Стручни критички осврт

Гордана В. Козодеровић, *Analiza prirode rezistencije na hinolone i molekularna tipizacija odabranih serotipova Salmonella enterica subspecies enterica*. Докторска дисертација. Београд: Биолошки факултет Универзитета у Београду, 2012, XIII + 118 стр. (ментори: проф. др Весна Милошевић и доц. др Јелена Лозо; Комисија за оцену: Ј. Лозо, В. Милошевић, М. Велхнер, Н. Голић). Одбрањена 14. јуна 2012. Отворени приступ: НаРДуС.

I Предмет, грађа и мерило

Дисертација се бави двема повезаним темама молекуларне епидемиологије салмонела у ланцу исхране: разликовањем сојева *Salmonella enterica* subsp. *enterica* серотипа Enteritidis који круже међу пилићима, у намирницама и међу људима, и учесталошћу и молекуларном основом резистенције на хинолоне. Оглед има два слоја. Први је колекција од 60 изолата S. Enteritidis из 2005–2006 (30 ветеринарских, 18 хуманих, 12 из намирница), типизована RAPD-PCR методом с четири прајмера, резистотипизацијом и одређивањем мутација у QRDR региону гена *gyrA*. Други чини 900 изолата S. Enteritidis и 259 изолата 24 друга серотипа из Института за јавно здравље Војводине (2005–2010), у којима су изолати резистентни на налидиксичну киселину (NAL) издвојени на подлози са 64 mg/l NAL; изолати S. Enteritidis затим су испитани диск-дифузијом, агар-дилуцијом (MIC за NAL и ципрофлоксацин, CIP) и секвенцирањем QRDR, а изолати других серотипова само диск-дифузијом.

Мерило ваља изрећи унапред и без изузетка. Рукопис је предат на оцену почетком новембра 2011: Наставно-научно веће Биолошког факултета прихватило је 4. новембра 2011. извештај ментора о урађеној дисертацији и образовало Комисију за преглед и оцену (Одлука Наставно-научног већа, 2011); један навод из касног новембра 2011 (стр. 20) показује да је текст до извештаја Комисије још допуњаван, што мерило не мења. Рад се мери искључиво према литератури, стандардима, прописима и знању доступним у време предаје рада, у издању које је тада важило; ништа касније није мерило. Зато се рад ни на једном месту не терети што MIC ципрофлоксацина од 0,125 до 0,512 mg/l није назвао неосетљивошћу у клиничком смислу: по тада важећим табелама граничних вредности такви изолати били су клинички осетљиви. Свака јединица у списку литературе овог осврта објављена је пре новембра 2011, изузев саме дисертације, извештаја Комисије и одлука

надлежних већа, који су предмет осврта. Наводи из дисертације преузети су дословно, у писму рада (латиница), с бројем штампане стране; сажетак нема штампани број, па се наводи као сажетак.

Ауторка је магистар наука, па се докторат брани по прописима који су важили пре Закона о високом образовању, што његов члан 128 изричито допушта; меродаван је Закон о универзитету (2002, чл. 55–58), који облик дисертације не прописује и формалну хипотезу не тражи. Извештај о оцени потписују четири члана — Лозо, Милошевић, Велхнер и Голић; услов да бар један члан комисије не буде у радном односу на факултету (чл. 58 ст. 2) испуњен је с вишком: три од четири члана комисије изван су Биолошког факултета.

II Шта рад доноси

Прво, рад доноси молекуларно-епидемиолошку слику S. Enteritidis у ланцу исхране на северу Србије и домаће податке о молекуларној природи смањене осетљивости салмонела на флуорохинолоне. Главни молекуларни налаз, изведен на свих 35 изолата резистентних на NAL, јасно је исказан: „Kod svakog izolata nađena je samo po jedna mutacija na jednom od ova dva lokusa, odnosno nije bilo dvostrukih mutacija.“ (стр. 73). Расподела замена (Asp87Asn 23, Asp87Gly 8, Ser83Phe 4) слаже се у табелама 12 и 18 и на слици 12, а налаз да је 34 од 35 изолата имало MIC ципрофлоксацина од најмање 0,125 mg/l у табелама 11, 17 и 18; мутације су дате и на нивоу кодона.

