

**NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

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 kandidata dr Irene Aran elovi , pod nazivom „**Vrste, filogenetske karakteristike i geneti ka osnova rezistencije multirezistentnih sojeva *Mycobacterium tuberculosis* kompleksa izolovanih u Srbiji**“. Mentor za izradu doktorske disertacije je prof. dr Dragana Vukovi , vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Imenovana je Komisija u sastavu:

1. prof. dr Ivana Daki , vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
2. prof. dr Vesna Škodri -Trifunovi , vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
3. prof. dr Branislava Savi , redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
4. prof. dr Dejan Krnjai , vanredni profesor Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
5. prof. dr Lidija Risti , redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu

Nakon detaljnog pregleda priložene dokumentacije, konsultacija sa mentorom i kandidatkinjom, a prema kriterijumima za ocenu doktorske disertacije, lanovi Komisije Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu jednoglasno podnose slede i

**IZVEŠTAJ**

**A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije**

Doktorska disertacija „**Vrste, filogenetske karakteristike i geneti ka osnova rezistencije multirezistentnih sojeva *Mycobacterium tuberculosis* kompleksa izolovanih u Srbiji**“.

podeljena je u sedam poglavlja: uvod (56 strana), ciljevi istraživanja (1 strana), materijal i metode (19 strana), rezultati (67 strana), diskusija (42 strane), zaključci (2 strane), prilozi (30 strana) i spisak korištene literature (30 strana). Disertacija uključuje ukupno 31 sliku, 42 tabele, 24 grafikona, kao i 392 citata iz naučnih časopisa.

U prvoj celini **UVODA** naveden je medicinski značaj tuberkuloze (TB) i multirezistentne (MDR) TB i dati su epidemiološki pokazatelji oboljevanja od TB i MDR TB u svetu i Evropi. U narednom delu pažnja je posvećena laboratorijskoj dijagnostici TB i prednostima primene molekularnih metoda za identifikaciju uzročnika TB, sojeva *Mycobacterium tuberculosis* kompleksa (MTK) do nivoa vrste odnosno podvrste. U sledećem poglavlju navedene su osnovne karakteristike roda *Mycobacterium* i MTK, uz detaljan opis geografske distribucije i značaja pojedina članova ovog kompleksa kao izazivača humane TB i MDR TB. Poseban deo Uvoda posvećen je detaljnom opisu DNK polimorfizama u genomima sojeva MTK, kao osnovnim uzrocima velikog fenotipskog diverziteta koji je dokazan među pripadnicima ovog kompleksa. U sledećem delu Uvoda objašnjen je značaj primene klasičnih metoda genotipizacije kao i tehnika sekvenciranja genoma nove generacije (NGS) u otkrivanju različitih aspekata MDR TB. Naglašene su prednosti primene NGS, odnosno analize polimorfizama pojedinačnih nukleotida (SNP), u odnosu na analize drugih molekularnih markera genoma MTK u molekularno epidemiološkim studijama. U narednom segmentu Uvoda predstavljena su savremena saznanja o genetici koja osniva rezistencije sojeva MTK na antituberkulotike (ATL), kao i uticaju mutacija u genima rezistencije na sposobnost transmisije sojeva MTK. U poslednjem delu Uvoda dat je detaljan opis statusa MDR TB u Srbiji.

**CILJEVI ISTRAŽIVANJA** su jasno definisani i obuhvataju ispitivanje profila vrsta i podvrsta MTK koje su prisutne kao izazivači TB i MDR TB u Srbiji. Ciljevi obuhvataju i ispitivanje filogenetske strukture lokalnih MDR sojeva MTK, kao i utvrđivanje puteva transmisije i faktora rizika za transmisiju MDR sojeva MTK u Srbiji. Kao ciljevi navedeni su i detekcija i procena učestalosti mutacija u okviru gena povezanih sa rezistencijom na ATL, ispitivanje korelacije ustanovljenih genotipova rezistencije i filogenetskih genotipova lokalnih MDR sojeva MTK i procena sposobnosti transmisije ovih sojeva.

