

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На IX редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 13.07.2016. године, прихваћен је извештај ментора проф. др Јелене Лозо, о урађеној докторској дисертацији Наова-е Маді, асистента на Факултету Медицинске технологије, Универзитета 7. октобар Мисурата, Мисурата, Либија, под насловом “Генотипизација, резистенција на антибиотици и формирање биофилма клиничких изолата *Stenotrophomonas maltophilia* из Србије“ (eng. „*Genotyping, antibiotic resistance and biofilm formation of Stenotrophomonas maltophilia clinical isolates from Serbia*”), и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу проф. др Јелена Лозо, ванредни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду; проф. др Бранко Јовчић, ванредни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду и др. Милан Којић, научни саветник, Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитета у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Наова-е Маді под насловом “Генотипизација, резистенција на антибиотици и формирање биофилма клиничких изолата *Stenotrophomonas maltophilia* из Србије“ (eng. „*Genotyping, antibiotic resistance and biofilm formation of Stenotrophomonas maltophilia clinical isolates from Serbia*”), написана је на енглеском језику, на 87 страна, и подељена у 7 поглавља: **Увод** (25 страна), **Циљ рада** (3 стране), **Материјал и методе** (18 страна), **Резултати** (15 страна), **Дискусија** (10 страна), **Закључци** (3 стране) и **Литература** (13 страна). Рад садржи 134 литературни цитат, 9 слика, 10 табела, садржај и резиме на српском и енглеском језику. Након списка литературе, наведена је биографија кандидата, а потом и потписана изјава о ауторству, потписана изјава да су обе верзије, штампана и електронска, истоветне, и на крају потписана изјава којом се овлашћује Универзитетска библиотека „Светозар Марковић“ да дисертацију чува у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду (5 страна).

Анализа докторске дисертације:

Увод докторске дисертације садржи сажет приказ досадашњих сазнања из литературе која су непосредно везана за предмет дисертације. Почиње поглављем које описује промене у идентификацији и класификацији *Stenotrophomonas maltophilia* која се мењала више пута захваљујући развоју нових техника које се примењују у идентификацији. Кандидат је детаљно набројала и описала молекуларно биолошке технике које су кључне за финалну

идентификацију и генотипизацију бактерија рода *Stenotropomonas*. У поглављу „Клинички значај *S. maltophilia*“ описан је пут ове бактеријске врсте од ендофитског соја који се користи у биолошкој контроли до опортунистичког болничког патогена како је окарактерисан почетком осамдесетих година прошлог века и његова урођена резистенција на антибиотике. У оквиру поглавља „Молекуларни механизми укључени у патогенезу изазвану *S. maltophilia*“ описани су различити вирулентни фактори који чине патогени потенцијал ове врсте са посебним освртом на способност формирања биофилма. Поглаве „Цистична фиброза“ описује болест и потенцијалну улогу односно везу *S. maltophilia* и цистичне фиброзе.

У делу **Циљ** рада наведени су научни циљеви докторске дисертације. Циљеви ове докторске дисертације су молекуларна идентификација и генотипизација колекције клиничких изолата *Stenotropomonas maltophilia* добијених из „Института за здравствену заштиту мајке и детета „др Вукан Чупић“ и на тај начин утврди постојање потенцијално клоналног ширења инфекције. Такође, циљ је био установити антибиотску резистенцију колекције клиничких изолата као и постојање одговарајућих фактора вируленције који су одговорни за развиће болести и лош прогностички извештај посебно код имунокомпромитованих пацијената. Од вирулентних фактора посебно је анализирана способност формирања биофилма као и различити фактори који утичу на формирање и разградњу већ формираног биофилма.

У поглављу **Материјал и методе** наведене су хемикалије и апаратуре које су коришћене у раду, дат је списак клиничких изолата са детаљима везаним за место, време изолације и да ли су пореклом из пацијената са цистичном фиброзом или не, као и све експерименталне методе примењене у овом раду. Детаљно је објашњен начин обраде резултата и утврђивање њихове међусобне корелације.

