

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ
-обавезна садржина- свака рубрика мора бити попуњена

(сви подаци уписују се у одговарајућу рубрику, а назив и место рубрике не могу се мењати или изоставити)

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
<p>1. Датум и орган који је именовео комисију Дана 08.06.2016. године на седници Наставно-научног већа Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду донета је одлука о именовању комисије за оцену докторске дисертације др Анике Трудић под насловом „Фенотипско и генотипско доказивање карбапенемаза код мултирезистентних сојева <i>Escherichia coli</i> и <i>Klebsiella pneumoniae</i>“</p> <p>2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен:</p> <p>1. Доц. др Деана Медић, доцент на Катедри за микробиологију са паразитологијом и имунологијом Медицинског факултета у Новом Саду, Ужа научна област: Микробиологија, Датум избора у звање доцента 08.07.2014. године, запослена у Институту за јавно здравље Војводине;</p> <p>2. Проф. др Мира Михајловић Укропина, редовни професор на Катедри за микробиологију са паразитологијом и имунологијом Медицинског факултета у Новом Саду, Ужа научна област: Микробиологија, Датум избора у звање редовног професора 26.01.2016. године, запослена у Институту за јавно здравље Војводине;</p> <p>3. Проф. др Ивана Ђирковић, ванредни професор на Катедри за микробиологију Медицинског факултета Универзитета у Београду, Ужа научна област: Микробиологија, Датум избора у звање ванредног професора 17.05.2016. године, запослена на Медицинском факултету Универзитета у Београду и на Институту за микробиологију и имунологију Медицинског факултета Универзитета у Београду;</p>
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
<p>1. Име, име једног родитеља, презиме: Аника, Ђорђе, Трудић</p> <p>2. Датум рођења, општина, држава: 10.03.1983., Нови Сад, Србија</p> <p>3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив Медицински факултет Нови Сад, општа медицина, доктор медицине</p> <p>4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија 2009. година, докторске студије молекуларне медицине</p> <p>5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: /</p> <p>6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: /</p>

III НАСЛОВ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Фенотипско и генотипско доказивање карбапенемаза код мултирезистентних сојева *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Навести кратак садржај са назнаком броја страна, поглавља, слика, шема, графикона и сл. Докторска дисертација је написана на 129 страна и подељена у осам поглавља: увод (32 стране), циљеви истраживања (једна страна), хипотезе (једна страна), материјал и методе (10 страна), резултати (40 страна), дискусија (15 страна), закључак (2 стране) и литература (25 страна). Докторска дисертација је илустрована са 20 слика, 13 графикона и 23 табеле. Цитирано је 297 литературних навода.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Наслов докторске дисертације је јасно дефинисан, одражава суштину испитиване проблематике и директно указује на циљ испитивања.

Комисија сматра да је наслов јасан и прецизан.

Увод: У уводном делу докторске дисертације систематично и прегледно је изнет проблем мултипле резистенције код ентеробактерија, посебно код врста *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*. Детаљно је обрађена примена карбапенема, резервних антибиотика у лечењу инфекција изазваних мултирезистентним ентеробактеријама, као и механизми резистенције поменутих бактерија на ову групу антибактеријских лекова. Дат је преглед бета-лактамаза које се јављају код ентеробактерија, а посебно су обрађене оне које могу да доведу до резистенције на карбапенеме. Истакнута је улога порина и ефлукс пумпи у настанку резистенције на карбапенеме код ентеробактерија. На крају су представљене савремене фенотипске и генотипске методе за детекцију карбапенемаза.

Уводни део дисертације је на сажет начин представио најновија сазнања о проблематици изнетој у наслову.

Циљеви истраживања и хипотеза рада: Циљеви истраживања су јасно дефинисани: утврдити постојање резистенције на карбапенеме код мултирезистентних сојева *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* изолованих из клинички значајних узорака, доказати продукцију карбапенемаза коришћењем фенотипских и генотипских тестова, анализирати осетљивост изолата *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* са молекуларно доказаним карбапенемазама.

У складу са циљевима истраживања хипотезе су јасно дефинисане и предвиђају да је резистенција на карбапенеме значајно чешће присутна код изолата *Klebsiella pneumoniae* у односу на *Escherichia coli* изолованих из клинички значајних узорака, да се фенотипским тестом утврђује присуство карбапенемаза код 90% изолата резистентних на бар један карбапенем, да се међу фенотипски доказаним карбапенемазама гени резистенције који припадају КПЦ (*Klebsiella pneumoniae* карбапенемаза), ВИМ (Верона-интегроном кодирана метало-бета-лактамаза), НДМ (Њу Делхи метало-бета-лактамаза) или ОКСА-48 (оксацилиназа 48) типу налазе у више од 90% изолата, као и да изолати са доказаним карбапенемазама показују резистенцију на већи број антибиотика у односу на изолате који не продукују карбапенемазе.