U poglavlju **MATERIJAL I METODE** detaljno su objašnjene sve metode koje su koriš ene u razli itim segmentima istraživanja u skladu sa postavljenim ciljevima. Navedeno je da su eksperimenti izvedeni na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i u laboratoriji Molecular Mycobacteriology Group, Forschungszentrum Borstel, Nema ka. Detaljno je opisana studijska populacija pacijenata i navedeni izvori demografskih, klini kih, epidemioloških i laboratorijskih podataka o pacijentima, koji su sakupljani tokom istraživanja. Za istraživanje su formirane dve kolekcije sojeva MTK: svi MDR sojevi MTK izolovani u Srbiji u periodu 01.01.2008.-31.05.2014. godina (115 sojeva) i svi sojevi MTK izolovani od pacijenata obolelih od plune TB u Srbiji tokom perioda 01.12.2010.-30.11.2011. godina (971 soj). Za molekularnu identifikaciju do nivoa vrste odnosno podvrste svih sojeva MTK uklju enih u istraživanje koriš en je komercijalno dostupan esej (GenoType MTBC, HAIN Lifescience), zasnovan na reakciji reverzne hibridizacije. Za genotipizaciju MDR sojeva MTK primenom konvencionalnih metoda koriš ene su spoligotipizacija i MIRU-VNTR tipizacija, a rezultati su analizirani primenom odgovaraju ih baza podataka i softverskih paketa. Klasteri MDR sojeva MTK identifikovani primenom klasi nih tehnika genotipizacije definisani su kao grupe od najmanje dva soja sa identi nim genotipovima. Sekvenciranje genoma MDR sojeva izvršeno je na Illumina MiSeq sekvenatoru, odnosno tehnikom sekvenciranja putem sinteze i reverzibilnih terminatora. Detektovane sekvence genoma MDR sojeva MTK mapirane su na osnovu pore enja sa sekvencama genoma referentnog soja *M. tuberculosis* H37Rv, uz upotrebu odgovaraju eg programa preciznog poravnanja. Stablo minimalnog raspona za MDR sojeve MTK izolovane u Srbiji konstruisano je na osnovu referentne kolekcije SNP laboratorije Molecular Mycobacteriology Group, Forschungszentrum Borstel, Nema ka, primenom BioNumerics i EvolView softvera. Klasteri MDR sojeva MTK definisani na osnovu rezultata NGS obuhvatili su sve sojeve iji su se genomi razlikovali u 12 SNP, u skladu sa predloženim maksimalnim nivoom varijacija genoma sojeva uklju enih u lance nedavne transmisije. Procena evolutivne starosti definisanih NGS klastera izvršena je na osnovu Bayesian analize SNP profila MDR izolata MTK i vremena izolovanja MDR sojeva MTK iz uzoraka pacijenata, primenom BEAST 1.7. softvera. Identifikacija faktora rizika za transmisiju MDR TB u Srbiji izvedena je na osnovu pore enja karakteristika pacijenata

svrstanih u klastere i pacijenata koji su MDR sojevi MTK imali jedinstvene genotipove. Za detaljan uvid u transmisiju pojedina njih sojeva organizovani su i razgovori sa nadležnim lekarima. Izvršena je sveobuhvatna analiza rezultata sekvenciranja gena koji se smatraju ključnim za rezistenciju na ATL prve i druge linije.

Statistička obrada podataka izvršena je primenom SPSS 20.0 softverskog paketa. U studiji su korišćene odgovarajuće deskriptivne (apsolutni i relativni brojevi, mere centralne tendencije i mere disperzije) i analitičke (Hi kvadrat test, Hi kvadrat test za trend i Mann-Whitney U test) statističke metode. Zbog malog broja jedinica posmatranja u pojedinim analizama, korišćeni su egzaktni testovi i Monte Carlo simulacija. Signifikantnost testa manja od 0,05 uzeta je kao vrednost za odbacivanje nulte hipoteze.

U poglavlju **REZULTATI** su kroz četiri odeljka sistematično i detaljno prikazani rezultati istraživanja. Dobijeni rezultati prikazani su na 23 grafikona, 40 tabela i 27 slika.

U poglavlju **DISKUSIJA** kandidat je na sveobuhvatan način, jasno i detaljno povezoao rezultate ovog istraživanja sa rezultatima sličnih istraživanja objavljenih u međunarodnim naučnim časopisima. Na osnovu toga, kandidat je izneo svoje zaključke i hipoteze, koji objašnjavaju rezultate ove doktorske disertacije u kontekstu rezultata drugih autora koji imaju isti naučni interes. Rezultati istraživanja o kojima ne postoje dostupni podaci u naučnoj literaturi, objašnjeni su na odgovarajući način.

U poglavlju **ZAKLJUČCI** navedeni su najznačajniji zaključci koji su potpuno u skladu sa navedenim ciljevima i dobijenim rezultatima.

U poglavlju **LITERATURA** navedene su 392 bibliografske jedinice, uključujući i publikacije kandidata, iz stranih i domaćih publikacija. Bibliografske jedinice citirane su vankuverskim stilom.

