

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**  
**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

**1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу**

Одлуком Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, број 01-2873/3-12 од 13.04.2016, именовани су чланови Комисије за оцену научне заснованости теме докторске дисертације кандидата др мед. **Снежане Матић** под називом:

„ВАЛИДАЦИЈА НОВЕ МИКРОСКОПСКЕ МЕТОДЕ У ДИЈАГНОСТИЦИ БАКТЕРИЈСКИХ ВАГИНОЗА ПРИМЕНОМ PCR И real-time PCR“

На основу одлуке Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, формирана је Комисија у саставу:

1. проф. др Маја Ћупић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област *Микробиологија*, председник;
2. доц. др Марија Шорак, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област *Гинекологија и акушерство*, члан;
3. доц. др Биљана Љујић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Генетика*, члан;
4. доц. др Александра Димитријевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Гинекологија и акушерство*, члан;
5. доц. др Марија Миловановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Микробиологија и имунологија*, члан.

На основу увида у приложену документацију, Комисија подноси Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу следећи

**ИЗВЕШТАЈ**

Кандидат др мед. Снежана Матић, испуњава све услове предвиђене Законом о високом образовању и Статутом Факултета медицинских наука у Крагујевцу за израду докторске дисертације.

## 2.1 Биографија кандидата

### А. Лични подаци

Рођена 02.12.1977. године у Крагујевцу. Основну школу и средњу медицинску школу завршила у Крагујевцу. Интегрисане академске студије Медицинског факултета, Универзитета у Крагујевцу уписала 1996/1997. и успешно завршила 2003. године са просечном оценом 9,40. Школске 2005/06. уписала Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација. Положила је усмени докторски испит са оценом 10 (десет). Осам година радила на Факултету Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу као асистент за ужу научну област Микробиологија и имунологија (2003-2011). Специјалистички испит из микробиологије и имунологије положила 2012. године са одличном оценом. Од 2013. године ради у приватној микробиолошкој лабораторији „Микромедика“ где је и оснивач.

### Б. Научно истраживачки рад

Кандидат, др мед. Снежана Матић је учествовала као сарадник на неколико пројеката Министарства просвете, науке и технолошког развоја:

1. Фагоцити и хумани малигноми (2001-2006);
2. Имунорегулаторне интерреакције у туморима и аутоимунским феноменима (2006-2011);
3. Утицај IL-33/ST2 сигналног пута и галектина-3 на патогенезу експерименталних периапикалних лезија (2011).

### В. Подаци о објављеним радовима

В1. Радови објављени у часописима међународног значаја:

1. Baskic D, Ristic P, **Matic S**, Bankovic D, Popovic S. and Arsenijevic N. Clinical evaluation of the simultaneous determination of CA 15-3, CA 125 and sHER2 in breast cancer. Biomarkers 2007; 12(6):657-67. **M22, 5 бодова**
2. Sorak M, Arsenijevic S, Lukic G, Arsenijevic N, Ristic P, **Pavlovic S**, Popovic S. and Baskic D. Relationship of serum levels of tumor markers with tissue expression of gene products in ovarian carcinoma. J BUON 2007; 12(1):99-104. **M23, 3 бода**

В2. Зборници међународних скупова

1. Arsenijevic NN, Ristic P, Popovic S, Jovanovic I, Jevtic A, **Pavlovic S** and Baskic D. Altered pattern of IFN-gamma, IL-18 and nitric oxide production in breast cancer at different clinical stage. The 3rd International Conference of Tumor Microenvironment: Progression, Therapy and Prevention, Prague, 2004, p146. **M34, 0.5 бода**

