

05	8342/5-5	09.07.19	087
----	----------	----------	-----

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу

На седници Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, одржаној 14.06.2019. године, одлуком број IV-03-483/30 формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом „**Дистрибуција фенотипова и гена резистенције на макролиде и линкозамиде код грам-позитивних кока**“, Милене Мишић, у следећем саставу:

1. **Проф. др Бранислава Коцић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник;
2. **Проф. др Лазар Ранин**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Микробиологија, члан;
3. **Доц. др Деана Медић**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду за ужу научну област Микробиологија са паразитологијом, члан.

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију др Милене Мишић и подноси Наставно-научном већу следећи:

ИЗВЕШТАЈ

2.1. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области

Докторска дисертација кандидата Милене Мишић под насловом „**Дистрибуција фенотипова и гена резистенције на макролиде и линкозамиде код грам-позитивних кока**“, урађена под менторством проф. др Дејана Баскића, ванредног професора Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, представља оригиналну научну студију,

која се бави испитивањем и утврђивањем дистрибуције фенотипова и гена резистенције на макролиде и линкозамиде код Грам-позитивних кока.

Мултирезистентне Грам-позитивне, патогене коке (тј. *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*) су одговорне за већину инфекција стечених у заједници и болничком окружењу и растућа су претња јавном здрављу. Бактеријска резистенција се развила до клинички најзначајнијих антибиотика. Сојеви Грам-позитивних кока, који показују индуцибилну клиндамицин-резистенцију у конвенционалним *in vitro* тестовима, одликују се резистентношћу на еритромицин и осетљивошћу на клиндамицин. Ови сојеви, међутим, имају високи степен мутација и током терапије антибиотикима могу развити конститутивни тип резистенције. У тим случајевима терапијска употреба клиндамицина може довести до селекције конститутивних MLSb мутаната и неуспешности терапије. Уз то, често прелазна природа експресије компликује клиничку детекцију индуцибилне резистенције фенотипским тестовима осетљивости. Ово може довести до неуспеха у лечењу због тога што изолати могу бити много резистентнији *in vivo* него што је утврђено *in vitro*, или могу имати шири спектар резистенције од очекиваног. Разумевање молекуларне основе индукције, укључујући физиолошку улогу и механизме читавања и реаговања на антибиотике, дозвољава евалуацију индукционих механизма као потенцијалних антимикуробних циљева и помаже у дизајнирању и откривању неиндукујућих антимикуробних агенаса. Са друге стране, уколико бисмо све сојеве бактерија које су резистентне на еритромицин прогласили истовремено резистентним и на клиндамицин, изгубили бисмо могућност примене клиндамицина у случајевима инфекција изазваних сојевима који су заиста осетљиви на овај антибиотик. Са клиничког аспекта, то значи да се у терапији инфекција изазваних бактеријама које су *in vitro* резистентне на еритромицин, клиндамицин не сме користити без претходне провере D-тестом. У циљу утврђивања образаца резистенције Грам-позитивних кока на MLS антибиотике на подручју Пчињског округа извршено је микробиолошко испитивање и утврђивање фенотипова (D-тест) и гена (PCR) MLSb резистенције за изолате *S. aureus*, коагулаза негативне стафилококе, *Enterococcus* spp., *S. pneumoniae*, *S. agalactiae* и *S. pyogenes*. Бактерије су биле изоловане из редовног материјала који је упућиван из пријемних амбуланти свих шест општина Пчињског округа, у периоду између новембра 2013. и априла 2014. године.

У овој студији је забележена јасна разлика у обрасцу MLS осетљивости међу стафилококама и ентерококама/стрептококама и потврђена је неопходност увођења D теста у рутинском тестирању антимикуробне осетљивости код изолата стафилокока. Континуиран пораст резистенције на антибиотике код стрептокока наглашава потребу за успостављањем контролисане употребе антибиотика. Лекари треба да узму у разматрање локалне и регионалне обрасце резистенције онда када морају изабрати адекватну антибиотску терапију. Налази ове студије, уз још неколико других са територије Србије, наглашавају неопходност правилне употребе антибиотика и континуираног праћења образаца резистенције Грам-позитивних кока на макролиде путем D-теста. Због тога, даља епидемиолошка истраживања Грам-позитивних кока по регионима Србије могу обезбедити, не само комплетнију представу о инфекцијама изазваним овим бактеријама у нашој земљи, већ и комплетну фенотипску карактеризацију те популације бактерија.