## **B. Kratak opis postignutih rezultata**

Rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da svi MDR sojevi MTK koji su izolovani u Srbiji tokom proteklih šest godina pripadaju vrsti *M. tuberculosis*. Takođe, svi sojevi MTK izolovani od pacijenata obolelih od plućne TB u Srbiji tokom perioda 01.12.2010.-30.11.2011. godina, pripadaju vrsti *M. tuberculosis*. Time je ovim istraživanjem pokazano da ne postoji razlika u profilima vrsta izazivača TB i vrsta uzročnika MDR TB u Srbiji. Vrste

MTK izaziva i TB kao zoonoze nisu identifikovane u Srbiji. U sledećem delu prikazani su rezultati genotipizacije MDR sojeva *M. tuberculosis* (MTB) izolovanih u Srbiji primenom klasičnih tehnika i sekvenciranjem genoma u cilju otkrivanja njihove filogenetske strukture. Kombinovanom analizom rezultata dve klasične metode genotipizacije, 114 MDR sojeva MTB klasifikovano je u ukupno osam genotipova, odnosno TUR, Haarlem, Beijing, S, Ural, Ugandal, Ugandal-like i Belgrade H37Rv. Najveći broj izolata (35,9%), identifikovan je kao TUR genotip. Imaju i u vidu jasne prednosti NGS u odnosu na konvencionalnu genotipizaciju, konačnim rezultatima ovog istraživanja smatrani su rezultati dobijeni primenom NGS. Prema rezultatima sekvenciranja genoma, 108 MDR sojeva klasifikovano je u ukupno šest genotipova, odnosno TUR, Clade 1, Haarlem, Beijing, S i Ural, pri čemu ukupno 36,1% sekvenciranih MDR izolata pripada genotipu TUR.

U narednoj celini izvršena je analiza rezultata genotipizacije u kontekstu karakteristika transmisije MDR sojeva MTB u Srbiji. Na osnovu rezultata NGS identifikovano je ukupno 11 klastera, koji su obuhvatili 66,7% MDR sojeva, dok je 33,3% izolata imalo jedinstvene SNP profile. Stepen grupisanja MDR sojeva u klastere iznosio je čak 56,5%, što je jasan pokazatelj suboptimalne kontrole širenja MDR TB u našoj zemlji. Najveći i identifikovani klaster obuhvatio je 37 izolata, koji pripadaju TUR filogenetskoj liniji. Statistička analiza pokazala je da se TUR sojevi značajno češće nalaze u klasteru u poređenju sa sojevima koji pripadaju drugim genotipovima. Na osnovu analize udruženosti karakteristika pacijenata i pojedinačnih genotipova kojima su pripadali MDR sojevi MTB izolovani iz uzoraka pacijenata, pokazano je da su MDR sojevi MTB izolovani iz uzoraka pacijenata obolelih od shizofrenije i uzoraka pacijenata koji su bili hospitalizovani u Specijalnoj bolnici za plućne bolesti „Budislav Babi“ u Bela Crkva značajno udruženi sa TUR genotipom. Moguće epidemiološke veze dokazane su u 72,7% klastera definisanih na osnovu rezultata NGS. Od ukupno 35 pacijenata iz čijih uzoraka su izolovani sojevi grupisani u TUR klasteru, njih 26 je bilo hospitalizovano na odeljenju za lečenje psihijatrijskih bolesnika obolelih od TB u Specijalnoj bolnici za plućne bolesti „Budislav Babi“ u Bela Crkva, a čak 24 pacijenta bila su hospitalizovana zbog shizofrenije. Na osnovu pregleda medicinske dokumentacije i podataka dobijenih od odgovornih lekara, utvrđeno je da je većina pacijenata bila hospitalizovana u nekoliko navrata i da su se termini hospitalizacije u velikoj meri preklapali, a da su do 2011. godine mere

prevencije i kontrole nozokomijalne transmisije TB u navedenoj bolnici bile neodgovarajuće. Ovakvi rezultati jasno su pokazali da je ključni oblik transmisije MDR TB u Srbiji nozokomijalna transmisija. Takođe, statistička analiza pokazala je da su jedini faktori rizika za skorašnju, aktivnu transmisiju MDR TB u Srbiji shizofrenija kao komorbiditet i hospitalizacija u bolnici u Beloj Crkvi. Ostali oblici aktivne transmisije MDR TB u Srbiji koji su utvrđeni ovim istraživanjem su male socijalne i porodične epidemije, izazvane različitim genotipovima MDR sojeva MTB, kao i verovatna transmisija MDR sojeva Beijing i Haarlem linija kratkotrajnim kontaktom.

