

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
КРАГУЈЕВАЦ**

**1. Одлука Наставно-научног већа**

Одлуком Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, број 01-13901/3-2 од 25.12.2013. године, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др Милене Мишић, под називом:

**„Дистрибуција фенотипова и гена резистенције на макролиде и линкозамиде код грам-позитивних кока.”**

На основу одлуке Већа, предложена Комисија у саставу:

- 1. Проф. др Драган Миловановић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, председник;
- 2. Проф. др Дејан Баскић**, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан;
- 3. НС Дејан Видановић**, научни сарадник, Одељење за лабораторијску дијагностику, Ветеринарски специјалистички институт "Краљево", за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.

подноси Наставно-научном већу Факултета следећи

**2. Извештај комисије о подобности теме**

**2.1. Кратка биографија**

Милена Мишић је рођена 17. јула 1973. године у Лесковцу. Медицински факултет Универзитета у Новом Саду завршила је 1999. године са просечном оценом 9,15. Специјалистичке студије из области *Микробиологија са паразитологијом* завршила је са оценом *одличан* на Медицинском факултету Универзитета у Нишу 2008. 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. Магистарске студије из области *Микробиологија и имунологија* уписала је школске 2000/2001. године на Медицинском факултету Универзитета у Нишу, а академско звање магистра медицинских наука стиче 12. фебруара 2010. године, одбравивши магистарску тезу под насловом *Повезаност бактеријске вагинозе са преканцерозним променама на грлићу материце*. Активно пише, чита и говори енглески језик, удата је и мајка је троје деце.

## 2.2. Наслов, предмет и хипотеза докторске дисертације

**Наслов:** Дистрибуција фенотипова и гена резистенције на макролиде и линкозамиде код грам-позитивних кока.

**Предмет:** Утврдити и упоредити учесталост фенотипова и гена МЛСб резистенције за изолате бактерија врсте *Staphylococcus aureus*, коагулаза негативне стафилококе, *Enterococcus* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, коришћењем D-теста и PCR-теста према: врстама бактерија, врстама материјала и пореклу материјала.

**Хипотеза:** Постоји статистички значајна разлика у учесталости фенотипова и гена МЛСб резистенције између различитих врста грам-позитивних кока, између болничких и амбулантних изолата и између различитих врста материјала.

## 2.3. Подобност кандидата

Кандидат је објавио радове у целини у часописима са рецензијом, укључујући два рада у међународним часописима на СЦИ листи и више радова у домаћим часописима који су индексирани у међународним цитатним базама примарне литературе. Кандидат је у четири рада први аутор, чиме је испунио услов за пријаву докторске тезе.

1. 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 Journal. 2011; 5(6) Suppl.1:2088–2096. M23, 3 бода
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. DOI: 10.4103/0255-0857.124304; M23, 3 бода
3. Mišić M, Milić B, Vasić A, Zdravković D, Tasić A, Miladinović Tasić N, Tasić S. Sarcosporidiosis – Medical Importance and Diagnosis. Acta medica Medianae 2004; 43(3):73–6. M52, 1.5 бод
4. Mišić M, Randelović G, Kocić B, Antić S, Stojanović M, Mladenović V. Complications associated with bacterial vaginosis. Acta Fac Med Naiss 2005; 22(4):161–5. M52, 1.5 бод
5. Mišić M, Miladinović Tasić N, Tasić S. Seroincidence of trichinella infection in the Nisava district. Acta medica Medianae 2006; 45(4): 23–7. M53, 1 бод
6. Miladinović Tasić N, Tasić S, Mišić M. Trichinosis. Acta Fac Med Naiss 2006; 23(4): 215–22. M52, 1.5 бод
7. Randelović G, Kocić B, Stojanović M, Mišić M, Mladenović V. Bacteriological findings of the vulvar swab specimens from girls with vulvovaginitis. Facta universitatis Medicine and Biology 2005; 12(3): 159–63. M52, 1.5 бод

## 2.4. Преглед стања у подручју истраживања

Антибиотици из групе макролида, линкозамида и стрептограмина хемијски нису сродна једињења, али имају сличан механизам деловања на бактерије, тј. сви они инхибирају синтезу протеина. Због тога, резистентност на један од ових антибиотика може довести до укрштене резистентности на остале антибиотике ове групе. Још давне 1969. године примећена је повезаност резистенције на еритромицин и клиндамицин.

