

Извештај о оцени докторске дисертације, доставља -

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
МФ ВМА УО**

Одлуком бр. 15/96 са 96.седнице Наставно-научног већа Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране (МФ ВМА УО) у Београду, одржане 31.03.2022. године именована је Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације под насловом

“Значај мултиплекс квантитативног RT PCR теста у дијагностици вагиналних дисбиоза“

кандидаткиње, **вс Соње Атанасијевске Кујовић**, мастер биолог - молекуларни биолог и физиолог, запослене на Одељењу за микробску генетику и имунологију, Института за микробиологију СПМ ВМА, студента докторских академских студија биомедицине – модул молекулска медицина МФ ВМА УО.

Ментор у изради тезе била је **вс, проф. др Елизабета Ристановић**, научни саветник, МФ ВМА УО, а **коментор** доц. др Дане Ненадић, МФ ВМА УО (Одлука Сн број 25/90 од 26.09.2019. године)

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације у саставу:

1. *проф.др Тања Јовановић, Медицински факултет Универзитета у Београду - председник*
2. *проф.др Светлана Врзић Петронијевић, Медицински факултет Универзитета у Београду, члан*
3. *проф. др Славиша Станковић, Биолошки факултет Универзитета у Београду - члан*
4. *вс, проф. др Елизабета Ристановић, научни саветник, Медицински факултет ВМА, Универзитет одбране у Београду, члан*
5. *доц. др Дане Ненадић, Медицински факултет ВМА, Универзитет одбране у Београду – члан*

прочитала је достављену докторску дисертацију и након детаљне анализе подноси Наставно-научном већу Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду овај извештај

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

А) Приказ садржаја докторске дисертације

Докторска дисертација „Значај мултиплекс квантитативног RT PCR теста у дијагностици вагиналних дисбиоза“ написана је на 153 странице стандардног формата. Подељена на следећа поглавља: *Увод* (16 страница), *Хипотезе и циљеви* (три странице), *Материјал и методе* (33 странице), *Резултати* (51 страница), *Дискусија* (28 страница), *Закључак* (3 странице). Дисертација садржи 39 табела, 18 графикона и 54 слике, које илуструју текст у поглављима Увод, Материјали и методе и Резултати. Цитирани су подаци из 207 референци. Рад је методолошки адекватно конципиран и има све елементе докторске дисертације. Поред набројаних поглавља текст тезе садржи и сажетак на српском и енглеском језику, податке о комисији, захвалницу, листу скраћеница и садржај. Истраживање није део ни једног пројекта, већ представља самостални рад кандидаткиње.

У *уводу* је приказан значај вагиналног микробиома и вагиналних дисбиоза за репродуктивно здравље жена. Објашњене су најважније карактеристике вагиналних дисбиоза-бактеријске вагинозе (БВ) и аеробног вагинитиса (АВ) и јасно су дефинисане њихове клиничке и микробиолошке разлике. Такође, наведене су клиничке, микроскопске и молекуларне методе које се користе у дијагностици вагиналних дисбиоза. Будући да се не зна тачан узрок настанка вагиналних дисбиоза и да ли је за њихову појаву одговоран један узрочник или међусобно деловање сложене бактеријске флоре, њихова детекција, представља велики дијагностички и клинички изазов. Зато је истраживање усмерено на дијагностику вагиналних дисбиоза где је највећи проблем у непостојању адекватног златног стандарда за дијагностику бактеријске вагинозе и препознавање аеробног вагинитиса као синдрома. Осим вагиналних дисбиоза у *уводу* се указује на значај *Candida spp.* и сексуално преносивих инфекција (СПИ) у укупној процени вагиналне флоре. Да би се постигла правилна процена стања вагиналне флоре и унапредила дијагностика и терапијски приступ, испитана је међусобна повезаност вагиналних дисбиоза, СПИ и *Candida spp.*

На основу наведених сазнања из литературе постављене су следеће **радне хипотезе**:

1. Применом високо специфичног мултиплекс квантитативног RT PCR теста могуће је поставити поузданију дијагнозу бактеријске вагинозе у поређењу са клиничким и микроскопским дијагностичким методама.
2. Применом мултиплекс квантитативног RT PCR примарно конципираног за дијагностику бактеријске вагинозе, у комбинацији са клиничким и микроскопским параметрима, успешно се може дијагностиковати и аеробни вагинитис.