U poslednjem segmentu rezultata istraživanja detaljno je opisana genetička osnova rezistencije MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji na ATL prve i druge linije. U genomima MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji detektovano je ukupno 170 mutacija u 33 gena povezana sa rezistencijom na ATL prve i druge linije, a mutacije najviših učestalosti su S450L *rpoB*, S315T *katG*, Q497R *embB*, K43R *rpsL*, V7G *pncA* i A576T *embA*. Pokazano je da se molekularnim markerima rezistencije na ATL za MDR sojeve MTB izolovane u Srbiji mogu smatrati sledeći geni: *rpoB* za rezistenciju na rifampicin; *katG* za rezistenciju na izonijazid; *rpsL* za rezistenciju na streptomycin; *embB* za rezistenciju na etambutol; *pncA* za rezistenciju na pirazinamid; i *rrs* gen za rezistenciju na amikacin i kapreomicin. Kandidat kao posebno važan izdvaja nalaz da se mutacije *gyrA* gena, inače ključne molekularne determinante rezistencije na fluorohinolone, ne mogu smatrati pouzdanim markerom rezistencije na ove lekove kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji. Detaljno su navedeni i rezultati analize povezanosti između ustanovljenih filogenetskih linija i mutacija u genima odgovornim za rezistenciju na ATL prve i druge linije. Pokazano je da je čak 12 mutacija rezistencije u genomima MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji (P75L i P75S *gidB*; S315T *katG*; S450W *rpoB*; L516P i V431M *rpoC*; P25R *rpoA*; A576T *embA*; Q497R *embB*; V7G *pncA*; V742L *gyrA*; W256\_ *ethA*) udruženo sa pripadnošću u sojeva klasterima, odnosno da ne utiče negativno na sposobnost transmisije MDR sojeva MTK u Srbiji. Kandidat posebno izdvaja rezultate analize prisustva kompenzatornih mutacija u *rpoA* i *rpoC* genima, za koje je ustanovljeno da doprinose sposobnosti transmisije MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji. Na osnovu rezultata analize udruživosti prisustva mutacija u genima rezistencije sa pozitivnim

odnosno negativnim ishodom le enja, pokazano je da su mutacije *gyrA* gena udružene sa negativnim, odnosno neuspešnim i/ili smrtnim ishodom le enja.

Poseban segment ovog istraživanja bio je posvećen analizi evolucije TUR klastera, odnosno lokalnih TUR izolata. Ancestralni TUR soj imao je *katG* S315T, *rpsL* K43R, *embB* Q497R, *embA* A576T i *gyrA* V742L mutacije, odnosno bio je fenotipski rezistentan na izoniazid, streptomycin, etambutol i fluorohinolone, zbog čega je označen kao pre-MDR soj. Rezultati istraživanja pokazuju da je pre-MDR ancestor evoluirao u dve grane, uzastopnim sticanjem multiplih SNP u genima rezistencije i kompenzatornih SNP u *rpoA* odnosno *rpoC* genima. Na osnovu izračunate stope mutacija od  $1,08 \times 10^{-7}$ , procenjeno je da zajednički ancestor sojeva takozvane zelene grane TUR klastera datira iz 1992. godine, dok je zajednički ancestor MDR izolata takozvane crvene grane nastao 2002. godine.

### C. Uporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

Sveobuhvatna molekularno genetička karakterizacija MDR sojeva MTK prisutnih u datoj populaciji predstavlja važan korak u uspostavljanju adekvatnih mera kontrole MDR TB najpre na lokalnom, a posle i na širem regionalnom, pa i na globalnom nivou. U okviru ove doktorske disertacije izvršena je takva analiza u potpuno reprezentativnom uzorku koji je obuhvatio sve MDR sojeve MTK izolovane u Srbiji tokom poslednjih šest godina.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je jedina značajna vrsta MTK koja izaziva TB i MDR TB u Srbiji vrsta *M. tuberculosis*. Kandidat ističe da je ovakav rezultat u potpunosti očekivan, s obzirom da je ova vrsta na globalnom nivou daleko najčešće identifikovana vrsta MTK u uzorcima obolelih od TB i MDR TB (WHO 2014). Iako su kolekcije ispitivanih sojeva MTK uključene u ovo istraživanje bile u potpunosti reprezentativne, kandidat ne isključuje mogućnost sporadičnog pojavljivanja vrsta MTK koje su primarno patogeni životinja, pre svega *M. bovis* i *M. caprae*, kao izazivača TB u Srbiji. Kandidat navodi da *M. bovis*, naročito u ruralnim sredinama, zbog raznovrsnosti životinjskih vrsta koje su mogući rezervoari i dalje predstavlja uzrok sporadičnih slučajeva humane TB (Perez-Lago i sar. 2014), a posebno ističe dokazani slučajevi ove vrste MTK kao izazivača MDR i XDR TB (Samper i Martin 2007; Perez-Lago i sar. 2014). *M. caprae* spada u široko rasprostranjene vrste MTK u Evropi i odgovoran je za 13-31% slučajeva humane TB (Perez-Lago i sar. 2014), a tipično je prisutan

tako e u ruralnim sredinama (Prodinger i sar. 2005). Imaju i u vidu sve navedeno i injenicu da je Srbija ve im delom upravo ruralna zemlja, kandidat smatra da je opravdano o ekivati sporadi no prisustvo ove dve vrste u populaciji naše zemlje, ali isti e da TB kao zoonoza u našoj zemlji nema zna aja.

