

NAUČNOM VEĆU MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU

Na sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta u Beogradu, održanoj dana 24.06.2021. godine, broj 9700/15-AJ, imenovana je komisija za ocenu završene doktorske disertacije pod naslovom:

„Kolonizacija vankomicin-rezistentnim *Enterococcus* spp. sojevima u bolničkoj sredini - genotipska i fenotipska karakterizacija sojeva i faktori rizika za kolonizaciju“,

kandidata dr Ane Janjušević, zaposlene u Institutu za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ u Beogradu. Mentor disertacije je prof. dr Ivana Ćirković, a komentor disertacije prof. dr Ljiljana Marković-Denić.

Komisija za ocenu završene doktorske disertacije imenovana je u sastavu:

1. Prof. dr Slobodanka Đukić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu;
2. Prof. dr Goran Stevanović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu;
3. Prof. dr Biljana Mijović, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Istočnom Sarajevu.

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 Ane Janjušević napisana je na ukupno 157 strana i podeljena je na sledeća poglavlja: uvod, ciljevi istraživanja, materijal i metode, rezultati, diskusija, zaključci i literatura. U disertaciji se nalazi ukupno 38 tabela i 43 slike. Doktorska disertacija sadrži sažetak na srpskom i engleskom jeziku, podatke o Komisiji, spisak skraćenica korišćenih u tekstu, prilog i biografiju kandidata.

U **uvodu** su opisane opšte osobine roda *Enterococcus*, karakteristike enterokoknog genoma, faktori virulencije, mehanizam dejstva i podela glikopeptidnih antimikrobnih lekova,

molekularna osnova rezistencije enterokoka na vankomicin, karakteristike i regulacija ekspresije *van* operona, fenotip glikopeptidne rezistencije, rezistencija enterokoka na ostale grupe antimikrobnih lekova. Prikazan je detaljan osvrt na dosadašnja saznanja vezana za pojavu i poreklo vankomicin-rezistentog enterokoka (VRE) u svetu i nastanak VRE kolonizacije i VRE infekcije. Takođe, dat je pregled podataka o prevalenciji invazivnih VRE izolata u Evropi i Srbiji i prikazani su podaci o prevalenciji VRE kolonizacije. Na kraju poglavlja opisana je uloga mikrobiološke laboratorije u nadzoru nad VRE.

Ciljevi rada su precizno definisani i obuhvataju sledeće: utvrđivanje učestalosti fekalne kolonizacije VRE sojevima kod hospitalizovanih pacijenata na odeljenjima sa povišenim rizikom od nastanka kolonizacije; identifikovanje faktora rizika za fekalnu VRE kolonizaciju; ispitivanje fenotipskih i genotipskih karakteristika izolovanih VRE sojeva i utvrđivanje klonalne povezanost i klonalne diseminacije VRE sojevima.

U poglavlju **materijal i metode** je navedeno da se u istraživanju koristio analitički epidemiološki metod po tipu studije preseka i da je istraživanje sprovedeno na kliničkim odeljenjima za hemato-onkologiju, gerijatriju, hemodijalizu, za akutne infektivne bolesti i u jedinicama intenzivnog lečenja (JIL) u tri univerzitetske bolnice u Beogradu: Kliničkom centru Srbije, Kliničko-bolničkom centru (KBC) Zemun i KBC Zvezdara, u periodu od 01.06.2015. do 01.07.2020. godine. Na navedenim kliničkim odeljenjima obavljen je postupak uzorkovanja stolice za bakteriološki pregled i prikupljanje epidemioloških podataka o pacijentima. Studija je odobrena je od strane Etičkog komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (broj: 1322/II-4) i svi pacijenti su dali pisani pristanak pre uključenja u studiju. Laboratorijski deo istraživanja, koji je obuhvatio mikrobiološku dijagnostiku i metode molekularne biologije, obavljen je u Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u Institutu za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ i Zavodu za javno zdravlje Požarevac. Statistička obrada podataka prikupljenih epidemiološkim upitnikom urađena je u Institutu za epidemiologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Nadalje, u ovom poglavlju detaljno su opisani kriterijumi za uključnje u studiju, kriterijumi za isključenje iz studije, veličina uzorka, i studijska populacija, kao i instrumenti merenja. U procesu prikupljanja podataka korišćen je epidemiološki upitnik koji je konstruisan na osnovu literaturnih podataka o faktorima rizika za VRE kolonizaciju i obuhvatao je pitanja grupisana u nekoliko celina (demografske podatke, podatke o osnovnoj bolesti i komorbiditetima, podatke o bolničkom lečenju, podatke o primeni antimikrobne terapije i podatke o dijagnostičko-terapijskim procedurama).