Из хипотеза су јасно дефинисани **циљеви истраживања**:

1. Анализирати узорке вагиналних брисева испитаница применом различитих клиничких и микроскопских критеријума и категорисати их на основу датих критеријума за сваку методу.
2. Идентификовати и квантификовати бактерије *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus* spp. као и укупну концентрацију бактерија употребом квантитативног мултиплекс RT PCR у узорцима вагиналног бриса и на основу њиховог релативног односа категорисати испитанице.
3. Упоредити резултате добијене на основу постојећих дијагностичких критеријума у дијагнози БВ и АВ са резултатима добијеним RT PCR методом.
4. Утврдити постојање корелације између укупног броја бактеријских морфотипова добијених на основу микроскопске процене степена целуларности и укупног броја бактерија детектованих RT PCR.
5. У цервикалним брисевима вагине испитаница применом мултиплекс RT PCR тестовима идентификовати узрочнике сексуално преносивих инфекција (*Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma* spp., *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, високоризични HPV и херпес симплекс вирус (HSV-1/HSV-2), а применом методе култивације утврдити присуство *Candida* spp. у брисевима бочног зида вагине.

6. Утврдити постојање корелације између присуства испитиваних узročника сексуално преносивих инфекција, *Candida spp.* и вагиналних дисбиоза.

У поглављу **Материјал и методе** кандидаткиња прецизно и јасно образлаже методологију истраживања које је спроведено на 235 испитанице у периоду од новембра 2018. до децембра 2019. године. Преглед испитаница и узорковање извршено је у Центру за гинекологију и хуману репродукцију, док је тестирање узорака урађено на Одељењу за микробску генетику и имунологију, Института за микробиологију СПМ ВМА. Студија је одобрена од стране Етичког комитета ВМА и све испитанице су потписале информисани пристанак за учешће у студији.

Будући да су у истраживању коришћене различите клиничке (Амсел) микроскопске (Нугент, Ison/Нау, Clayes, Дондерс и Нова микроскопска метода) и молекуларне методе (RT PCR) за дијагностику вагиналних дисбиоза кандидаткиња детаљно описује исте са табеларним приказима и оригиналним фотографијама микроскопских препарата које доприносе лакшем објашњењу и разумевању метода.

Поред вагиналних дисбиоза представљена је и описана дијагностика рода *Candida spp.* која је обављана култивацијом и микроскопирањем као и молекулска дијагностика девет најчешћих сексуално преносивих инфекција које су идентификоване са четири различита мултиплекс квантитативна RT PCR есеја.

Због великог број метода за детекцију вагиналних дисбиоза које имају различити број група и критеријума, да би резултати статистички били упоређени кандидаткиња у посебном одељку прецизно табеларним приказима дефинише категорије ради њиховог међусобног поређења.

Статистичка обрада података извршена је уз помоћ IBM SPSS Statistics 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) софтверском пакету или у R програмском окружењу (R Core Team, 2019). За анализу примарних података коришћене су дескриптивне статистичке методе за тестирање статистичких хипотеза и методе за оцену слагања. Од дескриптивних статистичких метода коришћене су мере централне тенденције (аритметичка средина, медијана), мере варијабилитета (стандардна девијација) и релативни бројеви (показатељи

структуре). Од метода за тестирање статистичких хипотеза коришћени су: хи-квадрат, Фишеров тест тачне вероватноће, Kruskal-Wallis тест и Mann-Whitney тест. Од метода за оцену слагања коришћени су: „Карра“ коефицијент и Weighted Карра коефицијент. Рангирање „Карра“ коефицијента вршено је на основу поделе по Алтману. Статистичке хипотезе су тестиране на нивоу статистичке значајности (алфа ниво) од 0.05.

