

Оцену готове докторске тезе,
доставаља.-

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА ВМА
УНИВЕРЗИТЕТА ОДБРАНЕ**

На 36. седници Наставно-научног већа Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду одржаној 28.01.2016. године, одлуком бр. 17/36 одређени смо у комисију за оцену готове докторске тезе ГЛ мр сц. мед. Љиљане Петровић-Јеремић из Завода за јавно здравље „Поморавље“ Ћуприја, под насловом „Доказивање и молекуларна карактеризација *Staphylococcus aureus* резистентних на метицилин“.

Након темељног проучавања готове докторске тезе и увидом у научни и стручни рад докторанта, комисија у саставу: пк доц. др Срђан Лазић (Медицински факултет ВМА УО) – председник комисије, ВС научни саветник др сц. мед. Зорица Лепшановић (Медицински факултет ВМА УО) – ментор и члан комисије, доц. др Ивана Ћирковић (Медицински факултет Универзитета у Београду) – члан комисије, подноси Наставно-научном већу МФ ВМА УО следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСKE ТЕЗЕ

Докторски рад мр сц. мед. Љиљане Петровић-Јеремић написан је на 102 стране текста и подељен је на следећа поглавља: УВОД (33 стране), ХИПОТЕЗА И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА (1 страна), МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ (17 страна), РЕЗУЛТАТИ (17 страна), ДИСКУСИЈА (13 страна), ЗАКЉУЧЦИ (2 стране) и ЛИТЕРАТУРА (19 страна). Резултати су илустровани са укупно 15 табела и 16 слика. У раду је цитирано 150 литературних података. Рад по својој структури има све елементе докторског рада.

Истраживање у докторском раду припада областима микробиологије и молекуларне епидемиологије и односи се на испитивање фенотипских и генотипских карактеристика метицилин резистентних *Staphylococcus aureus* изолованих из узорака који потичу из болничке средине и од здравих људи.

2. ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

У поглављу УВОД докторант кроз 13 подналова даје опширан преглед досадашњих сазнања о значају, патогенези и заступљености инфекција које изазива метицилин резистентан *S. aureus*, о епидемиологији, грађи, култивисању, геному и његовој резистенцији на антибиотике.

S. aureus је значајан узрочник ванболничких инфекција и један од најчешћих узрочника болничке бактеријемије. Растућа резистенција *S. aureus* на антибиотике представља велики проблем лекару клиничару у свакодневној пракси, а посебно у случају тешких инфекција које угрожавају живот болесника (сепса, менингитис).

S. aureus резистентан на метицилин (MRSA) први пут је изолован 1961. године у болници у Енглеској, само две године по увођењу метицилина у терапију стафилококних инфекција. Током следећих година MRSA се проширио по болницама других европских држава, а затим и по целом свету. Почетком двехиљадитих година, његова преваленца у европским државама је била од 1 до 45%, у САД 32%, а у неким азијским државама (Тајван, Кина, Јапан, Јужна Кореја) 70-80%. Како се јављао углавном у болничкој средини, другим здравственим установама или код пацијената који су чешће боравили у тим срединама, овај узрочник је добио назив болнички MRSA (healthcare-associated MRSA, HA-MRSA). Поред тога што је изазивао инфекције у, иначе тешко оболелих пацијената, HA-MRSA је показивао све већи степен резистенције на друге класе антибиотика. Међутим, од средине деведесетих година дошло је до наглог повећања броја MRSA инфекција међу особама које нису имале факторе ризика за боравак у здравственим установама. Узрочници ових инфекција названи су ванболнички MRSA (community-associated MRSA, CA-MRSA), а за разлику од HA-MRSA, јављали су се чешће у млађој популацији, изазивали другачије клиничке синдроме (од инфекција коже и меких ткива до веома тешких инфекција као што су целулитис, некротизирајући фасциитис, сепса, некротизирајућа пнеумонија), били мање резистентни на не-бета-лактамске антибиотике и продуковали друге факторе вируленције (Panton-Valentine leukocidin, PVL).