2. Arsenijevic N, Baskic D, Ristic P, Popovic S, Jevtic A, **Pavlovic S** and Acimovic Lj. Relationship of serum HER-2, CA 15-3 and CA 125 in patients with breast cancer. 5th Congress of B.U.ON, Belgrade, 2004, p A-5. **M34, 0.5 бода**
3. Baskic D, Ristic P, Popovic S, Jovanovic I, Jevtic A, **Pavlovic S** and Arsenijevic NN. Supernatants from primary breast cancer tissue cultures induces IL-18 and nitric oxide, but not IFN-gamma production in human peripheral blood mononuclear cells in vitro. The 3rd International Conference on Tumor Microenvironment: Progression, Therapy and Prevention, Prague, 2004, p71. **M34, 0.5 бода**
4. Baskic D, Ristic P, Popovic S, Jevtic A, **Pavlovic S** and Acimovic Lj and ArsenijevicN. Significance of increased serum level of IFN-gamma, IL-18 and nitric oxide in breast cancer patients. 5th Congress of B.U.ON, Belgrade, 2004, p A-50. **M34, 0.5 бода**
5. Nenadic D, **Matic S**, Pavlovic M, Baskic D. Diagnosing of bacterial vaginosis needs new scoring system. 9th Balkan Congress of Microbiology, Thessaloniki. Acta Microbiologica Hellenica 2015; 60(3): 175. **M34, 0.5 бода**

### V3. Часописи националног значаја

1. Baskic D, Djurdjevic P, Djukic A, Lazic I, **Pavlovic S** and Arsenijevic N. Nitric oxideproduction in the culture of mononuclear leukocytes modulated by soluble products oftumor cells. Medicus 2001; 2/2: 29-31.
2. **Pavlovic S**, Baskic D, Ristic P and Arsenijevic N. HER2, overexpression on malignant cells. Medicus 2004;5(1):22-26. **M52, 1,5 бод**
3. D. Baskic, P. Ristic, **S. Pavlovic**, N. Arsenijevic. Serum HER2 and CA 15-3 in breast cancer patient. Journal of BUON 2004; 9:289-294. **M51, 1 бод**
4. Baskic D, Radosavljevic G, Cokanovic V, Jevtic I, Zelen I, Popovic S, **Pavlovic S** and Arsenijevic N. Serum levels of NO, IL-18 and MDA in patients with breast carcinoma. Medicus 2005; 6(2): 62-65. **M52, 1,5 бод**
5. **Matic S**. Cancer stem cells, a myth or real target. Serbian Journal of Experimental and Clinical Research 2010; 11(4): 163-170. **M52, 1,5 бод**
6. **Matic S**, Ninkovic V, Arsovic A, Obrenovic N, Baskic D. Sensitivity of urinary pathogens to antibiotics in primary health care patients. Medicinski casopis 2012; 46(3):126-131. **M53, 1 бод**

## 2.2. Наслов, предмет и хипотезе докторске тезе

Наслов:

" Валидација нове микроскопске методе у дијагностици бактеријских вагиноза применом PCR и real-time PCR "

Предмет:

Бактеријска вагиноза је поремећај вагиналне флоре који настаје услед неравнотеже односа лактобацила (који имају заштитну улогу) и анаеробних бактерија, у корист анаероба. Бактеријска вагиноза је често асимптоматска што је чини дуго непрепознатом и тиме и лабораторијски неидентификованом. Од посебног значаја је улога БВ у периоду гравидитета када може да доведе до нежељених исхода као што су побачај или превремено прснуће плодових овојница те превременог порођаја. Предмет ове студије је испитивање састава вагиналног микробиома, са акцентом на идентификацију микроорганизама који су најчешће удружени са бактеријском вагинозом: *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*, уз квантификацију укупног вагиналног микробиома. Крајњи циљ је поређење резултата добијених молекуларном анализом и резултата испитивања вагиналних размаза категорисаних по Амселу, као и поређење резултата молекуларне анализе са резултатима размаза бојених по Граму категорисаних на основу различитих микроскопских критеријума укључујући и модификовани метод микроскопирања (Ненадић и сар., 2015) (1). Очекује се да резултати ове студије покажу повезаност квантума и типа вагиналног микробиома испитаног техникама молекуларне биологије са резултатима клиничке и микроскопске анализе. Такође, пажљива анализа резултата ове студије би требало да обезбеди смернице у успостављању прецизнијих дијагностичких критеријума за бактеријску вагинозу.