Друго, рад је грађен у два корака и други користи да провери први, што је његова методолошки најзрелија црта: неочекивано висок удео резистенције на NAL у колекцији од 60 изолата рад проверава на 900 изолата и отворено исправља: „Može se zaključiti da je veličina uzorka stoga bitno uticala na sagledavanje stvarne slike o učestalosti rezistencije na antibiotike pa i na NAL kod S. Enteritidis na području Južnobačkog okruga i ukazala na mogućnost izvođenja pogrešnih zaključaka prilikom ispitivanja male kolekcije izolata.“ (стр. 85). Концентрација за скрининг изведена је из сопствене бимодалне расподеле MIC у малој колекцији (MIC за NAL највише 8 mg/l код осетљивих, најмање 128 mg/l код резистентних): „Ove vrednosti su poslužile u definisanju koncentracije NAL (64 mg/l) u podlogama koje su se koristile za selektovanje NAL rezistentnih salmonela u većem uzorku“ (стр. 63). Сваки изолат S. Enteritidis који је израстао на селекционој подлози потврђен је агар-дилуцијом и секвенцирањем. MIC за CIP одређен је и код 30 изолата осетљивих на NAL, па рад има сопствену основну расподелу (0,016–0,064 mg/l).

Треће, типизација има унутрашњу епидемиолошку проверу. Изолати оболелог и две инкриминисане намирнице из епидемије у хамбургерији добили су профил који нема ниједан спорадични изолат: „Jedinstvena grupa DACA se sastojala od tri epidemijski povezana izolata koja potiču iz epidemije u hamburgeriji“ (стр. 61).

Четврто, рад има налаз с непосредном јавноздравственом вредношћу: испитивање контаминације у фабрици бисквита, погону који јаја користи као сировину. Из три независна маркера рад изводи закључак о обиму контаминације: „Različiti tipovi rezistencije, polimorfizam mutacija u QRDR regionu gyrA gena, kao i rezultati RAPD tipizacije gde je tri izolata iz fabrike biskvita pripadalo različitim tipovima ukazuju na široku kontaminaciju sa najmanje četiri različita soja S. Enteritidis.“ (стр. 89), уз препоруку да надзор обухвати и такве погоне.

Пето, рад на више места сам исказује границе сопственог поступка. Још у уводу стоји: „Problemi sa reproducibilnošću i ponekad teškoća interpretacije, odnosno razlikovanja artefakata od stvarnog polimorfizma, su ograničenja RAPD PCR-a.“ (стр. 17). Слепа тачка скрининга на NAL — плазмидски механизми уз осетљивост на NAL — наведена је у уводу и у дискусији, с упутом како их открити (стр. 94). Уз главно тумачење високе сродности изолата дискусија наводи и методолошко: „To se može objasniti cirkulacijom visoko srodnih S. Enteritidis u ljudskoj i živinskoj populaciji u Južnobačkom okrugu, ali i možda ograničenim mogućnostima tipizacije S. Enteritidis generalno.“ (стр. 82). Налаз који одступа од очекиваног није пређутан: „Zapažen je i jedan soj sa MIC CIP 0.064 mg/l, što se ne smatra smanjenom osetljivošću prema usvojenim kriterijumima.“ (стр. 70), па закључак 9 гласи 34 од 35, а не сви.

Шесто, и то је услов свега што следи: грађа је приказана до појединачног изолата. Табеле 2, 3 и 13 за свих 60 изолата дају порекло, RAPD профил, резистотип и мутацију, а табела 18 за 26 изолата кодон, замену и обе вредности MIC. Правило избора изречено је унапред: „U istraživanje su uključeni samo izolati identifikovani prvi put kod nekog pacijenta ili iz namirnice (primoizolati).“ (стр. 44). Захваљујући томе, сваки збирни број у раду може се поново израчунати и у највећем делу се слаже с радом: табеле 8 и 13 дају 60 изолата у распореду 30, 18 и 12; табела 4 сабира се у 900 и 259; индекси 0,688, 0,372 и 0,820 репродукују се из табеле 13 по формули коју рад наводи; неколико малих одступања наведено је у одељцима VI и VII. Секвенце прајмера, састав смеша и температурни програми дати су у целини и одговарају изворима (Betancor и сар. 2004; Giraud и сар. 1999).