Popunjavanje upitnika je vršio istraživač uvidom u istoriju bolesti ispitanika. Mikrobiološka dijagnostika je obuhvatila postupke uzimanja i transporta uzorkovanog materijala za bakteriološki pregled, izolaciju i identifikaciju VRE sojeva i ispitivanje osetljivosti izolovanih VRE sojeva na antimikrobna agense. Za izolaciju je korišćena CHROMID®VRE (bioMerieux, Francuska) hranljiva podloga. Za identifikaciju do nivoa vrste i ispitivanje antimikrobne osetljivosti VRE izolata, korišćen je BD Phoenix™ automatizovani mikrobiološki sistem (BD, SAD) i paneli za Gram-pozitivne bakterije (PMIC /ID-94, BD Phoenix Gram Positive Combo Panels, BD, SAD). Metode molekularne biologije obuhvatile su postupke ekstrakcije bakterijske DNK, detekciju vrsno specifičnih gena (*ddl_{E. faecium}*, *ddl_{E. faecalis}*), gena nosioca rezistencije na antimikrobne agense (*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *van C2/C3*, *vatD*, *vatE*, *vgbA*, *ermB1*) i gena koji kodiraju faktore virulencije (*esp*, *efaA*, *hyl*, *gelE*, *asa1*, *cpd*) konvencijalnom PCR metodom i genotipizaciju izolata MLVA (eng. Multiple-locus Variable-number tandem repeat analysis) metodom baziranoj na PCR metodi. Kvantitativno ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma izolovanih sojeva urađeno je u mikrotitracionim pločama sa 96 bunara za kulturu tkiva. Za organizovanje podataka i pravljenje tabela, primenjen je Microsoft Excel program za tabelarne kalkulacije 2016 (Microsoft, SAD). U obradi podataka i statističkim analizama, korišćen je SPSS-21.0 statistički programski paket (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Za ispitivanje značajnosti razlike između posmatranih grupa, korišćen je Hi-kvadrat test i Fišerov test tačne verovatnoće. Nivo verovatnoće postavljen je na $p < 0,05$. Ispitivanje prediktivnih svojstava nezavisnih promenljivih u svojstvu faktora rizika za nastanak kolonizacije VRE sojevima, testirano je pomoću univarijantne i multivarijantne binarne logističke regresione analize. Varijable koje su pokazale nivo statističke značajnosti $p < 0,1$ u univarijantnoj logističkoj regresiji ušle su u finalni multivarijantni model logističke regresije. Kao metod uključivanja varijabli u model multivarijantne binarne logističke regresione analize izabran je Stepwise Backward metod. Za ispitivanje međusobne povezanosti izolata, odnosno za analizu klastera korišćen je softver BioNumerics software (version 7; Applied Maths). Odnosi između genotipova su analizirani na osnovu konstrukcije dendrograma, stabla minimalnog raspona (eng. Minimum spinning tree, MST) i pomoću matrica korelacije. Za utvrđivanje evolutivnih odnosa između MLVA tipova (MT) izolata, odnosno određivanja začetnika populacije i njegovih najbližih srodnika (eng. single locus variants, SLV) korišćen je geobURST algoritam u okviru softverskog programa PHYLOViZ (ver.2.0). Za numeričku procenu povezanosti genotipova i određivanje stepena raznolikosti i/ili dominacije jednog genotipa, izračunati su indeksi diverziteta: Simpsonov indeks diverziteta, Shanon H indeks (indikator obilja) i Shanon E indeks (indikator ujednačenosti).