Ова студија је први покушај обједињавања информација о MLS резистенцији код патогених Грам-позитивних кока у региону (Пчињски округ). Ова епидемиолошка студија је настала као производ колекције изолата, њихове анализе и статистичке обраде добијених података, а указала нам је на неопходност улагања нових напора у решавању глобалног проблема антибиотске резистенције. Са увидом у стање ове резистенције, отвара се питање развоја стратегије за спречавање њеног ширења, која подразумева рестриктивно и мудрије коришћење антибиотика као и спречавање ширења мултирезистентних сојева бактерија. Ова студија даје допринос у продужавању употребног века актуелних и доступних MLS антибиотика.

2.2. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области

Прегледом литературе и увидом у биомедицинске базе података "Medline" и "CoBSON" помоћу следећих кључних речи: "staphylococci", "enterococci", "streptococci", "MLS resistance phenotypes", "MLS resistance genes" и "inducible clindamycin resistance" утврђено је да до сада није спроведена студија која је по форми и садржини идентична овој студији. На основу тога, Комисија констатује да докторска дисертација кандидата Милене Мишић под називом **„Дистрибуција фенотипова и гена резистенције на макролиде и линкозамиде код грам-позитивних кока“** представља резултат оригиналног научног рада.

2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области

А. Лични подаци

Милена Мишић рођена је 17. јула 1973. године у Лесковцу. Основну школу и гимназију завршила је у Врању. Редовне студије уписала је школске 1992/1993. године на Медицинском факултету у Новом Саду и завршила их у октобру 1999. године са просечном оценом 9,15. Магистарске студије из области Микробиологија са имунологијом уписала је школске 2000/2001. године на Медицинском факултету у Нишу, а академско звање магистра медицинских наука стиче 12. фебруара 2010. године, одбранивши магистарску тезу под насловом **„Повезаност бактеријске вагинозе са преканцерозним променама на грлићу материце“**. Специјалистичке студије из области Микробиологија са паразитологијом уписала је 17. априла 2002. године на Медицинском факултету у Нишу и завршила их 9. маја 2008. године са оценом одличан. На Медицинском факултету у Крагујевцу, пријавила је докторску дисертацију под насловом **„Дистрибуција фенотипова и гена резистенције на макролиде и линкозамиде код грам-позитивних кока“** 2014. године.

У Здравственом центру у Врању ради као лекар од 1. децембра 1999. године, а 17. априла 2002. започиње специјалистички стаж из области Микробиологија са паразитологијом у Заводу за јавно здравље „Врање“ у Врању. Као специјалиста микробиологије са паразитологијом ради у истој установи од 9. маја 2008. године.

Б. Списак објављених радова (прописани минимални услов за одбрану докторске дисертације)

Милена Мишић је аутор и коаутор више научних радова у часописима од међународног значаја. Резултати рада наведеног под редним бројем 1 саставни су део докторске дисертације, чиме је кандидат испунио услов за одбрану исте.

1. **Mišić M**, Arsović A, Čukić J, Rosić MI, Tošić-Pajić J, Manojlović N, Čekerevac I, Vidanović D, Šekler M, Baskić D. The prevalence of resistance to macrolides and lincosamides among community and hospital acquired Staphylococci and Streptococci isolates in southeast Serbia. *Srp Arh Celok Lek.* 2018; 146(7-8):384-390. DOI: 10.2298/SARH170407197M. **M23**