III Циљеви и метод

Рад нема нумерисане хипотезе, него седам циљева формулисаних као истраживачки задаци: „1. Karakterizacija S. Enteritidis u kolekciji nasumično odabranih izolata poreklom od pilića, ljudi obolelih od salmoneloze i namirnica živinskog porekla identifikovanih na području Južnobačkog okruga u periodu 2005.-2006. godine“ (стр. 43), па учесталост резистенције на већем узорку, типови резистенције, смањена осетљивост, мутације у QRDR и, за друге серотипове, учесталост резистенције и типови резистенције (циљеви 6 и 7). За описну молекуларно-епидемиолошку анализу збирке изолата такав облик је примерен; законско мерило које важи за овај

поступак (Закон о универзитету, чл. 55–58) формалну хипотезу не тражи. Недостатак је што циљеви немају исказано мерило успеха, па оцене типа задовољавајућа дискриминативна моћ остају без критеријума (одељак VI), и што закључци циљеве прате неравномерно: резистотипови изолата S. Enteritidis резистентних на NAL (циљ 3) немају свој закључак, а учесталости мутација и резистотипова (циљеви 5 и 7) нису међу дванаест закључака. То је недостатак склопа, не садржине.

Метод је, у целини, добро изабран. Комбиновање више техника типизације рад образлаже исправно: пошто ниједна метода сама не открива све разлике међу сојевима, „Stoga se obično pribegava kombinaciji dve ili više tipizacionih tehnika“ (стр. 14). Рад унапред каже и зашто не користи плазмидни профил: „Mobilnost i nestabilnost ovih genetičkih elemenata i mogućnost horizontalnog prenošenja među sojevima čine plazmidni sastav sojeva promenljivom karakteristikom koja se mora uzeti sa rezervom prilikom epidemiološke analize.“ (стр. 16). Избор RAPD-а образложен је пре свега брзином, једноставношћу, доступношћу и ценом реагенаса, уз радове у којима је RAPD разликовао више група од риботипизације и PFGE (Lin и сар. 1996; del Cerro и сар. 2002; De Cesare и сар. 2001), и уз напомену да серотип Enteritidis има мањи диверзитет (стр. 79–80).

Три ограничења метода треба изрећи. Прво, поновљивост RAPD профила није проверена ни исказана, а на њој почивају број група и оба индекса (одељак VI). Друго, рад не примењује ниједан статистички тест ни интервал поверења, а реч значајно користи и тамо где носи поређење: „Korišćenjem više metoda tipizacije dobijena je značajno veća moć diskriminacije izolata“ (стр. 65), као и у закључцима 2 и 5. Смер тих тврдњи је тачан, али их треба читати описно. Поступак за интервал поверења индекса дискриминације био је описан десет година пре предаје рада, управо за поређење метода: „We believe that an estimation of confidence intervals when calculating the index of diversity greatly aids the comparison of genetic diversity in different environments, as well as the ability to objectively address the discriminatory potential of diverse typing systems.“ (Grundmann и сар. 2001, стр. 4191); смернице ESGEM траже исто, уз поштену ограду да се то ретко чини: „Calculations of the diversity index should be accompanied by critical assessment of the confidence interval, although this is very rarely done“ (van Belkum и сар. 2007, одељак Discriminatory power). Разлика између резистотипизације (0,372) и комбинације метода (0,820) велика је и без теста; разлике између 0,688, 0,820 и 0,828 на шездесет изолата нису доказане.

Треће, обим молекуларног дела ужи је од наслова рада. Испитан је само QRDR гена *gyrA*; gyrB, parC, parE, плазмидски гени и ефлукс нису испитивани. Циљ 5 и закључак 8 то коректно исказују, и за објашњење резистенције на NAL код свих 35 изолата то је било довољно. Увод, међутим, тврди више: „Mutacije u QRDR gyrA gena

se uvek javljaju u osnovi mehanizama rezistencije na hinolone kod Gram-negativnih bakterija“ (стр. 34) — реч увек је прејака, што показује и сам рад набрајајући на истој страни пет механизама, од којих само један мења мету. Уз то, скрининг на NAL плазмидски посредовану смањену осетљивост код изолата осетљивих на NAL није могао открити; рад то наводи у дискусији (стр. 94), али закључак 7 то ограничење не преноси.