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

Diskusija je napisana jasno i pregledno, uz prikaz podataka drugih istraživanja sa uporednim pregledom dobijenih rezultata doktorske disertacije.

Zaključci sažeto prikazuju najvažnije nalaze koji su proistekli iz rezultata rada. Korišćena **literatura** sadrži spisak od 297 referenci.

B) Provera originalnosti doktorske disertacije

Proverom originalnosti doktorske disertacije, korišćenjem programa iThenticate utvrđeno je da podudaranje teksta, odnosno vrednost Similarity indexa iznosi 4%. Ovaj stepen podudarnosti posledica je korišćenja opštih pojmova i termina u mikrobiologiji i molekularnoj biologiji, opštih mesta i podataka i prethodno publikovanih rezultata doktorandovih istraživanja, koji su proistekli iz rada na disertaciji, što je u skladu sa članom 9. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu („Glasnik Univerziteta u Beogradu“, broj 204/18). Na osnovu svega iznetog, a u skladu sa članom 8. stav 2. Pravilnika o postupku provere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu, saglasni smo da izveštaj ukazuje na originalnost doktorske disertacije, te da se propisani postupak pripreme za njenu odbranu može nastaviti.

C) Kratak opis postignutih rezultata

U studiji je učestvovalo 268 ispitanika. Procenat ispitanika starijih od 65 godina iznosio je 61,2%, dok je procenat ispitanika mlađih od 65 godina iznosio 38,8%. U grupi starijih od 65 godina, muškaraca je bilo 85 (51,8%), a žena 79 (48,2%). U grupi mlađih od 65 godina, muškaraca je bilo 60 (57,7%), a žena 44 (42,3%). Od 268 ispitanika uključenih u studiju oko 30% činili su ispitanici sa odeljenja hemato-onkologije. Slede odeljenja gerijatrije i hemodijalize sa po oko 20%, a zatim JIL i akutne infektivne bolesti sa oko 15%. U odnosu na zdravstvene ustanove iz kojih su ispitanici regrutovani za učešće u istraživanju, najviše ispitanika je bilo iz KBC Zemun sa 101 ispitanikom, slede KBC Zvezdara sa 86 ispitanika i KCS sa 81 ispitanikom. Hronična bolest sa najvećom učestalosti u studijskoj populaciji je bila hipertenzija, koja je prisutna kod 53% ispitanika. Najveći broj ispitanika (34,7%) je bio hospitalizovan u bolnici duže od 16 dana pre uzorkovanja stolice. Više od 80% ispitanika je bilo bar jednom na bolničkom lečenju. Hiruršku intervenciju u toku bolničkog lečenja je imalo 6,3% pacijenata. Više od trećine ispitanika je primilo bar jedan antimikrobni lek u toku bolničkog lečenja. Najčešće propisivane grupe antimikrobnih lekova su bili cefalosporini,

metronidazol i fluorohinoloni. Petina ispitanika je primala antimikrobne lekove u toku poslednjih šest meseci. Najzastupljenije dijagnostičko-terapijske procedure među studijskom populacijom su bile onkološka terapija i transfuzija koje su zastupljene sa oko 30%. Od 268 ispitanika, neutropenija je bila prisutna kod 12,3%. Skoro polovina ispitanika je imala hipoalbuminemiju. Terapiju lekovima iz grupe inhibitora protonske pumpe (IPP) i terapiju probioticima primalo više od 40% ispitanika. Infekcija uzrokovana bakterijom *Clostridioides difficile* bila je registrovana kod 6 ispitanika.