У поглављу **Резултати** аутор детаљно и прегледно приказује обрађене податке у виду табеларних и графичких приказа. Резултати су категорисани у 11 различитих целина. Прве три целине приказују дијагностику вагиналних дисбиоза клиничким и микроскопским критеријумима. Као златни стандард у дијагностици узети су најчешће коришћени Нугентови критеријуми и све остале методе (Амсел, Ison/Нау, Clayes, Дондерс и Нова микроскопска метода) су упоређене са овом методом. Поред тога извршена је упоредна анализа коришћених метода, као и комбинација клиничких и микроскопских критеријума у анализи вагиналног микробиома. Четврта целина приказује резултате идентификације рода *Candida spp.* култивацијом на Сабуро подлози као и на микроскопском препарату. У петом делу приказан је преглед добијених резултата коришћењем мултиплекс квантитативног RT PCR теста за дијагностику вагиналних дисбиоза као и преглед просечних вредности бактерија *Lactobacillus spp.*, *G.vaginalis* и *A.vagine* и укупног броја бактерија у зависности од стања вагиналне флоре добијене PCR тестом. С обзиром да је постављена хипотеза да је RT PCR за детекцију БВ поузданија метода у односу на конвенционалне клиничке и микроскопске методе, у петом поглављу коришћена је ова молекуларна метода као златни стандард и упоређена је са свим осталим методама. Шесто поглавље представља упоредну анализу свих коришћених метода за дијагностику вагиналних дисбиоза. Седма целина даје увид у резултате детекције сексуално преносивих инфекција, као и идентификације моно и коинфекција присутних код испитаница. Од 8 до 11 поглаваља приказани су резултати међусобних корелација између вагиналних дисбиоза, сексуално преносивих инфекција и гљивица рода *Candida spp.*

У поглављу **Дискусија** концизно се анализирају и пореде међусобно добијени резултати. Кандидаткиња истиче предности и мане сваке од коришћених метода у дијагностици вагиналних дисбиоза. Такође, приказана су поређења добијених резултата студије са резултатима истраживања присутних у литератури.

Закључци приказују најважније налазе који су проистекли из резултата истраживања.

У поглављу **Литература** наведено је 207 референци цитираних у оквиру дисертације.

Б) Кратак опис постигнутих резултата

Приказани резултати истраживања показују да је RT PCR најпоузданија метода у процени статуса вагиналне флоре. Поређењем клиничких, микроскопских и молекуларних метода резултати показују добро слагање у налазима здраве флоре и БВ, али највеће разлике јесу у интермедијарним налазима. RT PCR је већину интермедијарних налаза (Нугент, Ison/Нау, Clays, Дондерс) сврстао у БВ и нормалне налазе што је најзначајнији резултат истраживања. Још једна од предности теста је што указује и на постојање других стања вагиналне флоре као што је флора неспецифичне етиологије, али и могућност идентификације бактерије *A. vaginae* која је резистентна на метронидазол, често коришћен у терапији БВ. Предност теста је такође што PCR може да квантификује количину бактерија у одређеном узорку, и тиме укаже на потенцијално могуће рекурентне БВ. Међутим, резултати показују да примењени PCR тест за дијагностику БВ није адекватан за дијагностику АВ.

Истраживање утврђује да је за анализу вагиналне флоре потребно развити мултидисциплинарни приступ који подразумева сарадњу гинеколога, микробиолога и молекуларних биолога која ће омогућити правилну процену стања вагиналне флоре и тиме унапредити дијагностику и терапијски приступ. За правилно постављање дијагноза вагиналних дисбиоза требало би употребити комбинацију клиничких, микроскопских и молекуларних метода. Најбољи алгоритам за процену статуса вагиналне флоре била би комбинација клиничких и микроскопских критеријума и употреба PCR теста у случајевима када је потребна диверзификација одређених препарата попут

интермедијарних налаза, препарата са малим бројем ћелија или у случајевима честих рекуретних БВ.

Приликом евалуације микроскопског препарата потребно је бележити и присуство полиморфонуклеарних леукоцита (ПМН), који представљају најважнији појединачни микроскопски параметар у диференцијалној дијагностици БВ и АВ. Резултати показују присуство патолошких ПМН у налазима БВ што може да указује и на постојање коинфекција или мешаних инфекција. Потврђено је да је присуство патолошких ПМН повезано са детекцијом *Candida spp.*, али није утврђена повезаност ПМН и присуства СПИ.

