliko bolničkih ustanova među decom bilo 4,5% izolata koji su rezistentni na karbapeneme (Chiotos i sar., 2017). U Italiji, u neonatološkim odeljenjima, učestalost kolonizacije CRE je uglavnom niska, iako je opisano nekoliko epidemija u različitim delovima zemlje (Giuffre i sar., 2016; Montagnani 2016). U Indiji je učestalost kolonizovane novorođenčadi bila 9% (Singh i sar., 2018), u Kini 11% (Yin i sar., 2021), a više od polovine ispitanika koji su boravili duže od tri nedelje su postajali kolonizovani. I u Maroku na pokazano da je na prijemu kolonizacija CRE bila prisutna kod oko 9% novorođenčadi, a na otpustu je zabeležena stopa bila 22% (Arhoune i sar., 2021). Najviša učestalost kolonizacije među hospitalizovanom novorođenčadi od 65% je do sada pokazana u Vijetnamu (Tran i sar., 2019).

Brojni faktori rizika za kolonizaciju ESBL-E i CRE su pokazani. Povezanost pola i kolonizacije je pokazana u malom broju studija, a veća učestalost ESBL-E kod novorođenčadi muškog pola je nađena u Maleziji (Lee i sar., 2021), dok je u Brazilu tokom epidemije na ONIN nađena kao i kod nas češća ESBL-*K. pneumoniae* kod ispitanika ženskog pola (Pessoa-Silva i sar., 2003). Značajni faktori rizika za kolonizaciju ESBL-E su prema studijama rađenim i u razvijenim i u nerazvijenim zemljama bili niska gestaciona zrelost, niska porođajna telesna masa, (Millar i sar., 2008; Vijayakanthi i sar., 2013; Rettedal i sar., 2013; Abdel-Hady i sar. 2008; Huang i sar., 2007), primena mehaničke ventilacije (Crivaro i sar., 2007; Shakil i sar., 2010) i dužina hospitalizacije (Abdel-Hady i sar., 2008; Huang i sar., 2007). U najvećem broju istraživanja ističe se značaj antibiotiske terapije kao faktora rizika za ESBL-E kolonizaciju (Benenson i sar., 2013; Taconelli i sar., 2014; Cassettari i sar., 2009).

U našem istraživanju u kohorti ispitanika kojima je prospektivno praćeno uspostavljanje kolonizacije, nađeno je da je učestalost kolonizovanih ESBL-E na prijemu u ustanovu bio visok (17%). Poznato je da je transmisija ESBL-E moguća tokom porođaja sa majke na plod i da vertikalna transmisija doprinosi širenju ove vrste rezistencije (Wolf i sar. 2021). Većina kolonizovanih je rođena carskim rezom (>70%) i transportovana iz velikih porodilišta, što su regionalni centri gde je omogućeno vođenje rizičnih trudnoća, što sve doprinosi povećanju rizik intrahospitalne transmisije (Logan i sar 2010). Činjenica da je tokom prve nedelje 22% ispitanika postalo kolonizovano je nalaz koji ukazuje na visok nivo intrahospitalne akvizicije i transmisije ESBL-E u Institutu za neonatologiju. Jedan od razloga je najverovatnije odsustvo procedure skrininga i izolacije kolonizovanih u cilju sprečavanja dalje transmisije, što je mera preporučena da se primenjuje u svim visoko rizičnim populacijama među kojima su svakako i prevremeno rođena deca (Taconelli CMI 2014).