Učestalost fekalne kolonizacije VRE sojevima u studijskoj populaciji u posmatranom studijskom periodu iznosila je 28,7% (77/268). Učestalost kolonizacije VRE sojevima je bila najviša na kliničkim odeljenjima za gerijatriju (42,6%) i JIL (40,0%), a najniža na odeljenjima za hemodijalizu (11,7%). Detektovana je statistički značajna razlika između grupe VRE kolonizovanih i VRE nekolonizovanih u odnosu na klinička odeljenja uključena u istraživanje, u odnosu na dužinu vremenskog perioda između prijema i uzorkovanja, kao i u odnosu na primenu antimikrobne terapije od prijema do uzorkovanja. Više od 60% VRE kolonizovanih ispitanika je boravilo duže od 7 dana u bolnici, a skoro polovina VRE kolonizovanih ispitanika je boravila u bolnici u periodu od 3 meseca pre uzorkovanja. U grupi VRE kolonizovanih jedan antimikrobni lek je primilo 49,4% ispitanika, dok je dva primilo 16,9%. Razlika između ovih grupa je bila statistički značajna. U grupi VRE kolonizovanih ispitanika postojala je veća učestalost primene antimikrobnih lekova iz grupe cefalosporina i grupe fluorohinolona u odnosu na grupu VRE nekolonizovanih. U grupi VRE kolonizovanih antimikrobni lek iz grupe cefalosporina je primilo 35,1% ispitanika, a iz grupe fluorohinolona 24,7%. Primena JIL procedura bez plasiranja centralnog venskog katetera (CVK) je bila češća u grupi kolonizovanih pacijenata.

Nezavisni prediktori za nastanak VRE kolonizacije među ispitanicima hospitalizovanim na kliničkim odeljenjima sa povišenim rizikom za nastanak VRE kolonizacije bili su hospitalizacija na kliničkim odeljenjima, hospitalizacija pre uzorkovanja duža od tri dana, primena cefalosporina i fluorohinolona. U odnosu na odeljenje za hemodijalizu, boravak na odeljenju za gerijatriju povećao je rizik za VRE kolonizacije 6,5 puta, boravak u JIL rizik 5 puta, a boravak na hemato-onkološkom odeljenju 4,7 puta. Hospitalizacija na odeljenju za akutne infektivne bolesti povećava rizik za VRE kolonizaciju 2 puta, međutim ova varijabla nije bila statistički značajna. U odnosu na ispitanike koji su hospitalizovani 48 sati pre uzorkovanja stolice na VRE, ispitanici koji su hospitalizovani 3-7 dana pre uzorkovanja imali su 5,6 puta veći rizik za VRE kolonizaciju, ispitanici hospitalizovani 8-15 dana pre

uzorkovanja imali 5,5 puta veći rizik za VRE kolonizaciju, dok su ispitanici hospitalizovani duže od 16 dana pre uzorkovanja imali 8,4 puta veći rizik za VRE kolonizaciju. Primena cefalosporina je povećala rizik za VRE kolonizaciju 2,2 puta, a fluorohinolona 1,8 puta.

Svih 77 VRE izolata su bili vankomicin rezistentni *Enterococcus faecium* (VRE_{fm}) sa VanA fenotipom - visok nivo rezistencije na vankomicin i varijabilni nivo rezistencije na teikoplanina. Ispitivanje antimikrobne osetljivosti pokazalo je da su svi ispitivani VRE_{fm} izolati multirezistentni VRE_{fm} i ispoljili su visok stepen rezistencije na gotovo sve testirane antimikrobne lekove, osim na linezolid i tigeciklin na koje su svi bili osetljivi. Šest izolata (7,8%) je bilo osetljivo na ampicilin. Neočekivano, 38,9% VRE_{fm} izolata je bilo rezistentno na kvinupristin-dalftopristin (Q-D). Izrada fenotipskog profila za svaki pojedinačni ispitivani VRE_{fm} izolat pokazala je da je prisutno osam profila antimikrobne rezistencije, od kojih su dva bila dominantna i zastupljena kod 85,7% izolata (AMP-IMP-CIP-LEVO-GEN-HLS-STR-HLS-TEI i AMP-IMP-CIP-LEVO-GEN-HLS-STR-HLS-TEI-Q-D). PCR analiza je potvrdila da svih 77 VRE izolata pripada vrsti *Enterococcus faecium*, kao i da je svih 77 ispitivanih izolata koji su prethodno pokazali fenotipski VanA tip rezistencije nosilo *vanA* gen, odnosno da ispoljava *vanA* tip rezistencije na vankomicin. Svi izolati koji pokazuju fenotipsku rezistenciju na Q-D su nosili gen *ermB1*. Genetska analiza prisustva gena virulencije otkrila je da je kod 84% (65/77) VRE_{fm} izolata detektovan *esp* gen koji kodira enterokokni površinski protein. Slede *efaA* gen koji kodira adhezin ćelijskog zida, koji je zastupljen sa 71,2% (55/77) i *hyl* gen koji kodira hijaluronidazu i koji je zastupljen sa 54% (42/77). Najveći broj izolata, 44% (34/77) nosio je tri od šest ispitivanih gena za faktore virulencije, dok je 26% (20/77) izolata nosilo dva gena koji kodiraju faktore virulencije.