Od ukupno šest genotipova koji su identifikovani u ispitivanoj kolekciji MDR sojeva MTB, najvišu u estalost ima TUR genotip sa 36,1%. Tako e, svi lokalni XDR sojevi MTB pripadaju TUR liniji. Kandidat isti e da ovako visoka u estalost TUR linije me u MDR sojevima MTB nije zabeležena ni u jednoj studiji do sada, pa ak ni u studijama iz Turske, za koju je TUR filogeografski specifi an i ima najvišu prevalenciju u populaciji sojeva MTB (Kisa i sar. 2012). Pored toga, ni u jednoj studiji do sada nije utvr ena zna ajna povezanost TUR filogenetske linije sa ispitivanim demografskim, epidemiološkim, laboratorijskim i klini kim karakteristikama pacijenata iz ijih uzoraka su izolovani TUR sojevi. Istraživanjem izvedenim u okviru ove doktorske disertacije utvr ena je visoko zna ajna udruženost TUR genotipa i shizofrenije kao komorbiditeta, kao i TUR genotipa i hospitalizacije u Specijalnoj bolnici za plu ne bolesti „Budislav Babi “ Bela Crkva. Kandidat iznosi zanimljivu hipotezu o poreklu TUR linije u Srbiji i pretpostavlja mogu u vezu sa pacijentom iji je MDR izolat MTB imao TUR genotip, a koji je došao iz Bosne i Hercegovine. U pitanju je država koja je kulturološki i migraciono povezana sa Turskom, a pacijent je tokom 2007. godine bio le en u bolnici u Beloj Crkvi. Ukupno 20,3% MDR sojeva MTB iz ispitivane kolekcije klasifikovano je u takozvanu Clade 1 grupu velike evro-ameri ke linije MTB. Kandidat navodi da su Clade 1 grupu genotipova definisali Homolka i saradnici (2012), koji su jasno pokazali visok diverzitet i složenu populacionu strukturu evro-ameri ke linije, što je potvr eno i rezultatima ovog istraživanja MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji. U estalost MDR sojeva MTB Haarlem genotipa u Srbiji (17,6%) odgovara prose noj u estalosti ovog genotipa me u MDR sojevima MTB u Evropi, ija procenjena vrednost iznosi 17,4% (Jagielski i sar. 2010). Imaju i u vidu dokazanu povezanost Haarlem genotipa sa MDR profilom, samo prisustvo MTB sojeva Haarlem genotipa u populaciji u Srbiji, prema mišljenju kandidata, predstavlja ozbiljnu pretnju za održavanje niskih stopa pokazatelja oboljevanja od MDR TB. U pore enju sa velikim brojem evropskih zemalja (Ghebremichael i sar. 2010; Jagielski i sar. 2010; Gavin i sar. 2012; Panaiotov i sar. 2013), proporcija MDR sojeva MTB Beijing linije ustanovljena u

Srbiji (16,7%) znatno je viša. Imaju i u vidu veliki globalni značaj Beijing linije, izraženu sposobnost transmisije u poređenju sa drugim genotipovima, udruženost sa multiplom rezistencijom na ATL, kao i dokumentovano paralelno prisustvo Beijing linije u populacijama imigranata iz Azije i isto ne Evrope i u autohtonim populacijama evropskih država (Parwati i sar. 2010; Hanekom i sar. 2011), kandidat zaključuje da prisustvo MDR sojeva MTB Beijing genotipa u populaciji u Srbiji ima veliki značaj. U studijskoj kolekciji MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji S genotip nije bio zastupljen sa visokom učestalošću (7,4%), ali je ipak u pitanju vrednost koja je iznad prosečne učestalosti izolovanja ovakvih sojeva u Evropi (Bonura i sar. 2014; Ritacco i sar. 2012). Pored toga, kandidat ističe da su MDR izolati MTB S genotipa pet pacijenata grupisani u jedan klaster, što je jasan dokaz da ovaj genotip ipak ima uticaj na aktivnu transmisiju MDR TB u Srbiji. Ural genotip se pojavljuje učestalo kao izazivač MDR TB u Srbiji nalazi na poslednjem mestu, sa samo dva izolata (1,9%) poreklom od dva pacijenta. Oba izolata nalaze se u istom klasteru, a kandidat na osnovu epidemioloških podataka pretpostavlja da je reč o Ural MDR soju MTB importovanom iz Rusije. Tako rezultati ovog istraživanja potvrđuju rezultate prethodnih studija, prema kojima se može očekivati ekspanzija MDR Ural sojeva MTB iz centralne Evroazije i na ostale delove Evrope (Mokrousov 2015).