Циљеви истраживања и хипотеза дисертације су јасно формулисани. Комисија сматра да имају пуно научно и друштвено оправдање, да су засновани на научно признатим методама, да одговарају актуелности теме и оцењује их позитивно.

Материјал и методе: У методологији је детаљно изложен начин прикупљања, обраде и презентације резултата. Описана је метода изолације и идентификације *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* из клиничких узорака, као и стандардна техника испитивања осетљивости изолата на антимикуробне лекове дифузионом и дилуционом методом. Детаљно су описани тестови за фенотипско испитивање бета-лактамаза проширеног спектра и карбапенемаза. Дат је детаљан протокол према ком је извршено доказивање гена *bla*_{CTX-M} за продукцију бета-лактамаза проширеног спектра, као и гена *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP} и *bla*_{OXA-48} који кодирају карбапенемазе методом ланчане реакције полимеразе. Описана је генотипизација одабраних мултирезистентних изолата *Klebsiella pneumoniae* која се базира на репетитивној ланчаној реакцији полимеразе. Дефинисане су примењене статистичке методе и начини приказивања резултата. Поставка методологије је таква да се истраживање може поновити.

Материјал и методологија истраживања су детаљно описани у дисертацији, прикладно одабрани и по мишљењу Комисије адекватни и подобни за ову докторску дисертацију.

Резултати: Резултати истраживања приказани су у више целина. У првом делу резултата приказане су опште карактеристике узорка: прикупљених 300 мултирезистентних изолата *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* у периоду од 01.11.2013 до 01.11.2014. године, приказани су у односу на изоловану бактеријску врсту, здравствену установу и одељење на ком су пацијенти били хоспитализовани у тренутку узорковања, као врсту клиничког материјала из ког су добијени изолати. Наведени су и демографски подаци пацијената код којих су изоловани мултирезистентни изолати *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*. У другом делу приказани су резултати изолата који су показали смањену осетљивост на бар један карбапенем, односно фенотипско и генотипско доказивање продукције бета-лактамаза проширеног спектра и карбапенемаза, као и врста и заступљеност детектованих гена који кодирају карбапенемазе. У трећем делу приказани су резултати изолата са доказаним карбапенемазама, односно детектовани гени који кодирају карбапенемазе у односу на резултат фенотипског теста, врсту бактерије, град из код потичу изолати, врсту материјала, одељење на ком су пацијенти били смештени у тренутку узорковања. Дат је приказ осетљивости изолата који продукују карбапенемазе диск дифузионом и дилуционом методом укупно, као и у односу на изоловану бактеријску врсту. У четвртм делу приказане су вредности минималних инхибиторних концентрација карбапенема и њихова интерпретација коришћењем важећих америчких препорука Института за клиничке и лабораторијске стандарде и препорука Европског комитета за испитивање антимикуробне осетљивости. У петом делу резултата приказане су минималне инхибиторне концентрације испитиваних антибактеријских лекова код изолата са доказаном продукцијом карбапенемаза и без доказане продукције карбапенемаза. У шестом делу резултата приказана је сродност одабраних мултирезистентних изолата *Klebsiella pneumoniae* методом генотипизације.

Резултати су прегледно приказани табеларно, графички и сликама уз јасно текстуално тумачење истих. Резултати произилазе из примењене методологије и изнесени су логичним редоследом уз опис и тумачење сваког приказаног резултата.

Резултати истраживања су уверљиво, разумљиво и прегледно приказани и адекватно статистички анализирани.

Дискусија: У поглављу дискусија, кандидат је систематично и јасно образложио добијене резултате фенотипског и генотипског доказивања карбапенемаза код мултирезистентних изолата *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*, као и резултате испитивања осетљивости на тестиране антимикуробне лекове. Резултати испитивања упоређени су са резултатима других истраживања у светлу савремених научних и стручних сазнања из испитиване области. Цитирани литературни

подаци су критички одабрани, актуелни и у значајној мери доприносе расветљавању проблематике којом се кандидат бави.

У дискусији кандидат је систематично, јасно и стручно образложио додијене резултате и упоредио их са актуелним и критички одабраним литературним подацима.

Литература: Изабрана литература је добро одабрана и обухвата велики број научних и стручних радова објављених у водећим светским и домаћим часописима.

Сви садржани литературни подаци су актуелни, критички одабрани и уверљиви. Библиографија је навођена по опште усвојеним правилима.

VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. Прво навести најмање један рад објављен или прихваћен за објављивање у часопису са ISI листе односно са листе министарства надлежног за науку када су у питању друштвено-хуманистичке науке или радове који могу заменити овај услов до 01.јануара 2012. године. У случају радова прихваћених за објављивање, таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду о томе.

1. **Trudić A**, Jelesić Z, Mihajlović-Ukropina M, Medić D, Zivlak B, Gusman V, Đilas M. Carbapenemase production in hospital isolates of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Serbia. *Vojnosanit Pregl* 2016. *In press* (M23)
2. Mihajlović-Ukropina M, **Trudić A**, Jelesić Z, Medić D, Milosavljević B, Zivlak B. Detection of carbapenemase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Srp Arh Celok Lek.* 2015. *In press* (M23)

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Резултати спроведеног истраживања указују на следеће:

1. Од 300 мултирезистентних изолата, било је 242 (80,7%) *Klebsiella pneumoniae* и 58 (19,3%) *Escherichia coli* изолованих из клиничких узорака.
2. Смањену осетљивост на бар један карбапенем (имипенем, меропенем, ертапенем) показало је 179 (59,7%) изолата.
3. Фенотипски тест за доказивање продукције бета-лактамаза проширеног спектра био је позитиван код 87/171 (50,9%) изолата. Ген *bla_{CTX-M}* је доказан код 111/121 (91,7%) изолата.
4. Фенотипски тест за доказивање продукције карбапенемаза био је позитиван код 65/179 (36,3%) изолата, код 63 (96,9%) је указивао на присуство метало-бета-лактамаза, а код 2 (3,1%) на присуство карбапенемаза из групе А. Сензитивност фенотипског теста за доказивање карбапенемаза класе А и Б износила је 100,0%, специфичност 96,6%, а укупна тачност 97,6%.
5. Карбапенемазе су нађене код 79/179 (44,1%) изолата резистентних на карбапенеме. Ген *bla_{NDM}* нађен је код 58 (32,4%) изолата, *bla_{OXA-48like}* код 11 (6,1%), а *bla_{KPC}* код 2 (1,1%) изолата. Гени *bla_{VIM}* и *bla_{IMP}* нису детектовани. Код 8 (4,5%) изолата нађена су 2 гена која

кодирају карбапенемазе, bla_{NDM} и $bla_{OXA-48like}$.

6. Одређивањем осетљивости диск дифузионом и дилуционом методом, изолати који продукују карбапенемазе показивали су смањену осетљивост на све тестиране бета-лактаме и гентамицин, односно тобрамицин. Висок проценат резистениције изолати су показали у односу на ципрофлоксацин, левофлоксацин и триметоприм/сулфаметоксазол. Најефикаснији антибиотски лекови су били амикацин, тигециклин, фосфомицин и колистин.
7. Поређењем минималних инхибиторних концентрација изолата који продукују и изолата који не продукују карбапенемазе утврђена је статистички значајна разлика за меропенем, имипенем, ертапенем, амикацин, гентамицин.
8. Генотипизацијом одабраних изолата *Klebsiella pneumoniae* клонално ширење је доказано међу изолатима који продукују НДМ и ОКСА-48 карбапенемазе у оквиру исте здравствене институције, али и међу различитим здравственим установама.

Закључци спроведеног истраживања указују да:

1. Мултирезистентни изолати *Klebsiella pneumoniae* резистентни на карбапенеме из клинички значајних узорака су статистички значајно чешћи од изолата *Escherichia coli*.
2. Код изолата који су показали смањену осетљивост према бар једном карбапенему, фенотипски тест за доказивање карбапенемаза класе А и Б био је позитиван код 65/179 (36,3%) изолата.
3. Код изолата који су показали смањену осетљивост према бар једном карбапенему гени који кодирају карбапенемазе нађени су код 79/179 (44,1%) изолата.
4. Код свих изолата са смањеном осетљивошћу на карбапенеме без продукције карбапенемаза доказано је присуство ЦТИКС-М (цефотаксимаза-Минхен) бета-лактамаза, које уз промене у протеинима спољашње мембране могу бити одговорне за смањену осетљивост на карбапенеме.
5. Међу генима који кодирају карбапенемазе bla_{NDM} је нађен код 58/79 (73,4%) изолата *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli*. Код 11/79 (13,9%) изолата *Klebsiella pneumoniae* детектовани су $bla_{OXA-48-like}$, а код 2/79 (2,5%) изолата bla_{KPC} гени. Гени bla_{VIM} и bla_{IMP} нису детектовани.
6. Код 8/79 (10,1%) изолата *Klebsiella pneumoniae* са доказаним карбапенемазама детектована су 2 гена која кодирају карбапенемазе, bla_{NDM} и $bla_{OXA-48-like}$. Наведена комбинација гена је специфична за наше подручје и ретко се јавља у Европи.
7. Изолати са доказаним карбапенемазама показују резистенцију на већи број антибиотика у односу на изолате који не продукују карбапенемазе. Поређењем минималних инхибиторних концентрација утврђена је статистички значајна разлика за амикацин, гентамицин, ертапенем, меропенем и имипенем код изолата који продукују карбапенемазе и изолата који не продукују карбапенемазе.
8. Код изолата који продукују карбапенемазе евидентиран је одређени проценат резистенције за тигециклин (17,5%), фосфомицин (7,6%) и колистин (5,1%). Како се наведени лекови користе у препорученим терапијским протоколима за лечење инфекција изазваних изолатима који продукују карбапенемазе, неопходно је испитати њихову осетљивост код сваког изолата са доказаним карбапенемазама у циљу одабира учинковите комбинације лекова.
9. Доказано је клонално ширење мултирезистентних изолата *Klebsiella pneumoniae* који продукују НДМ и ОКСА-48 ензиме у оквиру једне здравствене институције и међу различитим здравственим установама.
10. На основу првих свеобухватних података о присуству карбапенемаза на нашем подручју, све изолате ентеробактерија са смањеном осетљивошћу на карбапенеме би требало испитати у