Касније је показано да се индуцибилна резистенција на клиндамицин може конвертовати у конститутивну, а бројни извештаји о неуспеху терапије инфекција изазваних стафилококама, које показују индуцибилни тип МЛС резистенције, потврђују претходне налазе. Сојеви грам-позитивних бактерија, које 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 антибиотицима могу развити конститутивни тип резистенције. У тим случајевима терапијска употреба клиндамицина може довести до селекције конститутивних МЛСб мутаната и неуспеха терапије. Због тога је неопходно да се у рутинском раду сви еритромицин-резистентни сојеви стафилокока испитају D-тестом, како би се издвојили сојеви који имају генетски потенцијал да током терапије развију резистенцију од сојева који су заиста осетљиви на клиндамицин.

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. Због свега наведеног неопходно је да се D-тест имплементира у рутински рад свих микробиолошких лабораторија, чиме би се направила разлика између сојева који показују праву осетљивост на клиндамицин и оних који показују индуцибилну клиндамицин-резистенцију.

## 2.5. Значај и циљ истраживања

### *Значај студије*

Тестирањем осетљивости грам-позитивних кока на клиндамицин рутинском диск-дифузионом методом са раздвојеним дисковима еритромицина и клиндамицина, може се добити лажна осетљивост на клиндамицин. Међутим, коришћењем D-теста индуцибилна резистенција се може поуздано доказати, те се клиндамицин у тим случајевима може са сигурношћу користити код пацијената инфицираних сојевима бактерија који су осетљиви на тај антибиотик. Сходно томе, резултати ове дисертације биће од значаја за стварање концепта адекватног терапијског приступа при избору и употреби антимикуробних лекова у терапији инфекција изазваних грам-позитивним кокама. Поред тога, очекује се добијање прецизних података о учесталости МЛСб фенотипова резистенције, раздвајање изолата са правом осетљивошћу на клиндамицин од изолата са индубицилном клиндамицин-резистенцијом, као и добијање релевантних података о механизмима и нивоу резистентности изолованих бактеријских сојева на испитиване антибиотике.

### *Циљеви и хипотезе студије*

Основни циљ овог научног рада је утврдити један од пет фенотипова МЛСб резистенције за изолате бактерија врсте *Staphylococcus aureus*, коагулаза негативне стафилококе, *Enterococcus* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, коришћењем D-теста и идентификовати гене одговорне за МЛСб резистенцију: *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *msr(A)*, *msr(B)*, *mef(A)*, *mef(E)*, *lnu(A)*, *lnu(B)* за исте изолате бактерија, коришћењем PCR теста.

Секундарни циљеви јесу да се утврди учесталост фенотипова и гена МЛСб резистенције код метицилин резистентних и осетљивих стафилокока према: врстама бактерија, врстама материјала (брисеви грла и носа, генитални секрет, пиокултуре) и пореклу материјала (амбулантни и болнички) и да се утврди сензитивност и специфичност D-теста, на основу присуства *erm* гена, код изолата који су показали МЛСб фенотип резистенције.

Основна хипотезе студије је да постоји статистички значајна разлика у учесталости фенотипова и гена МЛСб резистенције између метицилин-резистентних и осетљивих стафилокока.

Секундарне хипотезе студије су да постоји статистички значајна разлика у учесталости фенотипова и гена МЛСб резистенције између различитих врста грам-позитивних кока, између болничких и амбулантних изолата грам-позитивних кока и између изолата грам-позитивних кока изолованих из различитих врста материјала.