Ген одговоран за резистенцију на метицилин, *mecA* ген, идентификован је тек двадесет година након појаве MRSA. Он се налази на мобилном генетичком елементу који се назива стафилококна хромозомска касета *mec* (SCC*mec*-staphylococcal chromosomal cassette *mec*). Ген *mecA* кодира пеницилин везујући протеин 2a (PBP 2a - penicillin binding protein 2a) који је структурно различит од PBP 2 из метицилин осетљивих сојева, па се за њега не могу везати бета-лактамски антибиотици. То има за последицу непрекинуту синтезу ћелијског зида бактерије и резистенцију на бета-лактаме. Молекуларном анализом генома до сада је утврђено пет најважнијих типова SCC*mec* региона. Показано је да CA-MRSA сојева карактерише присуство SCC*mec* типа IV и V. Код CA-MRSA сојева детектован је и ген који кодира PVL, токсин значајан у патогенези инфекција коже и меких ткива, и у тешкој, некротизирајућој пнеумонији. У одређеним регионима света (САД) нађена је повезаност између присуства SCC*mec* типа IV и гена који кодира PVL.

HA-MRSA изолате карактеришу SCC $_{mec}$ типови I до III, који садрже гене за резистенцију не само на бета-лактамске, већ и на друге класе антибиотике.

Недавна испитивања упућују на то да су CA-MRSA сојеви, посебно они који садрже PVL ген и TSST1 (Toxic Shock Syndrom Toxin1) ген све чешће одговорни за инфекције и у болницама. Иако Центар за контролу и превенцију инфективних болести (CDC, Center for Disease Control and Prevention) јасно дефинише и разликује CA-MRSA и HA-MRSA, током година коеволуције, као и под селективним притиском антибиотика како у болничкој, тако и у ванболничкој средини, сојеви CA-MRSA су попримили гене за резистенцију на не-бета-лактамске антибиотике, па су разлике између њих и HA-MRSA постајале све мање. То је довело до забуне у класификацији, јер ове две групе MRSA више није било могуће разликовати на основу наведених критеријума. CA-MRSA и HA-MRSA се данас могу идентификовати и међусобно разликовати само применом молекуларних метода.

Вођена уоченим проблемом, а на основу расположивих литературних података и свог претходног искуства у овој области, кандидаткиња формулише следећу радну хипотезу:

Међу MRSA изолатима из хоспитализованих пацијената присутни су SCC $_{mec}$ типови IV и V који су карактеристични за CA-MRSA изолате и чешће су заступљени од SCC $_{mec}$ типова I, II и III, карактеристичних за HA-MRSA.

Ради провере ове радне хипотезе, одређени су следећи ЦИЉЕВИ истраживања

1. Иоловати и идентификовати *S. aureus* из узорака који потичу од хоспитализованих пацијената и од клицоноша;
2. Испитати осетљивост на метицилин изолата *S. aureus* стандардним методама;
3. Код свих изолата *S. aureus* који су фенотипски резистентни на метицилин, утврдити присуство *mecA* гена PCR методом;
4. Код изолата MRSA испитати осетљивост на друге групе антибиотика;
5. Извршити SCC $_{mec}$ типизацију изолата MRSA PCR методом;
6. Утврдити учесталост генотипова SCC $_{mec}$ тип IV и SCC $_{mec}$ тип V међу изолатима MRSA који потичу од хоспитализованих пацијената и од клицоноша;
7. Утврдити да ли постоји статистички значајна разлика у присуству генотипова SCC $_{mec}$ тип IV и SCC $_{mec}$ тип V између изолата MRSA. који потичу од хоспитализованих пацијената и од клицоноша;

8. Утврдити да ли постоји статистички значајна разлика у присуству резистенције на друге групе антибиотике између СА-MRSA и НА-MRSA.