Da bi se procenila filogenetska povezanost VRE_{fm} izolata, izvršena je MLVA analiza izolovanih sojeva. Od ukupno 77 VRE_{fm} izolata, 93,5% (72/77) je generisalo MLVA profil. MLVA analiza je otkrila 29 različitih MLVA tipova, od kojih je 25 sa jedinstvenim profilima koji nisu otkriveni ranije. Simpsonov indeks diverziteta (1-D) među izolatima je bio 0,94 (94%). Shanon H indeks je iznosio 3,01, a Shanon E indeks 0,88. Analizom filogenetske povezanosti ispitivanih izolata otkriveno je 13 klastera koji su obuhvatili 56/72 (77,7%) izolovanih VRE_{fm} sojeva. Tri najveća klastera su obuhvatila: 12 (SRB2), 9 (SRB16) i 7 (MT161) izolata, dok je preostalih 10 klastera obuhvatilo od 2 do 4 izolata. SRB3 MLVA tip je prema geoBURST analizi označen kao začetnik populacije VRE_{fm} klonova iz ovog istraživanja, a SRB16, SRB11, SRB1, MT-524 i MT-379 kao najbliži srodnici SRB3 klona. Upoređivanjem populacije VRE_{fm} klonova iz ovog istraživanja sa dostupnom bazom MT

klonova pokazano je da su SRB3 i SRB9 najbliži srodnici MT-1 klona, a da je SRB16 najbliži srodnik MT-159 klona. Kvantitativni test sposobnosti formiranja biofilma pokazao je da su 20,7% (16/77) bakterijskih sojeva bili produktori biofilma različitog kapaciteta

D) Usporedna analiza doktorske disertacije sa rezultatima iz literature

U okviru ove doktorske disertacije prvi put je urađeno sveobuhvatno multicentrično epidemiološko-mikrobiološko istraživanje o fekalnoj kolonizaciji VRE sojevima kod hospitalizovanih pacijenata na odeljenjima sa povišenim rizikom za nastanak VRE kolonizacije.

Dobijene vrednosti učestalosti VRE kolonizacije u ovom istraživanju (28,7%) su visoke u poređenju sa evropskim zemljama sa tradicionalno niskom prevalencijom invazivnih VRE izolata, kao što su npr. Nordijske zemlje ili zemlje Beneluksa. Učestalost kolonizacije koja je detektovana u dva istraživanja sprovedena u Holandiji je iznosila 1,5% (Braak *et al.*, 2000) i 2% (Endtz *et al.*, 1997), u istraživanju sprovedenom u Finskoj (Suppola *et al.*, 1996) zabeležena je vrednost od 2%, dok je u istraživanju sprovedenom u Belgiji (Gordts *et al.*, 1995) učestalost VRE kolonizacije iznosila 3,5%. S obzirom na visoke stope invazivnih VRE*fm* izolata u Srbiji u prethodnim godinama, koje su se prema podacima CAESAR mreže (World Health Organisation, 2020) kretale između 35% (2016. godine) i 75% (2014. godine) sa srednjom vrednosti od 55,2%, čime je Srbija svrstana među zemlje sa najvećom stopom VRE*fm* na evropskom kontinentu, dobijene vrednosti učestalosti VRE kolonizacije u ovom istraživanju su očekivane. Rezultati istraživanja su, u poređenju sa sličnim istraživanjima rađenim u Evropi, najbliži učestalostima detektovanim u studiji rađenoj u Grčkoj (Metallidis *et al.*, 2006) koja je iznosila 30,5% i studiji rađenoj u Irskoj (Whelton *et al.*, 2016) gde je učestalost VRE kolonizacije iznosila 31,4%. I Grčka i Irska su među evropskim zemljama koje su takođe u vrhu kada govorimo o učestalosti invazivnih VRE izolata u Evropi, čime se može objasniti sličnost rezultata iz ovog istraživanja sa pomenutim rezultatima istraživanja iz Grčke i Irske.