## Хипотезе:

### Примарна хипотеза

Постоји слагање резултата добијених PCR и real-time PCR анализом са резултатима евалуације вагиналног секрета добијених употребом Амселовог критеријума (клинички критеријум) и резултата анализе вагиналних размаза бојених по Граму добијених категоризацијом по Нуценту, Исон/Хају, Клејсу и микроскопској методи по Ненадићу и сар.

### Секундарне хипотезе

1. Категорије вагиналног секрета утврђене студијским методама су квалитативне (I, II, III) и квантитативне (празан, умерен, пун);
2. У узорцима препарата вагиналних секрета бојених по Граму се налазе *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*;
3. *Lactobacillus spp*, доминира у нормалним (I) а *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*, у налазима вагиналних секрета класификованих као бактеријска вагиноза (III), при чему је њихов однос уравнотежен у интермедијарним налазима (II);

4. Укупни вагинални микробиом високо корелира са резултатима квантитативне категориције (празан, умерен, пун) вагиналних размаза, бојених по Граму, класификованих према микроскопској методи по Ненадићу и сар.

### **2.3. Испуњеност услова за пријаву теме докторске дисертације**

У току студија, др мед. Снежана Матић је објавила више радова у часописима међународног и националног значаја, од чега један рад као први аутор чиме је испунила услов за пријаву докторске тезе.

Релевантна референца:

Matic S. Cancer stem cells, a myth or real target. Serbian Journal of Experimental and Clinical Research 2010; 11: 163-170.

### **2.4. Преглед стања у подручју истраживања**

Бактеријска вагиноза (БВ) је један од најчешћих поремећаја микробиома вагине. Бактеријска вагиноза је поремећај вагиналне флоре који настаје пролиферацијом Грам-негативних/варијабилних анаероба и последичне редукције вагиналних лактобацила (бактерија које имају заштитну улогу). Заправо, вагинални лактобацили користе гликоген из вагиналне средине, као хранљиви састојак, који преводе у водоник-пероксид. Ослобођени водоник-пероксид снижава рН вредност вагиналног секрета, што онемогућава размножавање патогених микроорганизама. Поред тога, одређени сојеви лактобацила производе и бактериоцине (супстанце које инхибирају раст осталих бактерија у окружењу, нпр. раст *G. vaginalis*). Квалитативна и квантитативна структура бактеријске вагинозе није константна и није у потпуности дефинисана. Може се састојати од више од 80 родова и хиљаде врста, као што су *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella spp*, *Atopobium spp*, *Mobiluncus spp*, *Sneathia saguinegens*, *Leptotrichia amnionii*, *Megasphaera* тип 1 и 2, *Eggerthella spp* итд.

Преваленција БВ варира међу различитим етничким групама у Северној Америци, Европи, Средњем истоку, или Азији. Глобална епидемиолошка студија је показала да је преваленција БВ била врло висока у неким деловима Африке, за разлику од ниске преваленције се региструје у већем делу Азије и Европе. Како сексуално понашање може повећати ризик од настанка БВ, тако присуство БВ може повећати ризик (у односу на жене без БВ) од инфекције другим сексуално преносивим микроорганизмима (*Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, HSV2, HIV). Иако бактеријска вагиноза може бити присутна без појаве било каквих симптома, не треба занемарити њен патогени потенцијал посебно у трудноћи, када се повезује са нежељеним исходима као што су побачај или превремени порођај.