## 2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Сложени механизми резистентције на МЛС антибиотику, који укључују модификацију рибозома, активно избацивање и модификацију антибиотика, доводе до различитих фенотипова резистентности. Метилазе изазивају структурне промене у рибозомима прокариота, које доводе до смањеног везивања МЛС антибиотика за циљно место деловања на 50S подјединици рибозома. Породица ензима одговорних за метилацију је означена скраћеницом *erm* (од енгл. *Erythromycin Resistance Methylase*). Пет *erm* гена откривено је код бактерија *S. aureus*: *ermA*, *ermC*, и мање присутни *ermB*, *ermF* и *ermY*. Метилација аденина А2058, који се налази у региону пептидил трансферазе унутар V домена на 23S RNK-компоненти 50S рибозомске подјединице бактерија, доводи до унакрсне резистентности на макролиде, линкозамиде и стрептограмине групе Б (МЛСб). Овај профил резистенције је познат као МЛСб фенотип који може бити индуцибилан и конститутиван (иМЛСб и цМЛСб). Резистентност на макролиде код бактерија *Streptococcus pyogenes* је примарно кодирана *erm* генима, *erm(A)/erm(TR)* и *erm(B)*. Код бактерија *Streptococcus agalactiae* резистентност на еритромицин и клиндамицин се углавном приписује *erm(B)*, *erm(A)/erm(TR)* и *erm(C)* генима. На ограниченом броју изолата бактерија *Streptococcus pneumoniae* и *Enterococcus* spp. доминантно су описани *ermB* гени. DiPersio и сарадници су први објавили присуство *erm(T)* гена резистенције код бактерија *Streptococcus β-haemolyticus* групе Д и *Enterococcus* spp.

## 2.7. Методе истраживања

### *Врста студије*

Експериментална студија на микроорганизмима *in vitro*.

### *Бактеријски сојеви*

У испитивање ће бити укључени клинички изолати грам-позитивних кока: *Staphylococcus aureus*, коагулаза-негативне стафилококе, *Enterococcus* spp, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* и *Streptococcus pyogenes* и референтни сојеви *Escherichia coli* ATCC 25922, *S.aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Бактерије ће бити изоловане из редовног материјала који се упућује у Центар за микробиологију Завода за јавно здравље у Врању у периоду између новембра 2013. и априла 2014. године.

У студију ће бити укључен само по један изолат од сваког пацијента. Изолати ће бити преузети из различитих врста материјала и то 750 изолата из брисева грла и носа, 750 из пиокултура и 750 из гениталних секрета и из материјала различитог порекла, укључујући изолате амбулантног и болничког порекла.

### *Материјал и методе*

У студији ће се као варијабле испитивати: врста бактерија и осетљивост на антибиотике, МЛСб фенотипови резистенције и гени МЛСб резистенције.

*Микробиолошко испитивање.* Микробиолошко испитивање подразумеваће идентификацију бактерија и испитивање њихове осетљивости на примењиване антибиотике. Сви приспели узорци биће засејани на храњиву неселективну подлогу крвни агар и инкубирани 18 до 24 часа на 37°C у термостату у аеробним условима. Бактерије ће бити идентификоване у зависности од морфологије њихових колонија, класичном биохемијском идентификацијом и серолошком идентификацијом. Испитивање осетљивости изолованих бактерија на антибиотике (антибиограм) биће рађено према препорукама Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Метицилин резистенција код стафилокока биће утврђена уз помоћ диска цефокситина који садржи 30 µg лека.