Razlika u učestalosti VRE kolonizacije između pacijenata na odeljenjima za hemodijalizu i pacijenata na ostalim odeljenjima je očekivana, i vezuje se za činjenicu da su pacijenti na hemodijalizi češće pod nadzorom zdravstvenih radnika ali i zato što postoji edukacija i veća svesnost zdravstvenog osoblja i pacijenata na hemodijalizi o značaju preventivnih mera za sprečavanje i suzbijanja bolničkih infekcija. Vrednost VRE kolonizacije među pacijentima na

hemodijalizi u ovom istraživanju je iznosila 11,7% i najbližnja je podacima iz studije u Irskoj (Humphreys, 2014) i neznatno je viša od maksimalne učestalosti dobijene u meta-analizi (Zacharioudakis *et al.*, 2015). Učestalost VRE kolonizacije na odeljenjima za gerijatriju u ovom istraživanju (42,6%) je premašila učestalost VRE u JIL (40%) što je u skladu sa rezultatima istraživanja Bonilla i sar. (Bonilla *et al.*, 1997). Učestalosti VRE kolonizacije koja su detektovane u JIL i na odeljenjima za hemato-onkologiju su u skladu sa prethodno poznatim podacima iz literature (Goossens *et al.*, 2003; Henrique, Furtado and Mendes, 2005). Za razliku od učestalosti zabeleženih na prethodno pomenutim odeljenjima, učestalost VRE kolonizacije na odeljenjima za akutne infektivne bolesti je značajno viša (22,7%) u odnosu na podatke iz literature (7,7%) (Karki *et al.*, 2013). Primenom multivarijantne binarne logističke regresione analize za ispitivanje faktora rizika za VRE kolonizaciju kao značajni nezavisni prediktori izdvojile sledeće varijable: hospitalizacija pre uzorkovanja duža od tri dana, primena cefalosporina i flouorhinolona. što je u saglasnosti sa dokumentovanim faktorima rizika za VRE kolonizaciju. U odnosu na odeljenje za hemodijalizu, boravak na odeljenju za gerijatriju je povećao rizik za VRE kolonizacije 6,5 puta, boravak u JIL je povećao rizik 5 puta, a boravak na hemato-onkološkom odeljenju 4,7 puta. U odnosu na ispitanike koji su hospitalizovani 48 sati pre uzorkovanja stolice na VRE, ispitanici hospitalizovani 3-7 dana pre uzorkovanja imali su 5,6 puta veći rizik za VRE kolonizaciju, ispitanici hospitalizovani 8-15 dana pre uzorkovanja imali su 5,5 puta veći rizik za VRE kolonizaciju, dok su ispitanici hospitalizovani duže od 16 dana pre uzorkovanja imali 8,4 puta veći rizik za VRE kolonizaciju.. U odnosu na literaturne podatke (Ostrowsky *et al.*, 1999; McEvoy *et al.*, 2006; Metallidis *et al.*, 2006; Sakka *et al.*, 2008; Amberpet *et al.*, 2016) rizici za VRE kolonizaciju u našoj studiji su izuzetno visoki i mogu da budu odraz diseminacije dobro adaptiranog bolničkog VRE klona. U grupi VRE kolonizovanih ispitanika postoji veća učestalost primene antimikrobnih lekova u odnosu na grupu VRE nekolonizovanih ispitanika, a primena jednog antimikrobnog leka povećava rizik za VRE kolonizaciju oko tri puta. Primena cefalosporina povećava rizik za VRE kolonizaciju dva puta, a primena flouorhinolona 1,8 puta, što je u saglasnosti sa činjenicom da su ovi antimikrobni agensi poznati kao induktori VRE kolonizacije (Wiström *et al.*, 1992; Borzio *et al.*, 1997; Rice *et al.*, 2004; Van Boeckel *et al.*, 2014; Flokas *et al.*, 2017), kao i sa podacima o povećanom obimu potrošnje ovih lekova u Srbiji (Radonjić, 2007, 2014; Vukajlović and Bogdanović, 2019). Svi izolovani VRE f_m sojevi u istraživanju su nosili *vanA* gen, odnosno imali su *vanA* genotipski profil, što je u saglasnosti sa činjenicom da je *vanA* genotip dominantan VRE genotip u Evropi i SAD (Bonten, Willems and Weinstein, 2001; Werner *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2020).