IV Преглед литературе: салмонеле, типизација, резистенција на хинолоне

Увод заузима четрдесет две стране и неуједначен је. Најчвршћи су му делови који припремају оглед. Преглед метода типизације (1.5.1) технике вреднује, а не само набраја; ту стоји и најважнија методолошка реченица увода: „Definicija soja je praktično zavisna od rezolutivne moći sistema tipizacije, odnosno varijabilnosti osobine ili dela genoma koji se izučavaju (Pereira et al., 2008)“ (стр. 14). Одељак о механизмима резистенције на хинолоне (1.7.3.3) за 2011. је потпун и ажуран: наводи свих пет механизама, укључујући тада нове плазмидске, и изричито каже да границе QRDR нису јединствено одређене: „Granice QRDR regiona ova 4 gena se donekle razlikuju u zavisnosti od autora (Eaves et al., 2004; Hopkins et al., 2005; Kilmartin et al., 2005).“ (стр. 34). Велик део тих места верно преноси изворе.

Замерке уводу су четири врсте и ниједна не погађа резултате.

Прва су погрешно додељени извори: навод стоји уз тврдњу коју тај рад не садржи. Рад Heck 2009, који се тиче MLVA код S. Typhimurium, наведен је као извор за MLVA код серотипа Enteritidis (стр. 18); Kotetishvili и сар. 2002 наведени су као доказ да је MLST код S. Enteritidis дискриминативнији од PFGE и фаготипизације, док тај рад пореди MLST с PFGE и серотипизацијом на 243 соја 22 серотипа, без засебног налаза за тај серотип (стр. 18); Rychlik и сар. 2000 наведени су за ограничену моћ плазмидних профила код S. Enteritidis, иако тај рад истиче њихову корисност за даљу поделу унутар фаготипа (стр. 16); Weigel и сар. 2004 наведени су уз тврдњу о ограниченој моћи ERIC-PCR-а, а закључују супротно (стр. 17). У општем делу исто важи за Tezcan-Merdol и сар. 2004 (салмонеле у амебама, наведени за патогеност за рибе и биљке, стр. 5), Foley и сар. 2006 (методе субтипизације, наведени за клиничку слику, стр. 7), Schikora и сар. 2008 (налази на *Arabidopsis thaliana* пренети на гајене биљке, стр. 9) и Gobin и сар. 2011 (епидемија код људи у Уједињеном Краљевству, наведени за епидемију var. Java међу пилићима, стр. 20), а делимично и за Foxman и сар. 2005 (мерила вредновања метода типизације, стр. 15). Ниједан од тих навода не носи резултат рада, а у више случајева прави извор стоји на другом месту у истом раду — за var. Java међу пилићима Van Duijkeren и сар. 2003 (стр. 98), за мерила вредновања метода типизације Olive и Bean 1999 (стр. 78). Реч је о недовољно пажљивом додељивању извора, не о неразумевању материје.

Друга врста су чињеничне непрецизности у општем и историјском делу. Kauffmann–White шема не дели салмонеле „u 67 O grupa“ (стр. 5) — по 9. издању, које рад наводи, група је 46, а 67 је највиша бројчана ознака: „Since there were not enough letters, it was necessary to continue with numbers 51 to 67.“ (Grimont и Weill 2007, стр. 8). Број серотипова наведен као „skoro 2500“ (стр. 4) нижи је од броја у истом издању (2579 у роду); на стр. 13 рад исти податак исправно заокружује на „oko 2500“. Wilson-Blair агар наведен је као подлога различита од бизмут-сулфитног агара, иако је исти медијум (стр. 4); S. Typhi је на истој страни назван јединим серотипом који не ствара гас, иако то својство има и S. Gallinarum. Издвајање *Salmonella bongori* приписано је раду Crosa и сар. 1973, што је анахронизам (стр. 3). Даптомицин је сврстан међу инхибиторе синтезе ћелијског зида (стр. 23), а протонска покретачка сила названа је протонским пумпама које избацују антибиотике (стр. 37). У хинолонском скелету замењени су положаји супституената: „dodatkom piperazina na C6 i fluora na C7“ (стр. 31), док иста страна и слика 1 дају исправан распоред. Ниједна од тих грешака не дотиче оглед, али у уводу дисертације то не би требало да стоји, а њихов број није занемарљив.