У поглављу МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ кандидаткиња је јасно и детаљно представила дизајн и методологију истраживања. Истраживање је дизајнирано и спроведено као проспективна аналитичка студија, а одобрено је од стране Етичког одбора ВМА. У току двогодишњег периода, од 1.01.2011. до 31.12.2012. године, са различитих одељења Опште болнице у Ћуприји, у Лабораторији за клиничку микробиологију Завода за јавно здравље у Ћуприји, идентификовано је 168 болничких изолата *S. aureus* од којих је 77 било резистентно на метицилин, а за испитивање у овом раду је одабрано 50 изолата. У истом периоду, у Лабораторију за клиничку микробиологију Завода за јавно здравље у Ћуприји, пристигло је 52910 брисева грла и носа из читавог Поморавског округа, пореклом од здравих, радно способних људи од 16 до 60 година, који због природе посла подлежу здравственом надзору. Од укупно 52 изолата MRSA, 50 је коришћено за даља истраживања.

Све фенотипске анализе рађене су у Лабораторији за клиничку микробиологију Завода за јавно здравље у Ћуприји, а генотипске анализе у Лабораторији за молекуларну генетику Института за епидемиологију Сектора за превентивну медицину ВМА.

Током истраживања коришћене су комерцијалне, спремне за употребу, хранљиве подлоге као што су CHROM ID *S. aureus* агар (SAID) и CHROM ID MRSA агар (*bioMérieux, Marcy l'Etoile, France*), као и хранљиве подлоге (Торлак, Србија) справљене у Заводу за јавно здравље у Ћуприји. Резистенција на метицилин изолата *S. aureus* испитана је диск-дифузионом (ДД) методом помоћу диска са цефокситином (30µg) (Bionalyse, Ankara, Turska), а потврђена Е тестом за цефокситин, тестом за продукцију PBP2a (SlidexMRSA Detection) и детекцијом *mecA* гена PCR методом (прајмери Invitrogen, SAD). ДД метода примењена је и за испитивање осетљивости MRSA изолата на друге групе антибиотика. За генотипску карактеризацију MRSA (детекцију *pvl* гена и одређивање типа SCC*mec* региона) коришћена је PCR метода (прајмери Invitrogen, SAD).

За израчунавање статистички значајне разлике коришћени су тестови значајности разлика: Хи-квадрат тест са и без Јатесове корекције и Фишеров егзактни тест, а вредност $p < 0,05$ сматрана је за значајну.

На основу добијених резултата кандидаткиња је ЗАКЉУЧИЛА да је радна хипотеза потврђена јер резултати показују да:

1. Применом класичних и молекуларних метода за идентификацију MRSA, код свих изолата код којих је резистенција на метицилин доказана ДД методом, потврђена је и применом Е теста за цефокситин, хром агара за MRSA, теста за продукцију PBP2a и PCR детекцијом *mecA* гена.
2. Учесталост MRSA међу изолатима *S. aureus* из пацијената ћупријске болнице износила је 45,8%, док је међу здравим људима учесталост била 3,8%.

3. Осим на бета-лактаме, изолати MRSA били су резистентни и на друге групе антибиотика. Статистички значајна разлика постојала је само код два антибиотика: на ципрофлоксацин је било резистентно 62% изолата из пацијената и 30% из здравих људи, а на SXT 32% из пацијената и 12% из здравих људи.

4. Сви MRSA изолати из хоспитализованих пацијената били су резистентни на барем један не-бета-лактамски антибиотик, а 52% изолата је било мултирезистентно. Код MRSA изолованих из здравих људи, 16% изолата је било осетљиво на све не-бета-лактамске антибиотике, а 40% изолата мултирезистентно.

5. SCCmec типизацијом показано је да су код MRSA изолата из хоспитализованих пацијената, SCCmec типови карактеристични за HA-MRSA били присутни код 12 (24%) изолата, а преосталих 38 (76%) изолата садржали су SCCmec типове карактеристичне за CA-MRSA: три (6%) изолата тип IV и 35 (70%) изолата тип V. Код MRSA изолованих из здравих људи CA-MRSA генотипови су нађени код 40 (80%) изолата, што указује да су они подједнако били заступљени и у болничкој и у ванболничкој средини.