Када су у питању индетерминантни случајеви који се односе на II групу вагиналног секрета по Нуценту (случајеви на „граници“ између нормалних налаза и БВ) и када су конвенционалне методе бактериолошке дијагностике недовољне за поуздану дијагностику БВ, молекуларне методе представљају методологију избора. У том смислу је потребно обавити додатна истраживања ради боље анализе вагиналног микробиома (како квалитативне, тако и квантитативне) и успостављања адекватних дијагностичких протокола, методе микроскопирања односно молекуларне.

## 2.5. Значај и циљ истраживања са становишта актуелности у одређеној научној области

### Примарни циљ

Утврдити да ли постоји слагање резултата добијених PCR и real-time PCR анализом са резултатима евалуације вагиналног секрета добијених употребом Амселовог критеријума (клинички критеријум) и резултата анализе вагиналних размаза бојених по Граму добијених категоризацијом по Нуценту, Исон/Хају, Клејсу и микроскопској методи по Ненадићу и сар.

### Секундарни циљеви

1. Категорисати вагиналне секрете на основу Амселових клиничких критеријума и микроскопских критеријума по Нуценту, Исон/Хају, Клејсу и Ненадићевој микроскопској методи.
2. Идентификовати и квантификовати *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae* у предходно категорисаним препаратима вагиналних.
3. Квантификовати укупни вагинални микробиом.
4. Одредити релативни однос *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*, међусобно и у односу на укупни вагинални микробиом.
5. Утврдити да ли постоји слагање резултата добијених PCR и real-time PCR анализом са резултатима квалитативне категоризације (I, II, III) вагиналних секрета добијених употребом Амселовог критеријума (клинички критеријум) и критеријума по Нуценту, Исон/Хају, Клејсу и микроскопској методи по Ненадићу и сар.
6. Утврдити да ли постоји слагање резултата добијених real-time PCR анализом са резултатима квантитативне категоризиције (празан, умерен, пун), вагиналних размаза бојених по Граму, класификованих по микроскопској методи по Ненадићу и сар.

## 2.6. Веза истраживања са досадашњим истраживањима

Најчешћи начин дијагностиковања БВ је клинички (уз помоћ Амселовог критеријума) и микроскопски (коришћењем Нуцентовог скорa). Поред ова два начина (који се сматрају „златним“ стандардима) у дијагностици БВ, постоје и новији дијагностички критеријуми које су успоставили Исон/Хај и Клејс. Увођењем квалитативне процене микроскопски прегледаних препарата вагиналних размаза бојених по Граму, Исон/Хај и Клејс су превазишли одређене недостатке Нуцентове методе (дужина времена микроскопирања; анализа само три бактеријска морфотипа). Међутим, и ове методе се заснивају на посматрању мале површине препарата (под увеличањем  $\times 1000$ ). Микроскопирањем 5-20 поља под увеличањем  $\times 1000$ , стварно посматрана површина препарата чини само мали део укупне површине размаза. Ради превазилажења недостатака у евалуацији препарата, предложен је нов метод оцењивања вагиналних размаза (заснован на микроскопирању под увеличањем  $\times 200$ ). Заправо, ако је површина стандардног предметног стакла  $25.4 \times 76.2 \text{ mm} = 1935 \text{ mm}^2$ , и ако узмемо у обзир да ћелијски размаз чини само трећину плочице (око  $600 \text{ mm}^2$ ), а да је величина видног поља под увеличањем  $\times 1000$   $0.035 \text{ mm}^2$ , тако да од укупно 17 143 поља ( $600/0.035$ ) анализираће се само 15-20 поља. Када исти препарат посматрамо под увеличањем  $\times 200$ , величина видног поља је  $0,875 \text{ mm}^2$  (број видних поља под увеличањем  $\times 400$  је 6,25 пута већи него под увеличањем  $\times 1000$ , док је број видних поља под увеличањем  $\times 200$  четири пута већи у односу на број видних поља под увеличањем  $\times 400$ ), што значи да анализирамо 100-150 поља од укупно 686 ( $600/0.875$ ), или  $\frac{1}{4}$  укупне површине плочице. На основу микроскопског метода по Ненадићу и сар, поред могућности да се анализира већа површина препарата, постоји и могућност да се евалуација препарата може обавити за знатно краће време. Према овој методи микроскопирања, препарати се разврставају на 6 група према налазу. Категоризација је флексибилна и може се свести на две групе и то: нормалан налаз и БВ. Једноставнија је и бржа од Амселове категоризације, што може бити од помоћи лекарима клиничарима у свакодневном раду у смислу избора терапијског приступа, посебно у случајевима где долази до разилажења у категоризацији по различитим дијагностичким критеријумима. Тако нпр. посебан проблем представља тзв. интермедијарна група за коју је показано да представља бактеријску флору састављену од микроорганизама удружених са бактеријском вагинозом, као што је *Gardnerella vaginalis*, и лактобацила обично удружених са нормалном флором. То је главни разлог зашто се интермедијеран налаз сматра прелазном фазом између нормалног и БВ.