правцу продукције карбапенемаза без обзира на метод одређивања осетљивости. Тестове за фенотипску детекцију карбапенемаза би требало користити у микробиолошким лабораторијама у складу са важећим европским препорукама, а коначну потврду механизма резистенције треба извршити молекуларним методама у референтној лабораторији.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

Кандидат је показао систематичан научно-истраживачки приступ у анализи великог броја прикупљених података. Резултати истраживања у односу на постављене циљеве приказани су систематично, јасно и прегледно помоћу табела, графикана и слика уз одговарајуће тумачење у тексту. Подаци добијени у току истраживања обрађени су и анализирани помоћу адекватних статистичких тестова. Кандидаткиња је резултате дисертације јасно и прецизно тумачила и поредила са резултатима истраживања домаћих и страних аутора.

Комисија закључује да се приказ и тумачење резултата истраживања, које је спроведено у оквиру докторске дисертације, могу сматрати адекватним и коректним, те даје позитивну оцену за начин приказа и тумачење резултата истраживања.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме
Дисертација је написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе
Дисертација садржи све битне елементе научног рада на основу којих би истраживање могло бити поновљено.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци
Дисертацију карактерише значајан научни допринос јер је по први пут у нашој земљи извршено свеобухватно истраживање присуства карбапенемаза код ентеробактерија изолованих из клиничког материјала. Фенотипска и генотипска детекција карбапенемаза међу изолатима *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* довела је до првих сазнања о врсти и заступљености карбапенемаза међу наведеним бактеријама на нашем подручју. Такође, разјашњени су механизми резистенције на карбапенеме код изолата код којих није утврђено присуство карбапенемаза, а показивали су смањену осетљивост на карбапенеме. На основу спроведеног истраживања дате су препоруке микробиолошким лабораторијама за детекцију карбапенемаза. Утврђено је присуство екстензивно резистентних изолата *Klebsiella pneumoniae* који су осим неосетљивости на карбапенеме, показали резистенцију на колистин, тигециклин или фосфомицин, лекове који се користе у терапији инфекција изазваних таквим сојевима. Тиме се указује на потребу не само за испитивањем осетљивости изолата који продукују карбапенемазе, већ и за применом адекватних епидемиолошких мера са циљем спречавања ширења таквих сојева, као и за што рационалнијом применом антимикуробних лекова која би превенирала даљи развој и ширење резистенције.

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања
Докторска дисертација не садржи формалне нити суштинске недостатке који би могли утицати на резултате истраживања.

X ПРЕДЛОГ:
На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:
На основу укупне оцене дисертације, Комисија предлаже Наставно-научном већу Медицинског факултета у Новом Саду и Сенату Универзитета у Новом Саду да се докторска дисертација под насловом „Фенотипско и генотипско доказивање карбапенемаза код мултирезистентних сојева <i>Escherichia coli</i> и <i>Klebsiella pneumoniae</i> “ прихвати и кандидату одобри одбрана.

датум: 24.06.2016.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

Доц. др Деана Медић, доцент Медицинског факултета, Универзитета у Новом Саду, Катедра за микробиологију са паразитологијом и имунологијом, председник

Проф. др Мира Михајловић Укропина, редовни професор Медицинског факултета, Универзитета у Новом Саду, Катедра за микробиологију са паразитологијом и имунологијом, члан

Проф. др Ивана Ћирковић, ванредни професор Медицинског факултета, Универзитета у Београду, Катедра за микробиологију, члан