Утврђена је повезаност између укупног броја детектованих СПИ узрочника и БВ. Истраживање је показало асоцијацију *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* са БВ као и повезаност коинфекција са овом дисбиозом. Присуство рода *Candida* није зависно од стања вагиналне флоре. Такође, резултати показују да не постоји асоцијација између присуства гљивица и неког од узорчника СПИ, без обзира да ли се ради о моноинфекцијама или коинфекцијама

В) Упоредна анализа докторске дисертације са резултатима из литературе

У литератури постоји велики број радова који се бави дијагностиком бактеријске вагинозе али према увиду у литературу ни једно истраживање не укључује поређење седам различитих метода у дијагностици вагиналних дисбиоза. С обзиром на значај вагиналних дисбиоза у репродуктивном здрављу жена и пробелма везан за њихову дијагностику, поређење већег броја метода омогућило је да се утврди најспецифичнија метода за њихову дијагностику.

У литератури такође нису присутни радови који имају свеуобухватни присут у анализи статуса вагиналне флоре које је сагледано у истраживању кандидаткиње. Добијени резултати указали су на значај мултидисциплинарног приступа у анализи вагиналног микробиома.

Иако у литератури постоји велики број радова који се баве асоцијацијом вагиналних дисбиоза и СПИ, није доступан ни један рад који пореди девет различитих сексуално

преносивих инфекција, као ни међусобну повезаност вагиналних дисбиоза, *Candida spp.* и СПИ.

Г) Објављени радови из докторске тезе

Резултати истраживања спроведених у оквиру докторске дисертације садржани су у следећим публикацијама:

Atanasievska S, Nenadic D, Stankovic S, Protic – Djokic V, Ristanovic E. Bacterial vaginosis – diagnostic dilemma and implications. *Vojnosanitetski pregled*, 2022 Online First. DOI: <https://doi.org/10.2298/VSP210513011A> **M23; IF 0.168**

Atanasievska Kujovic S, Ristanovic E, Protic – Djokic V, Nenadic D. Association of bacterial vaginosis with the most common sexually transmitted infections. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo*, 2022 Online First (00): 18-18. DOI: <https://doi.org/10.2298/SARH211116018A> **M23; IF 0.207**

Д) Закључак и предлог

Комисија сматра да докторска дисертација, мастер биолога - молекуларног биолога и физиолога Соње Атанасијевске Кујовић под називом:

“Значај мултиплекс квантитативног RT PCR теста у дијагностици вагиналних дисбиоза“

представља оригиналан стваралачки допринос у области ове комплексне и изузетно клинички актуелне проблематике реализован према dobrim принципима методологије и начелима етике у научно-истраживачком раду. Теза је написана систематично и јасно.

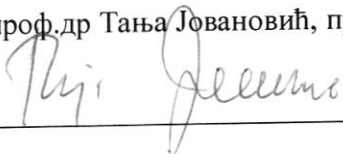
Сходно томе, Комисија је једногласна у оцени да докторска дисертација испуњава услове дефинисане Правилником о пријави, изради и одбрани докторске дисертације и промоцији доктора наука („Службени војни лист“, бр 20/12, 25/13 и 12/16). Поред написане докторске дисертације, кандидаткиња има два рада из категорије M23 чији збирни импакт фактор износи више од 0,3 и у којима је први аутор.

Сагледавши испуњеност свих законских обавеза за одбрану докторске дисертације Комисија предлаже Наставно-научном већу да рад прихвати као завршену докторску дисертацију и да **вс, мастер биологу – молекуларном биологу и физиологу, Соњи Атанасијевској Кујовић** одобри јавну одбрану тезе ради стицања академске титуле доктора медицинских наука.

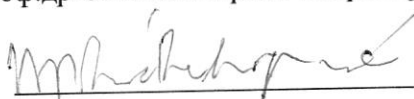
У Београду, 13.04.2022

КОМИСИЈА:

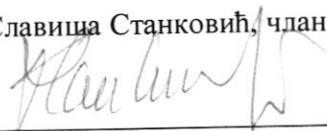
проф. др Тања Јовановић, председник



проф. др Светлана Врзић Петронијевић, члан



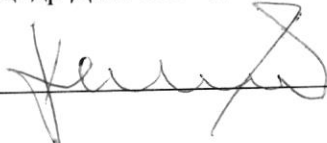
проф. др Славица Станковић, члан



проф. др Елизабета Ристановић, члан



доц. др Дане Ненадић, члан





РЕПУБЛИКА СРБИЈА
МИНИСТАРСТВО ОДБРАНЕ
УНИВЕРЗИТЕТ ОДБРАНЕ
Медицински факултет ВМА

Бр. 1968-1
28 APR 2022
БЕОГРАД 20..... год.