## 2.7. Методе истраживања

Студија је дизајнирана као ретроспективна и обухватила је 100 трудница (старости од 18-40 година) којима је током редовне контроле, на Одељењу за Гинекологију ВМА у Београду, узиман вагинални брис. У студију неће бити укључене пацијенткиње млађе од 18 и старије од 40 година, пацијенткиње са мултиплим трудноћама, аномалијама материце, конизацијом грлића материце, као ни пацијенткиње са претходним превременим порођајима или побачајима. Пацијенткиње које су биле под било каквом терапијом две недеље пре прегледа, као и пацијенткиње које су имале сексуалне односе недељу дана пре прегледа, такође неће бити укључене у студију. Етички Комитет Војномедицинске Академије у Београду је одобрио протокол студије и све пацијенткиње су дале сагласност да учествују у студији путем писаног информисаног пристанка.

Пре вагиналног прегледа, у вагину ће бити стављан спекулум без употребе лубриканса и клиничким прегледом ће бити константована количина, конзистенција и боја вагиналног секрета. Са бочног вагиналног зида биће узета по два узорка памучним брисом. Први узорак ће бити наносен, благим котрљањем штапића по дужини, на микроскопску плочицу димензија 76,2x25,4 mm. Преко узорка ће потом бити накапавана кап физиолошког раствора и стављано покровно стакло. Препарат ће затим бити прегледан под фазно-контрасним микроскопом на увећању x400. По завршетку микроскопског прегледа, на исти препарат ће бити укапавана кап 10% калијум-хидроксида ради лакше визуализације спора и/или хифа гљивица. Други узорак ће на сличан начин бити размазиван по плочици, сушен на ваздуху, бојен по Граму и архивиран. Проба са 10% калијум-хидроксидом, у оквиру Амселовог критеријума, ће бити извођена тако што ће на памучни штапић са узорком узетог са бочног вагиналног зида бити накапавана по кап 10% калијум-хидроксида. Присуство мириса на покварену рибу ("fishy" odor) ће указивати на позитиван тест. Вагинални рН, у оквиру Амселовог критеријума, ће бити одређиван лакмус папиром (Merck рН распона од 4,0 до 7,0).

### *А. Клиничка евалуација вагиналног секрета употребом Амселовог критеријума*

Амселов критеријум је базиран на присуству:

1. Хомогеног вагиналног секрета;
2. Мириса покварене рибе када се на секрет накапа 10% калијум-хидроксид („wiff“ тест);
3. „clue“ ћелија (више од 20%);
4. рН вагине преко 4.5

Потребно је да три од четири критеријума буде позитивно да би се поставила дијагноза бактеријске вагинозе.