У поглављу **Резултати** прво су изложени резултати молекуларне идентификације и генотипизације који су прво потврдили да добијени изолати припадају врсти *Stenotropomonas maltophilia*, а након завршене генотипизације показано је да изолати имају низак степен међусобне сродности што говори у прилог чињеници да није дошло до клоналног ширења инфекције у болничким условима. Такође обрадом резултата и конструкцијом дендрограма изолати су сврстани у 11 кластера и по један представник је одабаран за даљу анализу методом типизација секвенцирањем више локуса (MLST). MLST анализом је утврђено постојање шест нових и три претходно детектована типа секвенце. Међутим, најчешће присутни типови секвенце у Европи нису детектовани у нашој колекцији. У даљем раду, анализирана је резистенција на одабране антибиотике клиничких сојева *S. maltophilia* и то методом диск дифузије анализиран је хлорамфеникол, тетрациклин, цiproфлоксацин и левофлоксацин, а микродилуционом методом анализиран је триметоприм сулфаметаксазол. Сви анализирани сојеви су били сензитивни на све тестиране антибиотике. Следећа група експеримената се односила на анализу вирулентних фактора код ове колекције клиничких изолата. Прво су анализиране површинске карактеристике и резултати су показали да сви сојеви осим једног имају слабо хидрофобну површину. Такође, код свих сојева је детектована покретљивост пливањем, док ниједан није показивао друге типове покретљивости. Међу сојевима који су показали способност адхезије на муцин није уочена разлика између изолата изолатифаних из пацијената оболелих од цистичне фиброзе (ЦФ) и оних који су имали нека друга оболења (нЦФ). Већина изолата је показала способност формирања биофилма (89,8%) и то подједнако заступљени су били представници ЦФ и нЦФ групе. Анализом формирања биофилма у различитим условима раста показано је да промена температуре и

pH најјаче утиче на формирање биофилма и то готово идентично на ЦФ и нЦФ сојеве. Применом триметоприм сулфометаксазола у концентрацији од 50 µg/ml долазило је до потпуне разградње 24 сата старог биофилма, док је приликом примене 25 µg/ml тај ефекат био завистан од соја. Код сојева који су формирали јак биофилм уочена је спорија кинетика формирања биофилма код ЦФ у односу на нЦФ сојеве. Шејкирање није утицало на формирање биофилма. Показана је позитивна корелација између покретљивости, формирања биофилма и адхезије за муцин. Осим тога, позитивна корелација је показана између покретљивости и јачине формираног биофилма. Међутим, поређењем фенотипских карактеристика ЦФ и нЦФ клиничких изолата уочава се да постоје разлике разлике између ове две групе сојева, али не и ЦФ фенотип.

У поглављу **Дискусија** дата је упоредна анализа оригиналних резултата ове докторске дисертације и података из литературе, која указује на значај постигнутих резултата. Први део дискусије се односи на значај који је овај опортунистички патоген добио у широј научној заједници а у вези са ширењем резистенције на антибиотике и његовом способношћу да ту резистенцију прима и преноси како на Грам-негативне тако и на Грам-позитивне бактерије. Генотипизација колекције клиничких изолата је потврдила оно што је показано и у бројним ранијим студијама да је генетичка сродност међу изолатима мала, да није у питању болничка инфекција као и да је највероватнији пут ових бактерија из спољашње средине у болницу ишао преко пацијената. Детектовање шест нових типова секвенце, али не и најчешће присутних у Европи је највероватније последица велике пластичности бактеријских генома и њихове адаптације на услове средине у којима се налазе. С друге стране селективни притисак у одређеним болничким условима доводи до селекције оних типова секвенци који су на те услове најбоље адаптирани. Висока осетљивост свих бактерија у колекцији на све тестиране антибиотике је изузетан резултата с обзиром да је све више радова који говоре о резистенцији *S. maltophilia* на триметоприм сулфометаксазол који је иначе антибиотик избора за третирање ове бактерије. Даље се дискутују резултати добијени у анализи различитих вирулентних фактора ових сојева са посебним освртом на биофилм. Већина изолата је показала способност формирања биофилма, који као посебан облик бактеријске заједнице представља велики проблем када је у питању његово третирање антимикуробним агенсима. За разлику од претходних студија овде је показано да нЦФ изолати имају већи потенцијал за формирањем биофилма од ЦФ изолата. Такође и постојање позитивне корелације између покретљивости, адхезије за муцин и формирања биофилма. Као и чињеница да су температура и промена pH фактори који најјаче утичу на формирање биофилма. Иако је у претходно доступној литератури постојала хипотеза о постојању „ЦФ фенотипа“ код ових бактерија ова теза то не потврђује.

У поглављу **Закључци** сажето и јасно су изнети најважнији закључци до којих се дошло анализирањем добијених експерименталних података. Закључци се могу сумирати на следећи начин: Генотипизација применом PFGE методе је показала да међу изолатима постоји велика генетичка хетерогеност. MLST анализом је утврђено постојање шест нових и три претходно детектована типа секвенце. Сојеви су били сензитиви на све теститране антимикуробне агенсе. Анализа површинских карактеристика је показала да сви сојеви осим једног имају слабо хидрофобну површину. Такође, код свих сојева је детектована покретљивост пливањем, док ниједан није показивао друге типове покретљивости. Међу сојевима који су показали способност адхезије на муцин није уочена разлика између ЦФ и нЦФ изолата. Осим девет сојева сви остали анализирани изолати, 79 су имали способност формирања биофилма и то нЦФ изолати су показали већи потенцијал за формирањем биофилма од ЦФ изолата. Такође, показана је позитивна корелација између

покретљивости, адхезије за муцин и формирања биофилма. Од анализираних фактора, највећи утицај на формирање бифилма показала је промена температуре и рН. Иако су уочене разлике између фенотипских карактеристика ЦФ и нЦФ изолата не можемо говорити о постојању „ЦФ фенотипа“.