Proporcija slučajeva MDR TB koji su direktna posledica aktivne, skorašnje transmisije u Srbiji iznosi 40,7%, što je iznenađujuće visoka vrednost s obzirom na to da su vrednosti incidencije i prevalencije MDR TB u Srbiji realno veoma niske. Radi poređenja vrednosti stepena aktivne transmisije u Srbiji i drugim državama sa niskim opterećenjem MDR TB, kandidat navodi Veliku Britaniju u kojoj proporcija slučajeva MDR TB koji su direktna posledica aktivne transmisije iznosi svega 8,5% (Anderson i sar. 2014). Kada se uporede rezultati ovog istraživanja sa rezultatima drugih molekularno epidemioloških studija MDR TB, jasno je da je Srbija u grupi država sa visokim stepenom grupisanja MDR sojeva u klasterne, koji je najbliži vrednostima u Bugarskoj, Češkoj, Letoniji, Litvaniji i Slovačkoj (70%) (De Beer i sar. 2014). Visok procenat MDR sojeva u klasterima na celom se objašnjava održavanjem visokog stepena aktivne transmisije MDR TB tokom dužeg vremenskog perioda u određenoj populaciji (De Beer i sar. 2014), što potvrđuju rezultati i ovog istraživanja. Kandidat ističe da su se, sa izuzetkom Ural klastera koji je detektovan samo u 2013. godini,

svi ostali klasteri održali u populaciji u Srbiji najmanje po tri godine. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je najveći i TUR klaster, odgovoran za više od polovine slučajeva aktivne transmisije MDR TB u Srbiji, kontinuirano prisutan u populaciji najmanje od 2008. do 2014. godine. Kandidat poredi vrednosti grupisanja u klastere ustanovljene u ovoj doktorskoj disertaciji sa rezultatima jedine ranije molekularno epidemiološke studije TB u Srbiji (Vuković i sar. 2003) i zaključuje da za poslednjih 17 godina nisu postignuti značajniji pomaci u poboljšanju kontrole aktivne transmisije MDR TB u našoj zemlji.

Uticaj migracija na aktivnu transmisiju MDR TB u našoj zemlji kandidat, bar za sada, isključuje. Ipak, imajući u vidu novi veliki talas migracija sa Bliskog istoka, koji je Srbiju zahvatio posebno početkom 2015. godine, moguće je očekivati njihov uticaj, kako na vrednosti incidencije i prevalencije MDR TB u Srbiji, tako i na aktivnu transmisiju MDR TB. Kao jedan od ilustrativnih primera uticaja migracija iz država sa visokim stopama MDR TB na status MDR TB u državama sa niskim opterećenjem navedena je Španija (Gavin i sar. 2012). Kao ključnu kontrolnu meru kojom bi se mogao spremiti ovakav scenario kandidat ističe blisku saradnju država u cilju efikasne prevencije širenja MDR TB i kao primer navodi izvanredne rezultate nadzora MDR TB u Evropi, koji sprovodi Evropski centar za kontrolu i prevenciju bolesti (De Beer i sar. 2014). Visoko značajna povezanost TUR genotipa i pripadnosti klasteru pokazana u ovom istraživanju znatno odstupa od rezultata nadzora transmisije MDR i XDR TB u Evropi od 2003. do 2011. godine, prema kojima najveći evropski klaster pripada Beijing genotipu (De Beer i sar. 2014). TUR genotip se, prema saznanjima kandidata, do sada nije dovodio u vezu ni sa MDR profilom rezistencije ni sa aktivnom transmisijom MDR TB. Takođe, nije dokazano da TUR sojevi imaju veću sposobnost transmisije u poređenju sa ostalim linijama MDR, posebno ne u poređenju sa Beijing, LAM i Haarlem linijama kao ključnim za aktivnu transmisiju MDR TB na globalnom nivou (Marais i sar. 2013; Rosas i sar. 2013). U tom smislu, značaj TUR genotipa kao izazivača MDR TB i dokazan veliki uticaj na aktivnu transmisiju MDR TB u Srbiji predstavljaju jedinstven nalaz u svetu. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je, pored hospitalizacije u bolnici u Beloj Crkvi, shizofrenija kao komorbiditet faktor rizika MDR TB. Uticaj shizofrenije na razvoj MDR TB kandidat objašnjava već dokazanim negativnim uticajem hroničnih psihijatrijskih bolesti na sprovođenje lečenja TB (Pacheco i sar. 2013).