### *Б. Микроскопска евалуација препарата бојених по Граму*

Препарати вагиналних размаза бојени по Граму, ће бити микроскопски евалуирани и категорисани по критеријумима које су успоставили Нуцент, Исон/Хај, Клејс и Ненадић и



сар. Укратко, Нуцентов систем бодовања подразумева категоризацију размаза, посматраних микроскопски под увеличањем  $\times 1000$ , у три групе на основу бактеријског морфотипа. Морфотипови ће бити категорисани на основу просечног броја бактерија по посматраном видном пољу (посматра се 5-20 поља). Ако је по видном пољу препознато више од 30 лактобацила, скор ће бити 0; ако нема лактобацила, скор ће бити 4. Ако је су одсутни морфотипови типа *Gardnerella*, скор ће бити 0; а ако их је присутно више од 30, скор ће бити 4. Присуство других морфотипова, као што је *Mobiluncus*, може додати још 2 бода. На основу финалног скорa сви налази ће бити класификовани на: нормалан налаз - група I (0-3 бода), интермедијеран налаз - група II (4-6 бодова) и бактеријску вагинозу - група III (7-10 бодова). Исон/Хај класификација је заснована на квалитативној процени присуства бактерија на размазима бојеним по Граму (уместо одређивања тачног броја бактерија) под увеличањем  $\times 1000$ . У поређењу са Нуцентовим системом, Исон/Хај има још две категорије: 0 (без бактерија, тзв. „чисту“ групу) и групу IV (Грам-позитивне коке као што су *Streptococcus* или *Staphylococcus*). Клејс је заснован на Исон/Хај категоризацији, уз поделу групе I на Ia (кратки и дебели бацили), Ib (дуги и танки бацили) и Iab (мешани лактобацили). Такође, Клејс категоризација подразумева и класификацију у I-like групу, која обухвата Грам-позитивне бактерије дифтероидног морфотипа, и „пурулентну“ I групу (доминантан морфотип су лактобацили уз присуство леукоуреје). Групе II, III и IV по Клејс, одговарају истоименим групама по Исон/Хај. Нова микроскопска метода је заснована на оцењивању вагиналних размаза бојених по Граму под увеличањем  $\times 200$  и њиховој категоризацији на основу присуства бациларних форми (БФ) и других форми (не бациларне форме – НБФ). Најкраћа дужина микроорганизама која се под увеличањем  $\times 200$  може диференцирати као БФ је  $1.5\mu\text{m}$ . На основу ове чињенице, под увеличањем  $\times 200$ , неће бити потешкоћа у процени да ли на препарату преовладавају БФ ( $> 1.5\mu\text{m}$ , лактобацили), или НБФ ( $< 1.5\mu\text{m}$ , бактерије које су удружене са бактеријском вагинозом). Број БФ и НБФ се по Ненадићу и сар. процењује семиквантитативно на следећи начин: препарат са бројним бактеријама које прекривају већи део препарата (између, око и преко епителних ћелија) ће бити класификован као „пун“, препарат са ретким бактеријама (углавном око епителних ћелија) ће бити сврстан као „умерен“, и препарат са скоро одсутним бактеријама ће бити категорисан као „празан“ или „нул“. У зависности од односа БФ:НБФ, налази ће додатно бити категорисани у групе: нормалан и БВ. На овај начин, сви препарати ће бити класификовани у 6 подгрупа, односно по три категорије у свакој групи, а то су: три са нормалним налазом (нормал нул – НН; нормал умерен – НУ и нормал празан – НП) и три групе са бактеријском вагинозом (БВ нул – БВН, БВ умерен – БВУ и БВ пун – БВП).

### *V. Молекуларна анализа*

Екстракција ДНК – ДНК бактерија ће бити изолована са препарата вагиналних размаза бојених по Граму по модификованој методи коју су описали Srinivasan и сар (2). Укратко, препарати ће бити чишћени ксилолом ради уклањања имерзионог уља и потом потапани у

раствор ксилола и етанола у односу 1:1 (ради спречавања евентуалне ре-преципитације кристал-виолет/карбол-фуксин боје, која се користи у бојењу по Граму). Након испирања у 100% етанолу, препарати ће бити сушени на собној температури. Даља процедура ће се обављати према упутству произвођача кита за екстракцију ДНК (QIAamp DNA extraction mini kit, Qiagen).