2. Aleksandra AD, Misic MS, Mira ZV, Violeta NM, Dragana IT, Zoran BM, Dejan VS, Milanko SD, Dejan BD. Prevalence of inducible clindamycin resistance among community-associated staphylococcal isolates in central Serbia. *Indian J Med Microbiol.* 2014; 32(1):49-52. **M23**
3. Dimitrijević DP, Radić GP, Jevtić VV, **Mišić M**, Baskić D, Trifunović SR. Stereospecific ligands and their complexes. XX. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of palladium(II) complexes with some alkyl esters of ethylenediamine-N,N0-di-S,S-(2,20-dibenzyl) acetic acid. *J Mol Struct.* 2014;1071:128-132. **M23**
4. Stojković DLj, Jevtić VV, Vuković N, Vukić M, Čanović P, Zarić MM, **Mišić MM**, Radovanović DM, Baskić D, Trifunović SR. Synthesis, characterization, antimicrobial and antitumor reactivity of new palladium(II) complexes with methionine and tryptophane coumarine derivatives. *J Mol Struct.* 2018;1157:425-433. **M23**
5. Stojković DLj, Jevtić VV, Vuković N, Vukić M, Potočnak I, Zelen IR, Zarić MM, **Mišić MM**, Baskić D, Kaluđerović GN, Trifunović SR. Crystal and molecular structure of a new palladium(II) complex. *J Struct Chem.* 2017;58(3):550-557. **M23**
6. **Mišić M**, Randelović G, Kocić B, Suvajdžić Lj, Hamzić S, Zvizdić Š, Tomić M. Association between bacterial vaginosis and precancerous changes of the cervix. *HealthMED.* 2011;5(6) Suppl 1:2088-2096. **M23**

2.4. Оцена о испуњености обима и квалитета у односу на пријављену тему

Наслов докторске дисертације и урађеног истраживања се поклапају. Циљеви истраживања идентични су са одобреним у пријави тезе.

Докторска дисертација др Милене Мишић написана је на 145 страница и садржи следећа поглавља: Увод, Циљеви истраживања, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци и Литература. Рад садржи 19 табела и 26 графикана, илустрован је са 10 слика, док је у поглављу „Литература“ цитирана 401 библиографска јединица из домаћих и иностраних стручних публикација.

У уводном делу кандидат је прецизно, користећи најсавременије литературне податке, изложио досадашња сазнања о клиничком значају испитиваних бактерија: *S. aureus*, коагулаза негативних стафилокока, *Enterococcus* spp., *S. pneumoniae*, *S. agalactiae* и *S. pyogenes*, с посебним освртом на најчешће механизме и гене

резистенције на макролиде и линкозамиде код ових Грам-позитивних кока. У даљем разматрању акценат је стављен на механизме деловања макролида и линкозамида, као и на механизме резистенције на ове антибиотике укључујући и фенотипски тест осетљивости (D-тест) за детекцију индуцибилне клиндамицин резистенције.

У другом поглављу јасно су изложени циљеви истраживања као и конкретни задаци који су у складу са постављеним циљевима: утврдити један од пет фенотипова MLSb резистенције (Er/Kli S, cMLSb, M/MSb, iMLSb и Lsa/b) за изолате *S. aureus*, коагулаза негативне стафилококе, *Enterococcus* spp., *S. pneumoniae*, *S. agalactiae* и *S. pyogenes*, коришћењем D-теста, идентификовати гене одговорне за MLSb резистенцију (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, *msrB*, *mefA/E*, *lnuA*, *lnuB*, *lsaA* и *lsaC*) за изолате *S. aureus*, коагулаза негативне стафилококе, *Enterococcus* spp., *S. agalactiae* и *S. pyogenes*, коришћењем мултиплекс PCR-а, утврдити и упоредити учесталост фенотипова и гена MLSb резистенције код испитиваних Грам-позитивних кока према: врстама бактерија, врстама материјала (брисеви грла и носа, генитални секрет, пиокултура) и пореклу материјала (амбулантни и болнички) и утврдити сензитивност и специфичност D-теста, на основу присуства *erm* гена, код изолата који су показали iMLSb фенотип резистенције.

Материјал и методологија рада подударни су са наведеним у пријави дисертације и презентовани на одговарајући начин. Истраживање је спроведено у виду експерименталне студије на микроорганизмима *in vitro*. У испитивање су били укључени клинички сојеви бактерија *Staphylococcus aureus*, коагулаза-негативних стафилокока, *Enterococcus* spp, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* и *Streptococcus pyogenes*, изоловани из редовног материјала који је упућиван у Центар за микробиологију Завода за јавно здравље у Врању, у периоду између новембра 2013. и априла 2014. године. У студију је био укључен само по један изолат од сваког пацијента. Изолати су били преузети из различитих врста материјала и то: 881 изолат из брисева грла и носа, 858 из пиокултура и 617 из гениталних секрета и из материјала различитог порекла, укључујући изолате амбулантног и болничког порекла.