Kandidat posebno ukazuje na povezanost shizofrenije, sojeva MTB TUR genotipa i uslova hospitalizacije u Beloj Crkvi koji favorizuju transmisiju upravo TUR MDR sojeva MTB, kao problem koji otvara niz novih pitanja. Istaknuto je da ispitivanje povezanosti navedene tri ključne determinante aktivne transmisije MDR TB u Srbiji prevazilazi okvire ove doktorske disertacije, ali da je u pitanju jedinstvena situacija koja predstavlja povod i osnov za daljnja istraživanja.

Kada je u pitanju fenotipska rezistencija MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji na ATL, kandidat zaključuje da je rezistencija na ATL druge linije relativno visoka, u skladu sa kriterijumima predloženim u studiji Günther i saradnika (2015). Visoka uestalost rezistencije MDR sojeva na ATL druge linije na elno se objašnjava neracionalnom upotrebom ovih lekova u lečenju MDR TB i odsustvom primene individualnih terapijskih režima (Günther i sar. 2015). Visoku uestalost rezistencije na ATL druge linije u Srbiji kandidat objašnjava upravo navedenim faktorima, naglašavaju i dodatnu specifičnost uticaja psihijatrijskih oboljenja u lokalnoj populaciji kao komorbiditeta na neadekvatno sprovođenje režima lečenja TB, što je ključni faktor koji doprinosi razvoju rezistencije. U genomima MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji detektovano je ukupno 170 mutacija u 33 gena povezana sa rezistencijom na ATL prve i druge linije, a ustanovljene mutacije najviših u estalosti tipične su za evropske MDR sojeve MTB (Da Silva i Palomino 2011). Lokalni molekularni markeri rezistencije su upravo oni geni u kojima se najčešće dešavaju mutacije koje dovode do rezistencije na ispitivane ATL prve i druge linije na globalnom nivou (Da Silva i Palomino 2011; Koch i sar. 2014). Kandidat navodi kao važan izuzetak mutacije *gyrA* gena, za koje je pokazano da se ne mogu smatrati pouzdanim markerima rezistencije na fluorohinolone kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji. Ovakav rezultat ograničava primenljivost komercijalno dostupnih molekularnih esejaja za brzo otkrivanje XDR sojeva MTB u našoj zemlji. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da postoji visoko značajna udružena V742L mutacije *gyrA* gena sa TUR genotipom i pripadnošću u klasteru, što znači da V742L ima značajnu ulogu u aktivnoj transmisiji MDR TB u Srbiji. U tom smislu, kandidat pretpostavlja da je neekvivalentno visoka uestalost mutacije V742L u genomima lokalnih MDR sojeva na izvestan način povezana sa njihovom sposobnošću u transmisiji. U prilog ovoj pretpostavci idu rezultati ranijih studija koje su pokazale epistazu između mutacija koje dovode do rezistencije na ATL, posebno mutacija

*gyrA* i *rpoB* gena (Koch i sar. 2014).

Udruženost pojedina nih mutacija rezistencije sa odre enim genotipovima ustanovljena kod MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji sli na je kao kod ostalih evropskih MDR sojeva MTB (Zhang i sar. 2015). U genomima MDR sojeva MTB izolovanih u Srbiji identifikovano je ak 12 mutacija rezistencije koje ne uti u negativno na sposobnost transmisije ovih sojeva. U genomima ve ine (82%) MDR sojeva MTB svrstanih u klastere dokazano je prisustvo važnih kompenzatornih mutacija *rpoA* i *rpoC* gena, a ustanovljena je i zna ajna udruženost ovih mutacija sa TUR, Beijing i Haarlem filogenetskim linijama, što kandidat tuma i kao jasnu potvrdu velike sposobnosti transmisije MDR sojeva MTB prisutnih u Srbiji.

S obzirom da ak 95% svih lokalnih TUR izolata pripada jednom lancu aktivne transmisije, kandidat posebnu pažnju posve uje analizi i razumevanju evolucije TUR klastera. Kandidat iznosi pretpostavku zasnovanu na originalnim rezultatima ovog istraživanja i smatra da je TUR klaster nastao pozitivnom selekcijom mutacija rezistencije, do koje je najverovatnije došlo usled neracionalne primene ATL u Srbiji pre oko 20 godina, kao i selekcijom kompenzatornih mutacija. Kandidat isti e da je ova hipoteza u skladu sa istorijskim kontekstom odnosno teškom situacijom u Srbiji u tom periodu koja je sigurno uticala na sprovo enje složenih režima le enja TB. Kod pacijenata sa shizofrenijom kao komorbiditetom, u genomima sojeva MTB došlo je do dodatne pozitivne selekcije mutacija rezistencije usled neuspešnog sprovo enja terapije TB, a hospitalizacija u neadekvatnim uslovima doprinela je širenju MDR MTB mutanata.