6. Најзаступљенији генотип, а тиме и најуспешнији клон, био је CA-MRSA SCCmec тип V. Његова већа преваленца међу хоспитализованим пацијентима у односу на здраве особе (70% према 54%) може да укаже на интрахоспитално преношење на барем неким одељењима болнице.

7. Заступљеност мултирезистентних изолата код HA-MRSA и CA-MRSA била је следећа:

У групи хоспитализованих пацијената 50% генотипски потврђених HA-MRSA изолата и 53% CA-MRSA изолата били су мултирезистентни. У групи здравих људи, исти проценат (37,5%) мултирезистентних сојева је било и код HA-MRSA и код CA-MRSA. Слична заступљеност HA- и CA-MRSA генотипова у одређеном окружењу указује да је селективни притисак антибиотика водећи фактор који доводи до резистенције на антибиотике.

Свих осам изолата осетљивих на све не-бета-лактамске антибиотике садржали су SCCmec типове карактеристичне за CA-MRSA.

8. Гени за PVL су детектовани код само два (4%) изолата из здравих људи и оба су садржала SCCmec типове карактеристичне за CA-MRSA.

9. Висока преваленца CA-MRSA и висок ниво резистенције код изолата MRSA из болнице и из здравих људи, указује да је овај патоген присутан у региону Поморавље већ више година.

3. ОЦЕНА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

У поглављу ДИСКУСИЈА докторант коректно, садржајно и критички сагледава добијене резултате и пореди их са резултатима домаћих и страних аутора. Аргументовано објашњава разлике између својих резултата и оних из сличних

истраживања. Резултати су коментарисани стручно и садржајно, што указује да кандидаткиња влада материјом из области којој припада тема докторске тезе. Већина студија цитираних у овом раду на сличан начин описује проблем мултирезистенције MRSA и ширење CA-MRSA генотипова у болничкој средини, али је посебна вредност овог истраживања што је урађена карактеризација и упоређени изолати MRSA из хоспитализованих пацијената и од здравих, радно способних људи који носе MRSA без знакова инфекције.

Применом молекуларних метода у карактеризацији MRSA изолати у овом раду, добијени су бројни корисни подаци о присуству и распрострањању овог патогена у Поморавском округу и болници у Ћуприји. Висока преваленца CA-MRSA и високи проценат резистенције на друге групе антистафилококних антибиотика, како међу болничким, тако и међу ванболничким изолатима MRSA, указују да је овај патоген присутан у региону Поморавље већ више година. CA-MRSA се прилагодио на болничку средину, стекао гене за резистенцију на више антибиотика, а да му се при томе није смањила адаптивна вредност, и постао је дупло чешћи у болницама него HA-MRSA. Резултати који указују на клонално ширење CA-MRSA SCCmec тип V на барем неким одељењима болнице у Ћуприји, су од велике важности за предлагање мера за спречавање ширења овог патогена како у болничкој, тако и ванболничкој средини и потенцирају значај примене молекуларних метода за брзу детекцију и типизацију MRSA. Поред тога, резултати овога рада доприносе разумевању механизма који утичу на високи ниво резистенције код CA-MRSA и HA-MRSA и указују да селективни притисак антибиотика има водећу улогу у ширењу резистенције и мултирезистенције.

Из резултата дисертације произашла су два рада, која су објављена у часописима категорије M23:

1. **Petrović-Jeremić Lj**, Kuljić Kapuljica N, Ristanović E, Josić D, Lepšanović Z. Prevalence of Panton-Valentin leukocidin genes in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the District of Pomoravlje. *Vojnosanit Pregl* 2016; Online First January (00):3-3.
2. Lepšanović Z, **Petrović-Jeremić Lj**, Lazić S, Ćirković I. High prevalence and resistance patterns of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Pomoravlje region, Serbia. *Prihvaćen za štampu u Acta Microbiol Immunol Hung.*

Дисертација је реализована у оквиру пројекта Министарства одбране, број МФВМА/2/13-15, чији је назив: „Молекуларна анализа генома мултирезистентних патогених сојева бактерија“, а руководилац ВС научни саветник др сц. мед. Зорица Лепшановић.