*Утврђивање фенотипова МЛСб резистенције.* Фенотипови резистенције на макролиде и линкозамиде биће утврђени D-тестом са растојањем између дискова еритромицина (15 µg) и клиндамицина (2 µg) од 12 mm (ивица од ивице). Антимикробна активност биће очитавана као пречник зоне инхибиције у mm. Изолати ће бити класификовани као осетљиви (S), резистентни (R) и интермедијарно осетљиви (I), према критеријумима CLSI-а. Заравњење зоне инхибиције око клиндамицин-диска са стране окренуте еритромицин-диску, у облику великог латиничног слова D, указује на иМЛСб фенотип резистенције или позитиван D-тест. Резистентност на оба антибиотика, и еритромицин и клиндамицин, указује на цМЛСб фенотип резистенције. Осетљивост или интермедијарна осетљивост на еритромицин и резистентност на клиндамицин са каналом инхибиције између диска еритромицина и клиндамицина указује на Л/ЛСб фенотип резистенције. Резистентност на еритромицин и осетљивост на клиндамицин указује на М/МС фенотип резистенције. Пети фенотип показују сојеви бактерија који су осетљиви и на еритромицин и на клиндамицин. Диск-дифузиона метода биће редовно контролисана стандардним контролним микроорганизмима чија је осетљивост позната.

*Идентификација гена МЛСб резистенције.* Бактеријска ДНК ће се екстраховати QIAamp DNA миникитом (Qiagen, Inc., Valencia, Calif.), према протоколу произвођача. Екстрахована ДНК чуваће се на -20°C све док се не изврши PCR тест. Мултиплекс PCR ће се извршити са олигонуклеотидним прајмерима специфичним за *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *msr(A)*, *msr(B)*, *mef(A)*, *mef(E)*, *lnu(A)*, *lnu(B)*, *spa*, *mec(A)* и *mec(C)* гене, умножавањем фрагмената испитиваних гена. Свака реакција биће изведена у коначном волумену од 50 µl и укључиваће 2 µl геномске ДНК, 1 µl сваког прајмера (Invitrogen), 25 µL Maxima® Hot Start Green PCR Master Mix (Fermentas) и 21 µl DEPC H<sub>2</sub>O. Позитивне и негативне контроле биће укључене у сваки тест. Умножавање ће се извршити на GeneAmp 9700 термосајклеру (Applied Biosystems, Inc.). Протокол PCR реакције ће имати један циклус денатурације (на 94°C), 35 циклуса амплификације (30 сек. денатурације на 94°C, 1 мин. хибридизације на 52°C, 1 мин. елонгације на 72°C) и корак финалне екстензије (5 мин. на 72°C). Амплификовани продукти ће се детектовати гел-електрофорезом на E-Gel iBase (Invitrogen) на 2% (w/v) агарозном гелу (E-Gel® 2%, Invitrogen) и визуализовати на Gel Doc XR system (Bio-Rad).

Адекватна величина узорка за поређење пропорција Fisher exact тестом је израчуната за алфа грешку од 0,05, снагу студије од 0,80 и однос 1:1 за број изолата у експерименталној и контролној групи, коришћењем програма G\*Power 3.1.6. Полазећи од прелиминарних резултата, где је заступљеност иМЛСб фенотипа резистенције код изолата бактерија *Staphylococcus aureus* 41,31%, а код коагулаза негативних стафилокока 32,80%, минималан број изолата које треба испитати је 1052 (по 526 изолата у свакој поређеној групи) за однос 1:1, односно 1161 (по 774 и 387 изолата у свакој од група) за однос 2:1.

Подаци ће бити анализирани коришћењем програма EPI INFO 6. За поређење вредности нумеричких варијабли између испитиваних група користиће се Студентов т-тест (подаци дистрибуирани према нормалној расподели), или Ман-Витни тест, у случају непараметарске дистрибуције. Код категоријалних варијабли ће се користити  $\chi^2$  тест или Фишеров тест, уколико нека од очекиваних фреквенција буде нижа од 5. Очекује се да варијабилност измерених нумеричких вредности у свакој од група не буде већа од 1 стандардне девијације. Експериментално добијени резултати биће приказани табеларно и графички, коришћењем програма Excel из софтверског пакета Microsoft Office 2010.