Детекција и квантификација - детекција и квантификација *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis*, и *Atopobium vaginae*, као и квантификација укупног вагиналног микробиома ће бити урађена коришћењем комерцијалног теста за real-time PCR (Bacterial Vaginosis Real-TM Quant, Sacace Biotechnologies, Como, Italy), према упутству произвођача.

## **Статистичка обрада података**

Величина узорка је утврђена на основу претпоставке слагања примарне варијабле (категирије вагиналних секрета) добијене различитим студијским методама. Претпостављено је да ће слагање између метода бити у 85% препарата, уз очекивану разлику од 10% између нулте (методе су упоредиве) и радне хипотезе (методе нису упоредиве). На основу резултата предходних истраживања маргинална преваленца за три категорије износи 20% (бактеријска вагиноза), 15% (интермедијарни налаз) и 65% (нормални налаз). За прорачун студијског узорка је кориштен одговарајући, претходно публикован номограм прорачуна узорка статистичког теста слагања дијагностичких метода за капа статистику. Сходно наведеном, утврђен је узорак од најмање 100 препарата добијених од исто толико испитаница.

Примарне варијабле ће бити анализирание употребом степена слагања између категоријских параметара израчунавањем карра индекса. У зависности од квалитативних и квантитативних карактеристика секундарних варијабли, биће спроведене одговарајуће статистичке анализе. Код нумеричких варијабли, такве методе укључују тестирање хипотезе код два независна узорка (Студентов т-тест или Вилкоксон-Ман-Витни тест). Код категоријалних варијабли ће се користити хи-квадрат тест или Фишеров тест. Веза између испитиваних варијабли ће се анализирати коришћењем Пирсонове корелације (нумеричке континуиране варијабле) или Спирманове корелације ранга. Методом бинарне логистичке регресије ће бити утврђивана значајност утицаја варијабли на дихотомне исходе, како самостално (униваријантна) тако и удружено (мултиваријантна анализа). Сензитивност и специфичност појединих параметара у дискриминацији клиничких исхода биће одређивана тзв. ROC анализом.

## **2.8. Очекивани резултати докторске дисертације**

У свакодневном раду, лекари клиничари понекада имају потешкоћа да одлуче које пацијенткиње са одређеним микроскопским налазима и присутним/одсутним клиничким знацима бактеријске вагинозе треба лечити, а које не. Молекуларни приступ у дијагностици бактеријске вагинозе може бити обећавајући у превазилажењу разлика већ

успостављених критеријума по којима исти пацијенти могу бити сврстани у различите категорије (исти пацијент по једном дијагностичком критеријуму може имати нормалан налаз, а по другом интермедијеран, и обрнуто). Идентификација и квантификација вагиналног микробиома могу пружити важне информације о значајном броју бактерија које могу довести до појаве болести, о подударности молекуларне дијагностике и микроскопских налаза, а могу представљати и потенцијално решење енигме тзв. „чистих“ налаза (налаза са изузетно малим бројем бактерија) по Исон/Хај класификацији и њиховом значају у дијагностици бактеријске вагинозе. Сврха ове студије је проналажење везе између вагиналног микробиома који не доводи до појаве болести, и патолошког, потенцијално штетног, вагиналног микробиома. Очекује се да ћемо, на основу пажљиве анализе резултата ове студије, бити у могућности да оптимизујемо дијагностичке процедуре које ће обезбедити правовремени и веродостојни налаз лекару клиничару а тиме и бенефит за пацијенте.