4. ОБЈАВЉЕНИ НАУЧНИ РАДОВИ КАНДИДАТА

Petrović-Jeremić Lj. Mesto i uloga Kliničke mikrobiologije Okružnih zavoda u zdravstvenoj zaštiti. Pons 2004;0(1): 33-37.

Petrović-Jeremić Lj, Kuljić Kapulica N, Mirović V, Kocić B. Mehanizmi rezistencije *Staphylococcus aureus* na meticilin. Vojnosanit Pregl 2008;65(5):377-383.

Petrović-Jeremić Lj. Osetljivost meticilin rezistentnih sojeva *Staphylococcus aureus* u bolničkoj i vanbolničkoj sredini na druge grupe antibiotika. Pons 2009;16:18-27

Petrović-Jeremić Lj. Učestalost meticilin rezistentnih *Staphylococcus aureus* (MRSA) sojeva kod zdravih kliconoša u Pomoravskom okrugu. Acta medica medianae 2010;49(1):33-37.

Lepšanović Z, **Petrović-Jeremić Lj.** Typing of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. V Congress of the Serbian Genetic Society, Book of abstracts, 28 September-02 October 2014, Kladovo (Belgrade), Serbia, p. 208.

Petrović-Jeremić Lj, Kuljić Kapuljica N, Ristanović E, Josić D, Lepšanović Z. Prevalence of Panton-Valentin leukocidin genes in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the District of Pomoravlje. Vojnosanit Pregl 2016; Online First January (00):3-3.

Lepšanović Z, **Petrović-Jeremić Lj,** Lazić S, Ćirković I. High prevalence and resistance patterns of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Pomoravlje region, Serbia. Prihvaćen za štampu u Acta Microbiol Immunol Hung.

5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

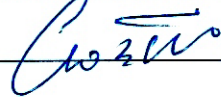
Кандидаткиња ГЛ мр сц. мед. Љиљане Петровић-Јеремић испуњава све услове дефинисане одлуком Наставно-научног већа бр. 6/488 од 25.10.2007. године. Докторска теза под насловом „ДОКАЗИВАЊЕ И МОЛЕКУЛАРНА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА *Staphylococcus aureus* РЕЗИСТЕНТНИХ НА МЕТИЦИЛИН“ представља оригинални научни рад из области микробиологије и молекуларне епидемиологије. Истраживање је спроведено по свим начелима научно-истраживачког рада. Теза је написана јасно, систематично, студиозно и целовито. Добијени резултати доприносе сазнањима о присуству и распрострањању СА-MRSA у болничкој и ванболничкој средини, начину ширења и значају примене молекуларних метода за брзу идентификацију и типизацију, а тиме и спречавање ширења овог патогена. На основу изнетог, чланови Комисије једногласно закључују да докторска теза ГЛ мр сц. мед. Љиљане Петровић-Јеремић испуњава све предвиђене критеријуме које академска пракса захтева, и као таква представља

значајан допринос проучавању дате проблематике. С обзиром да кандидаткиња испуњава све законом предвиђене услове за одбрану тезе, Комисија са највећим задовољством предлаже Наставно-научном већу Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду да овај рад прихвати као завршену докторску тезу и омогући њену јавну одбрану.

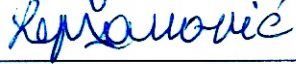
У Београду, 17.02.2016. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. Пк доц. др Срђан Лазић



2. ВС научни саветник др сц. мед. Зорица Лепшановић



3. Доц. др Ивана Ћирковић