Posmatrajući učestalost kolonizacije ESBL-E i CRE u definisanim vremenskim tačkama tokom hospitalizacije, trend u našoj studiji je bio rastući, ESBL-EC je do sedmog dana porasla sa 11% na 26%, dok je ESBL-KP sa 8% na 32%. Prospektivna studija na pedijatrijskoj intenzivnoj nezi u Brazilu je pokazala da je učestalost kolonizovanih sa ESBL-E na prijemu bila 7%, a tokom dve nedelje došlo je do porasta učestalosti kolonizovanih na 14% (Levy i sar., 2010). Studija sprovedena u Gabonu je pokazala visoku učestalost kolonizacije na prijemu od 45%, koja je tokom hospitalizacije rasla da bi do 94% na otpustu (Schaumburg i sar. 2013). Vrlo veliki broj studija je ispitivalo odnos kolonizacije i sepse u grupi prevremeno rođene dece i u većini slučajeva je ta veza i dokazana (Madan i sar., 2012, Basu i sar, 2014). Novije studije koje se bave istraživanjem mikrobiote, takođe ovu vezu potvrđuju (Stewart i sar., 2013, Lee i sar., 2020, Lee i sar., 2021). U našoj kohorti ispitanika bilo je mali broj onih koji su razvili infekciju, pa veza kolonizacije i sepse nije mogla biti ustanovljena. Nakon otpusta dokazi prenosa ESBL-E i CRE među članovima domaćinstva su pokazani u velikom broju studija (Hilty i sar. 2012, Valvede i sar. 2008, Riccio i sar. 2021), naročito ukoliko je kolonizovan sa ESBL-KP i pokazano je da se rizik transmisije vremenom smanjuje (Riccio i sar 2021). Perzistencija kolonizacije sa ESBL-E duže od godinu dana je zabeležena kod nešto više od četvrtine naših ispitanika. Podaci iz drugih studija pokazuju da u većini slučajeva do dekolonizacije dolazi posle godinu dana, mada su razlike značajne u zavisnosti od ispitivane populacije. U studiji rađenoj u Norveškoj posle epidemije u neonatalnoj intenzivnoj nezi izazvanoj CTX-M-15 ESBL-KP, pokazana je prosečno trajanje kolonizacije od 12,5 meseci posle otpusta (Löhr i sar, 2013), a u Švedskoj, perzistiranje kolonizacije ESBL-KP može trajati i do dve godine, a retko čak do 5 godina (Nordberg i sar., 2017). Među ESBL-E pojedinačno najčešće detektovan gen je bio *bla*CTX-M-15, što je i očekivano s obzirom na globanu propagaciju i pandemijsko širenje ovog enzima zabeleženo poslednjih decenija (Canton i sar., 2006). Prisustvo više gena koji kodiraju ESBL je pokazano i češće su takvi nalazi u manje razvijenim sredinama kao npr. u Indiji, Alžiru, Tanzaniji (Sharma i sar., 2010., Souna i sar., 2014., Silago i sar., 2020, Mohd Helmi i sar., 2016), ali su multirezistentni izolati sa mnoštvom determinanti rezistencije nađeni i u razvijenim zemljama (Carvalho i sar. 2021). Kod CRE izolata u našoj studiji nađene su kombinacije *bla*OXA-48/*bla*CTX-M-15, i *bla*KPC/*bla*TEM/*bla*SHV, dok su opisane u literaturi kombinacije CRE sa *bla*KPC/*bla*CTX-M-15/*bla*SHV/*bla*TEM genima (Aires 2020), u Hrvatskoj među KPC sojevima uporedno je bila prisustva *bla*SHV, dok je *bla*TEM sporadično nalažena (Jelic, 2016), u Tunisu *K. pneumoniae* sa *bla*OXA/*bla*CTX-M-15, kao što je nađeno i u našem istraživanju (BenTangous i sar. 2016).

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

1. Milic M, Siljic M, Cirkovic V, Jovicevic M, Perovic V, Markovic M, Martic J, Stanojevic M, Mijac V. **Colonization with Multidrug-Resistant Bacteria in the First Week of Life among Hospitalized Preterm Neonates in Serbia: Risk Factors and Outcomes.** Microorganisms. 2021 Dec 17;9(12):2613. (M22, IF 4,128)
2. Milić M, Mijač V. **Beta laktamaze proširenog spektra delovanja kod reda Enterobacterales - klasifikacija i genetska osnova rezistencije.** Medicinski podmladak. 2019;70(2):1-7. M52

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Kolonizacija gastrointestinalnog trakta prevremeno rođene dece multirezistentnim enterobakterijama – uspostavljanje, održavanje kolonizacije i genotipska karakterizacija sojeva“ mr sci. med. dr Marije Milić, kao prvi ovakav rad u našoj zemlji predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju uspostavljanja i održavanja kolonizacije multirezistentnim bakterijama u specifičnoj populaciji nezrele novorođenčadi kao i genotipska karakterizacija sojeva multirezistentnih bakterija u jednoj bolničkoj sredini. Posle uvida u rezultate ovog istraživanja i izuzetno visoke stope kolonizacije multirezistentnim bakterijama ne samo tokom hospitalizacije već i njihovo održavanje nakon otpusta, moglo bi biti preporučeno uvođenje skrininga kolonizacije multirezistentnim bakterijskim sojevima na prijemu i tokom hospitalizacije u odeljnjima intenzivne nege, ne samo neonatološke već i pedijatrijske i adultne populacije.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, studija je dobro dizajnirana, 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 Marije Milić i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, april 2022.

Članovi Komisije:

Prof. dr Miloš Kuzmanović

Prof. dr Slobodan Spasojević

Doc. dr Ina Gajić

Mentori:

Prof. dr Vera Mijač

Doc. dr Jelena Martić