## 2.8. Очекивани резултати докторске дисертације

На основу прелиминарног истраживања, очекује се већа учесталост иМЛСб и цМЛСб фенотипа резистенције код метицилин резистентних сојева бактерија *S.aureus*. Статистички значајно већа учесталост осетљивих сојева на оба антибиотика очекује се у групи метицилин осетљивих стафилокока. Код бактерија врсте *S. aureus* очекује се да сојеви са иМЛСб фенотипом резистенције буду носиоци *erm(A)* гена, док се код коагулаза негативних стафилокока очекује значајна учесталост *erm(C)* гена. Као најучесталији фенотип резистенције код бактерија рода *Enterococcus* очекује се цМЛСб, док се код бактерија врсте *S. pyogenes* очекује фенотип са осетљивошћу на оба антибиотика. Очекује се висока учесталост М фенотипа резистенције код бактерија врсте *S.pneumoniae*. Код бактерија врсте *S. aureus* очекује се већа учесталост иМЛСб и цМЛСб фенотипа резистенције за амбулантне изолате, за разлику од коагулаза негативних стафилокока, где се очекује статистички значајно већа учесталост ових фенотипова резистенције за болничке изолате.

## 2.9. Оквирни садржај дисертације

Резистентност на макролиде, линкозамиде и стрептограмине Б (МЛСб) код грам-позитивних кока може бити посредована *msrA/B*, *mefA/E* и *erm* генима, који доводе до настанка индуцибилне (иМЛСб) или конститутивне (цМЛСб) резистентности на ове антибиотике. Бактеријски сојеви који показују иМЛСб фенотип резистенције имају високи степен мутације и могућност конверзије у конститутивну МЛСб резистенцију. Исход лечења инфекција изазваних сојевима који показују иМЛСб фенотип резистенције може бити неповољан или фаталан након његове конверзије у цМЛСб фенотип. Циљ ове студије јесте да се утврди учесталост фенотипова и гена МЛСб резистенције на клиничким изолатима грам-позитивних кока.

## 2.10. Предлог ментора

За ментора рада, Комисија предлаже проф. др Дејана Баскића, ванредног професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија.

## **2.11. Научна област дисертације**

Медицина. Ужа област: Микробиологија

## **2.12. Научна област чланова комисије**

- 1. Проф. др Драган Миловановић**, председник, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармакологија и токсикологија,
- 2. Проф. др Дејан Баскић**, ванредни професор Факултета медицинских наука универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан;
- 3. НС Дејан Видановић**, научни сарадник, Одељење за лабораторијску дијагностику, Ветеринарски специјалистички институт "Краљево", за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.

## Закључак и предлог комисије

1. На основу досадашњег научно-истраживачког рада и публикованих резултата, кандидат др Милена Мишић испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.
2. Предложена тема је научно оправдана, дизајн истраживања је прецизно постављен и дефинисан, методологија је јасна. Студија би била оригинално научно дело, где би се утврдила учесталост фенотипова и гена МЛСб резистенције на клиничким изолатима грам-позитивних кока.
3. Комисија сматра да ће предложена докторска теза др Милене Мишић, под менторством проф. др Дејана Баскића, бити од великог научног значаја у смислу добијања прецизних података о учесталости МЛСб фенотипова резистенције, раздвајања изолата са правом осетљивошћу на клиндамицин од изолата са индубицилном клиндамицин-резистенцијом, као и добијања релевантних података о механизмима и нивоу резистентности изолованих бактеријских сојева на испитиване антибиотике.
4. Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Медицинског факултета у Крагујевцу да прихвати пријаву теме докторске дисертације кандидата др Милене Мишић под називом **„Дистрибуција фенотипова и гена резистенције на макролиде и линкозамиде код грам-позитивних кока.”** и одобри њену израду.

**Проф. др Драган Миловановић**, председник, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Фармакологија и токсикологија

---

**Проф. др Дејан Баскић**, члан, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија

---

**НС Дејан Видановић**, научни сарадник, Одељење за лабораторијску дијагностику, Ветеринарски специјалистички институт "Краљево", за ужу научну област Микробиологија и имунологија

---

У Крагујевцу, 21.01.2014. године