Rezultati ovog istraživanja, pre svega izuzetno visok stepen aktivne transmisije MDR sojeva MTB i predominacija intrahospitalne transmisije kao najvažniji ustanovljeni pokazatelji statusa MDR TB u Srbiji, jasno ukazuju na suboptimalnu kontrolu transmisije MDR TB u našoj zemlji, posebno u vulnerabilnim kategorijama populacije, i potrebu za uvo enjem mera za adekvatnu kontrolu transmisije ove veoma teške infektivne bolesti.

#### **D. Objavljeni radovi koji ine deo doktorske disertacije**

1. **Živanovi I**, Vukovi D, Daki I, Stefanovi G, Savi B. Detection of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by the GenoType MTBDR<sub>sl</sub> assay in Serbia. Arch Biol Sci 2012;64:1311-18.

2. **Živanovi I**, Vukovi D, Daki I, Savi B. Species of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria identified in respiratory specimens from Serbia. Arch Biol Sci 2014;66:553-61.

#### **E. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa disertacije)**

Doktorska disertacija pod naslovom „**Vrste, filogenetske karakteristike i genetička osnova rezistencije multirezistentnih sojeva *Mycobacterium tuberculosis* kompleksa izolovanih u Srbiji**“ dr Irene Aranđelović predstavlja izuzetan i originalan naučni doprinos u ispitivanju i razumevanju značajke, filogeografske strukture i rezistencije MDR sojeva MTB izolovanih u našoj zemlji. Rezultati istraživanja svakako predstavljaju novinu, jer je po prvi put izvršena sveobuhvatna molekularno genetička karakterizacija reprezentativne kolekcije koja je obuhvatila sve MDR sojeve MTK izolovane u Srbiji tokom perioda od šest godina. Posebno treba istaći i prvo uspešno izvedeno sekvenciranje genoma lokalnih MDR sojeva MTK. Svi segmenti ove doktorske disertacije odlično su usklađeni sa postavljenim ciljevima istraživanja, koji su dobro formulisani i veoma aktuelni u naučnom smislu. Dobro osmišljen i složen dizajn naučnog istraživanja omogućio je specijaciju lokalnih MDR sojeva MTK, utvrđivanje i analizu njihovih filogenetskih karakteristika i sagledavanje kompletne genetičke osnove rezistencije na ATB prve i druge linije. U smislu naučnog doprinosa, ovim istraživanjem dobijen je veliki broj novih saznanja, a posebno se izdvajaju rezultati vezani za značajku i ekstremnu sposobnost transmisije TUR genotipa evro-američke linije MTB kao izazivača MDR TB u Srbiji.

Sumirano, rezultati ove doktorske disertacije doneli su niz novih saznanja značajnih za uspostavljanje uspešne kontrole širenja MDR TB u našoj zemlji. Rezultati ove disertacije otvaraju i nove oblasti daljeg naučnog istraživanja. Ustanovljena specifična asocijacija između MDR sojeva MTB TUR filogenetske linije, shizofrenije kao komorbiditeta i hospitalizacije u bolnici u Beloj Crkvi predstavlja osnov za dalje proučavanje uzročno-posledičnog odnosa triklonih determinante statusa MDR TB u Srbiji.

## **F. Predlog Komisije za ocenu završene doktorske disertacije**

Doktorska disertacija pod nazlovom „**Vrste, filogenetske karakteristike i geneti ka osnova rezistencije multirezistentnih sojeva *Mycobacterium tuberculosis* kompleksa izolovanih u Srbiji**“, kandidata dr Irene Aran elovi , po svom sadržaju i formi, dobro napisanom uvodnom delu, jasno postavljenim i aktuelnim ciljevima istraživanja, dobro osmišljenoj metodologiji, jasno iznetim obimnim rezultatima, razložnoj i nau no originalnoj diskusiji, kao i dobro formulisanim zaključcima ispunjava sve kriterijume odlično napisanog nau nog rada. Stoga, Komisija sa zadovoljstvom predlaže Nau nom ve u Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju pod naslovom „**Vrste, filogenetske karakteristike i geneti ka osnova rezistencije multirezistentnih sojeva *Mycobacterium tuberculosis* kompleksa izolovanih u Srbiji**“, kandidata dr Irene Aran elovi , i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 05.09.2015.

### **Mentor:**

prof. dr Dragana Vukovi , vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

---

### **Članovi Komisije:**

prof. dr Ivana Daki , vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

---

prof. dr Vesna Škodri -Trifunovi , vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

---

prof. dr Branislava Savi , redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

---

prof. dr Dejan Krnjai , vanredni profesor Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

---

prof. dr Lidija Risti , redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu

---