Predominacija MDR VRE f m u istraživanju može da označava da je za VRE f m bolnička sredina postala nova ekološka niša koju je uspešno osvojio, što je u saglasnosti sa prethodnim zaključcima da je MDR *E. faecium* dominantni rezervoar stečene rezistencije na vankomicin, posebno među imunokompromitovanim pacijentima, što rezultira diseminacijom gena rezistencije među bakterijskom populacijom nakon selektivnog pritiska antimikrobnih lekova (Bonten, Willems and Weinstein, 2001; Mutters *et al.*, 2013). S obzirom da je rezistencija na Q-D česta kod sojeva koji se izoluju kod životinja i vezuju se za upotrebu virginamicina i pristinomicina kao faktora rasta na životinjsim farmama, koje se smatraju mesta perzistencije gena rezistencije (Soltani *et al.*, 2000; Donabedian *et al.*, 2006; Deshpande *et al.*, 2007), visok stepen rezistencije VRE f m na Q-D (38,9%) koji nikad nije bio registrovan u našoj zemlji za kliničku upotrebu, niti je bio deo terapijskih protokola i prisustvo ampicilin osetljivih VRE f m izolata ukazuju na razmenu gena nosioca rezistencije između *E. faecium* sojeva animalnog i humanog izvora, odnosno ukazuje na postojanje vanbolničkog VRE f m izvora.

Visok procenat MDR VRE f m izolata koji imaju sposobnost produkcije biofilma i od kojih većina nosi skoro sve ispitivane gene za faktore virulencije (*esp*, *hyl*, *efaA*, *asa1*, *gelE*, *cpd*), a 58,4% izolata nosi minimum tri gena za faktore virulencije, što je u suprotnosti sa rezultatima, u istraživanju Billström i sar. gde je samo 2% izolata je nosilo multiple gene za faktore virulencije (Billström *et al.*, 2008) pokazatelj je odlične adaptacije VRE f m za uspešno preživljavanje i diseminaciju u bolničkoj sredini.

MLVA analiza je otkrila 29 različitih MLVA tipova, od kojih je 25 sa jedinstvenim profilima koji nisu otkriveni ranije čime se upotpunila globalna mapa cirkulišućih VRE f m genotipova. Prisustvo novih MT profila govori u prilog plastičnosti VRE f m genoma i visokog kapaciteta za gensko rearanžiranje koje se dešava u gastrointestinalnom traktu. Na osnovu različitih kombinacija za VNTR-7, VNTR-8 i VNTR-10 lokusa za 33,3% izolata je detektovano da pripadaju CC17, što je niže u odnosu na istraživanja koja su uključivala samo invazivne isolate, ali je u skladu sa podacima o uzorcima iz nadzora (Top *et al.*, 2004). MLVA analiza je otkrila 13 klastera koji su obuhvatili 77,7% izolovanih VRE f m sojeva. Tri najveća klastera (SRB2, SRB16 i MT161) su činila 38,8% tipiziranih VRE f m izolata i predstavljala su SLV (eng. Single Locus Variant), odnosno DLV (eng. Double Locus Variant) dva MLVA genotipa (MT-159 i MT-340) koji su dokazani uzročnici bolničkih infekcija (Billström *et al.*, 2010; Jovanović *et al.*, 2014). VRE f m sojevi koji su pripadali najvećim klasterima bili su dispergovani po različitim bolničkim odeljenjima, čime se može isključiti transmisija među ispitanicima. SRB3 MLVA tip je prema geoBURST analizi označen kao začetnik populacije