У одељку Методе детаљно су описане све технике коришћене за анализу у студији: идентификација бактерија (класичном биохемијском идентификацијом и серолошком идентификацијом), тестирање осетљивости на антибиотике рађено по Кирби Бауер диск дифузионој методи према CLSI препорукама, идентификација метицилин резистенције на основу осетљивости стафилокока на цефокситин, утврђивање фенотипова резистенције на макролиде и линкозамиде (Er/Kli S, cMLSb,

M/MSb, iMLSb и L_{Sa}/b) D-тестом са растојањем између дискова еритромицина (15 µg) и клиндамицина (2 µg) од 12 mm (ивица од ивице), изолација ДНК и идентификација мултиплекс PCR методом гена MLS резистенције (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA/B*, *mefA/E*, *lnuA*, *lnuB*, *lsaA* и *lsaC*). На крају поглавља су наведене и све статистичке методе коришћене за анализу резултата.

Резултати истраживања систематично су приказани и добро документовани са 26 графикана и 18 табела. Генерално, показано је да је iMLSb био најчешћи фенотип резистенције међу стафилококама, док је cMLSb био најчешћи фенотип резистенције међу ентерококама и β-хемолитичким стрептококама. Најчешће идентификовани гени MLS резистенције међу стафилококама били су *msrA/B* и *ermC*, док су *lsaA* и *ermB* ген били најчешће изоловани међу ентерококама и β-хемолитичким стрептококама. Утврђена је јасна разлика у обрасцу MLS осетљивости међу стафилококама и ентерококама/стрептококама и потврђена је неопходност увођења D теста у рутинском тестирању антимикробне осетљивости код изолата стафилокока. Такође, утврђен је пораст резистенције на макролиде код стрептокока и идентификован нови, тзв. "keyhole" фенотип, дупли диск дифузионом методом код једног изолата MSSA и три изолата ентерокока.

На основу претходно изнетих чињеница, Комисија сматра да завршена докторска дисертација у наслову „Дистрибуција фенотипова и гена резистенције на макролиде и линкозамиде код грам-позитивних кока“, по обиму и квалитету израде у потпуности одговара пријављеној теми дисертације.

2.5. Научни резултати докторске дисертације

Најзначајнији резултати истраживања су садржани у следећим закључцима:

1. Поређењем учесталости резистенције на антибиотике, утврђено је да није било резистентних изолата на линезолид међу Грам-позитивним кокама и да је на ванкомицин био резистентан само један изолат ентерокока (0,6%). Такође смо утврдили да је највећа резистентност била на:
 - цефокситин код MRSA и MRKNS (100%);
 - пеницилин, ципрофлоксацин и еритромицин код MRSA и MRKNS изолата;
 - клиндамицин код ентерокока, а затим код *S. pneumoniae*;

- гентамицин код *S. agalactiae*, а затим код MRSA и MRKNS изолата.
2. У односу на поједине врсте Грам-позитивних кока утврђено је да је најчесталији фенотип резистенције код изолата :
 - *S. aureus* и KNS - iMLSb;
 - ентерокока, *S. pneumoniae* и *S. agalactiae* - cMLSb;
 - *S. pyogenes* - M/MSb;
 3. У односу на све испитиване Грам-позитивне коке утврђено је да:
 - cMLSb и LSa/b фенотип су били најчесталији код изолата ентерокока;
 - iMLSb фенотип је био најчесталији код MRSA и MRKNS изолата;
 - M/MSb је био најчесталији код MRKNS изолата, односно KNS изолата;
 - сензитивност на еритромицин и клиндамицин била је најчесталија код изолата *S. agalactiae* и *S. pyogenes*.
 4. Поређењем учесталости MLS фенотилова резистенције код изолата Грам-позитивних кока из различитих врста материјала, утврђено је да:
 - су iMLSb и сензитивност на еритромицин и клиндамицин били најчесталији код изолата из брисева грла и носа и пиокултура;
 - cMLSb и LSa/b су били најчесталији код изолата из гениталних секрета и урина;
 - M/MSb је био најчесталији код изолата из гениталних секрета.
 5. Поређењем учесталости MLS фенотилова резистенције код изолата различитог порекла, утврђено је да је M/MSb фенотип резистенције био значајно учесталији међу болничким изолатима стафилокока.
 6. Најчешћи појединачни гени и њихове комбинације детектоване код:
 - стафилокока су *msrA/B*, *ermC* и *ermC+msrA/B*
 - ентерокока и β-хемолитичких стрептокока су *lsaA*, *ermB* и *ermB+lsaA*.
 7. Код стафилокока најчешћи појединачни гени који су детерминисали:
 - M/MSb фенотип - *msrA/B* ген
 - LSa/b фенотип - *InuA* ген
 - iMLSb фенотип - *ermA* и *ermC* ген
 - cMLSb фенотип - *ermC* и комбинације гена.
 8. Код ентерокока и β-хемолитичких стрептокока најчешћи појединачни гени који су детерминисали:
 - LSa/b фенотип - *lsaA* ген