## **2.9. Оквирни садржај докторске дисертације**

Категорије вагиналног секрета ће бити утврђене студијским методама (PCR, real time PCR, клинички и микроскопски критеријуми) и то као квалитативне (нормалан - група I, интермедијарни - група II и бактеријска вагиноза - група III) и квантитативне (празан, умерен, пун). Затим ће бити испитано присуство одговарајућег микроорганизама: *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*, одређен укупни микробиом вагиналних секрета и релативни однос *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*. Резултати молекуларне и микроскопске анализе бити поређени у циљу утврђивања у којој мери међусобно корелирају.

## **3. Предлог ментора**

За ментора ове докторске тезе Комисија предлаже проф. др Александра Живановића, редовног професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство. Предложени наставник испуњава услове за ментора докторских дисертација, у складу са стандардом 9. за акредитацију студијских програма докторских академских студија на високошколским установама.

### **3.1 Компетентност ментора**

1. Filipovic N, Nikolic D, Saveljic I, Tanaskovic I, Zdravkovic N, Zivanovic A, Arsenijevic P, Jeremic B, Arsenijevic S. Computer simulation of cervical tissue response to a hydraulic dilator device. Theor Biol Med Model Doi: 10.1186/1742-4682-10-64
2. A. Dimitrijevic, Z. Protrka, V. Stankovic, J. Djuric, M. Sorak, A. Zivanovic, S. Hajrovic, I. Preljevic. Endometrial thickness and beginning of bleeding as prospective markers for the risk of surgical intervention after intracervical application of misoprostol in early pregnancy failure.

HealthMED 2012; 6(4):1394-1400.

3. J. Đurić, S. Aresenijević, D. Banković, Z. Protrka, M. Šorak, A. Dimitrijević, A. Živanović. Karlična prezentacija u terminu: carski rez ili vaginalni porođaj? Srp Arh za Celokup Lekar 2011;139(3-4):155-160.
4. Zivanovic A, Dimitrijevic A, Kastratovic T, Djuric J, Stankovic V, Tanaskovic I. Ovarian endometroid adenocarcinoma in pregnancy. Vojnosanit Pregl 2011; 68(2):181-184.
5. Kastratovic T, Tanaskovic I, Lackovic V, Sorak M, Stanković V, Ljubic B, Sedlar S, Zivanovic A. Mitotic activity of smooth muscle cells of the myoma: does hormonal stimulation have an effect on the number of the mitoses. Arch Biol Sci 2010; 62(1): 39-45.

#### **4. Научна област дисертације**

Медицина. Изборно подручје: Имунологија, инфекција и инфламација

#### **5. Научна област чланова комисије**

1. проф. др Маја Ћупић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област *Микробиологија*, председник;
2. доц. др Марија Шорак, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област *Гинекологија и акушерство*, члан;
3. доц. др Биљана Љујић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Генетика*, члан;
4. доц. др Александра Димитријевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Гинекологија и акушерство*, члан;
5. доц. др Марија Миловановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Микробиологија и имунологија*, члан.

## **Закључак и предлог Комисије**

На основу досадашњег научно-истраживачког рада и публикованих радова, кандидат др мед. Снежана Матић, испуњава све услове за одобрење теме и израду докторске дисертације.

Предложена тема је научно оправдана и оригинална, дизајн истраживања прецизно постављен и дефинисан, а научна методологија јасна и прецизна.

Комисија предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу да прихвати тему докторске дисертације кандидата др мед. Снежане Матић, под називом "Валидација нове микроскопске методе у дијагностици бактеријских вагиноза применом PCR и real-time PCR" и одобри њену израду.

## ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. проф. др Маја Ћупић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Микробиологија, председник

---

2. доц. др Марија Шорак, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан

---

3. доц. др Биљана Љујић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, члан

---

4. доц. др Александра Димитријевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Гинекологија и акушерство, члан

---

5. доц. др Марија Миловановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан

---

У Крагујевцу, 10.05.2016. године