У поглављу **Литература** дата је листа коју чини 134 библиографске јединице. Наведене научне публикације се односе на области које су од значаја за урађену дисертацију и цитиране су на начин који објашњава и потврђује добијене резултате.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **M21 Madi, H.**, Lukić, J., Vasiljević, Z., Biočanin, M., Kojić, M., Jovčić, B., Lozo, J. (2016) Genotypic and phenotypic characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* strains from a pediatric tertiary care hospital in Serbia. PloS ONE 11(10): e0165660. doi:10.1371/journal.pone.0165660
2. **M23 Biočanin M, Madi H, Vasiljević Z, Kojić M, Jovčić B, Lozo J.** (2017) Temperature, pH and trimethoprim–sulfamethoxazole are potent inhibitors of biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. Polish Journal of Microbiology, accepted for publication.

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Lozo J., **Madi H**, Jovcic B, Vasiljevic Z, Kojic M. (2014) Genotyping of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates from a tertiary care pediatric hospital. 5th Congress of Macedonian microbiologists with international participation, Ohrid, Macedonia, Book of Abstracts and Programme, A.44, p.116.
2. **Madi, H.**, Jovčić, B., Vasiljević, Z., Kojić, M., Lozo, J. (2015) Influence of different factors on biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. 9th Balkan Congress of Microbiology, Microbiologia balkanica 2015, Thessaloniki, Greece, Abstract book, Acta Microbiologia Hellenica, 60(3): 151, O.9.

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. Lozo, J., Kerkez, I., **Madi, H.**, Jovčić, B., Vasiljević, Z., Kojić, M. (2014) Antibiotic resistance of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates from a tertiary care pediatric hospital in Belgrade, Serbia. V Congress of the Serbian Genetic Society, Kladovo, Serbia, Book of Abstracts, 209.

Мишљење и предлог Комисије:

Докторска дисертација кандидата **Haowa Madi**, под насловом “**Генотипизација, резистенција на антибиотици и формирање биофилма клиничких изолата *Stenotrophomonas maltophilia* из Србије**“ (eng. „*Genotyping, antibiotic resistance and biofilm formation of Stenotrophomonas maltophilia clinical isolates from Serbia*“) представља научни рад са јасно формулисаним циљевима заснованим на добром познавању научне проблематике, са добро планираним и успешно реализованим истраживачким поступком чији резултати представљају оригинални научни допринос разумевању епидемиологије, биолошке и молекуларне варијабилности клиничких изолата *Stenotrophomonas maltophilia* услед неопходности правовремене идентификације и карактеризације овог опортунистичког патогеног соја у циљу развијања адекватних мера третмана и контроле. Поред тога, резултати ове докторске дисертације доприносе бољем разумевању специфичних карактеристика сојева изолованих из пацијената оболелих од цистичне фиброзе, а у циљу расветљавања улоге овог соја у развоју болести. У изради дисертације **Haowa Madi** је показала иницијативу и самосталност, применила је адекватне експерименталне методе уз непрестално праћење најсавременије литературе из дате области, самостално обрадила резултате и критички их дискутовала.

На основу увида у истраживања и постигнуте резултате, Комисија закључује да су постављени циљеви који су усвојени приликом прихватања теме за израду докторске дисертације, испуњени и има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета, Универзитета у Београду, да прихвати позитивну оцену докторске дисертације **Haowa-e Madi**, под насловом “**Генотипизација, резистенција на антибиотици и формирање биофилма клиничких изолата *Stenotrophomonas maltophilia* из Србије**“ (eng. „*Genotyping, antibiotic resistance and biofilm formation of Stenotrophomonas maltophilia clinical isolates from Serbia*“) и омогући кандидату јавну одбрану рада.

КОМИСИЈА:

Проф. др Јелена Лозо, ванредни професор
Биолошког факултета
Универзитета у Београду

Проф. др Бранко Јовчић, ванредни професор
Биолошког факултета
Универзитета у Београду

др Милан Којић, научни саветник Института за
молекуларну генетику и генетичко инжењерство
Универзитета у Београду

У Београду, 31.07.2017. године.