- iMLSb фенотип - *ermB* и *ermA* ген
 - cMLSb фенотип - *ermB* и комбинације гена.
9. Поређењем учесталости гена MLS резистенције између амбулантних и болничких сојева утврђено је да:
- *ermB* и *IsaA* ген су били статистички значајно учесталији код амбулантних изолата ентерокока и β-хемолитичких стрептокока у односу на болничке
 - *msrA/B* ген је био статистички значајно учесталији код болничких изолата стафилокока у односу на амбулантне.
10. Идентификација iMLSb фенотипа резистенције D-тестом је у поређењу са референтном методом, PCR идентификацијом *erm* гена показала 100% сензитивности и 65,38% специфичности.

2.6. Применљивост и корисност резултата у теорији и пракси

Добијени резултати истраживања дају оригинални и важан допринос бољем увиду у резистенцију на MLS антибиотике међу Грам-позитивним кокама, отварају питање развоја стратегије за спречавање њеног ширења, која подразумева рестриктивно и мудрије коришћење антибиотика као и спречавање ширења мултирезистентних сојева бактерија, дају свој допринос у продужавању употребног века актуелних и доступних MLS антибиотика, потврђују неопходност увођења D теста у рутинском тестирању антимикробне осетљивости код изолата стафилокока и упућују клиничаре на локалне и регионалне обрасце MLS резистенције при избору адекватне антибиотске терапије.

2.7. Начин презентирања резултата научној јавности

Резултати истраживања су објављени у часопису индексираном на SCI листи:

1. **Mišić M**, Arsović A, Čukić J, Rosić MI, Tošić-Pajić J, Manojlović N, Čekerevac I, Vidanović D, Šekler M, Baskić D. The prevalence of resistance to macrolides and lincosamides among community and hospital acquired Staphylococci and Streptococci isolates in southeast Serbia. *Srp Arh Celok Lek.* 2018; 146(7-8):384-390. DOI: 10.2298/SARH170407197M. **M23**


ЗАКЉУЧАК

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата др Милене Мишић под називом „Дистрибуција фенотипова и гена резистенције на макролиде и линкозамиде код грам-позитивних кока" на основу свега наведеног сматра да је истраживање у оквиру дисертације адекватно постављено и спроведено.

Комисија сматра да ова докторска дисертација кандидата др Милене Мишић урађена под менторством проф. др Дејана Баскића, представља оригинални научни и практични значај у испитивању дистрибуције фенотипова и гена резистенције на макролиде и линкозамиде код Грам-позитивних кока.

Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да докторска дисертација под називом „Дистрибуција фенотипова и гена резистенције на макролиде и линкозамиде код грам-позитивних кока" кандидата др Милене Мишић буде позитивно оцењена и одобрена за јавну одбрану.

КОМИСИЈА


Универзитет у Нишу
Факултет за микробиологију

Проф. др Бранислава Коцић, редовни професор Медицинског факултета
Универзитета у Нишу за ужу научну област Микробиологија и имунологија
председник


Prof. dr Lazar Ranin
Универзитет у Београду
Факултет за микробиологију и паразитологију

Проф. др Лазар Ранин, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у
Београду за ужу научну област Микробиологија, члан

Доц. др Деана Медић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду
за ужу научну област Микробиологија са паразитологијом, члан



Крагујевац, 20. 06. 2019. године