VRE fm klonova iz ovog istraživanja, a SRB16, SRB11, SRB1, MT-524 i MT-379 kao najbliži srodnici SRB3 klona. Upoređivanjem VRE fm populacije iz ovog istraživanja sa dostupnom bazom MT klonova (personalna komunikacija sa Janette Top) pokazano je da su SRB3 i SRB9, najbliži srodnici MT-1 klona, a SRB16 najbliži srodnik srodnik MT-159 klona. Ova analiza je pokazala blisku filogenetsku povezanost izolovanih VRE fm sa poznatim klonovima prouzrokovateljima VRE bolničke infekcije.

E) Objavljeni radovi koji čine deo doktorske disertacije

Ana Janjušević, Ljiljana Markovic Denić, Rajna Mlinič, Anita Grgurević, Ivana Ćirković.
Intestinal carriage of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. among high-risk patients in university hospitals in Serbia: first surveillance report, Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2021;20:18. doi.org/10.1186/s12941-021-00423-0.

F) Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa)

Doktorska disertacija „Kolonizacija vankomicin-rezistentnim *Enterococcus* spp. sojevima u bolničkoj sredini - genotipska i fenotipska karakterizacija sojeva i faktori rizika za kolonizaciju“, dr Ane Janjušević, kao prvi ovakav rad u našoj populaciji predstavlja originalni naučni doprinos u razumevanju kolonizacije vankomicin rezistentnim enterokokom u bolničkoj sredini i definisanju faktora rizika za identifikaciju osoba u riziku za VRE kolonizaciju.

Ispitivanje učestalost fekalne kolonizacije VRE sojevima kod hospitalizovanih pacijenata na odeljenjima sa povišenim rizikom od nastanka kolonizacije u Srbiji do sada nije rađeno, te rezultati ovog istraživanja predstavljaju važan doprinos proširivanju svesti i znanja o VRE kolonizaciji u Srbiji.

Utvrđivanjem genotipskih osobina VRE fm izolata i dobijanjem podataka o dominantnim genotipovima i genskim grupama u bolničkoj sredini u našoj zemlji i njihovoj međusobnoj povezanosti doprinela je upotpunjivanju globalne mape cirkulišućih VRE fm klonova. Kroz ovo istraživanje su dobijeni inicijalni podaci o molekularnoj epidemiologiji i genetskoj raznolikosti cirkulišućih VRE sojeva u Srbiji, koji mogu da posluže kao signal za detekciju potencijalnog izbijanja epidemije i koji ukazuju na to da je poreklo rezistencije na vankomicin kod *E. faecium* izolata iz ove studije posledica horizontalnog genskog transfera i selektivnog pritiska antimikrobnih lekova i to prvenstveno cefalosporina i flourohinolona koji su

identifikovani kao faktori rizika za VRE. Takođe, kroz ovo istraživanje identifikovani su pojedinačni faktori rizika od strane pacijenata, na koje bi strateški moglo da se deluje.

Ova doktorska disertacija je urađena prema svim principima naučnog istraživanja. Ciljevi su bili precizno definisani, naučni pristup je bio originalan i pažljivo izabran, 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 Ane Janjušević i odobri njenu javnu odbranu radi sticanja akademske titule doktora medicinskih nauka.

U Beogradu, 09.07.2021.

Članovi Komisije:

Prof. dr Slobodanka Đukić

Prof. dr Goran Stevanović

Prof. dr Biljana Mijović

Mentor:

Prof. dr Ivana Ćirković

Komentor:

Prof. dr Ljiljana Marković-Denić