Трећа врста тиче се датирања појава у епидемиолошком прегледу. Више тврдњи о првим налазима не стоји: да је први налаз S. Typhimurium резистентне на флуорохинолоне објављен 1993 (стр. 41, без извора) — такви изолати описани су већ 1990–1991 (Howard и сар. 1990; Hof и сар. 1991); да је први налаз S. Typhi резистентне и на налидиксичну киселину и на ципрофлоксацин објављен 2007. у Индији (стр. 28) — наведени рад Kownhar и сар. 2007 говори о појави таквих сојева, а не о првом налазу, а S. Typhi с високом резистенцијом на ципрофлоксацин описана је у Индији и Бангладешу већ 2006 (Gaind и сар. 2006; Ahmed и сар. 2006); да је ензимска инактивација хинолона откривена 2004 (стр. 40, без извора) — механизам су описали Robicsek и сар. 2006. Тврдња да плазмидске ефлукс пумпе „Dosada ovi mehanizmi nisu otkriveni kod salmonela.“ (стр. 40) у време предаје више није важила за qepA: „To our knowledge, this is the first description of qepA in Salmonella.“ (Lunn и сар. 2010); рад ту преноси стање из прегледа на који се ослања (Gunell 2010). Ниједна од ових ставки не додирује резултате, али су оне разлог што увод, узет за себе, вреди мање од огледа.

Четврта је појмовне природе: реченица на стр. 1 смањену осетљивост на флуорохинолоне представља као узрок „pojave prvih salmonela rezistentnih na hinolone“, иако су резистенција на NAL и смањена осетљивост на флуорохинолоне исти фенотип једне мутације у *gyrA* — што рад тачно каже на стр. 35.

V Оглед, изолати и лабораторијски поступци

Опис колекција има три места која траже исправку, сва у опису, не у налазима.

Прво, географска одредба не одговара табелама. Метод каже да је 30 ветеринарских изолата потекло „sa farmi iz Južnobačkog okruga“, а 30 хуманих и из намирница „takođe sa područja Južnobačkog okruga“ (стр. 44). Табела 2 (стр. 45), међутим, за тринаест ветеринарских изолата наводи места у Сремском округу и Младеновац, а табела 3 за четири изолата из намирница Црвенку и Панчево — укупно седамнаест од шездесет изолата изван Јужнобачког округа. Порекло је у табелама наведено тачно, што говори у прилог документованости рада; колекцију би требало описати као изолате с подручја које покривају установе у Новом Саду, а закључак 3 ограничити на тај оквир.

Друго, колекција од 60 изолата назива се насумично одабраном — „Prvi deo istraživanja fokusirao se na karakterizaciju kolekcije od 60 nasumično odabranih izolata S. Enteritidis“ (стр. 80) — иако је састављена наменски, да обухвати све три категорије порекла, и садржи епидемијски повезане групе. То није мана нацрта: смернице ESGEM управо такав састав тест-популације траже: „The test population should include strains that are presumably unrelated epidemiologically, on the basis of detailed clinical and epidemiological data, as well as outbreak-related isolates.“ (van Belkum и сар. 2007, одељак Test population). Мана је назив: учесталости и индекси из такве збирке важе за тај узорак, а не као процена за популацију — што рад сам показује кад исту учесталост на већем узорку налази четири пута мањом.

Треће, начин избора 900 од 1558 примоизолата није описан. Однос према укупном броју наведен је тек у дискусији (стр. 85), а удео изолата из намирница није дат. Учесталост од 2,9 % зато важи за испитани узорак — који обухвата више од половине свих примоизолата, па налаз није доведен у питање — али је закључак 6 износи као тачкасту процену. Писано мерило постојало је у ветеринарском мониторингу ЕУ, који Србију није обавезивао: Одлука Комисије 2007/407/ЕС тражи „a representative random selection equal or larger than the target sample size“ и највише један изолат по серовару из исте епидемиолошке јединице годишње (Анекс, т. 1 и 2). Седам изолата из истог жаришта у фабрици бисквита подиже учесталост у 2005; рад их при поређењу двају периода изоставља, али то на том месту не каже: „Poređenjem istog perioda, od 393 ispitanih izolata S. Enteritidis iz 2005. i 2006. godine nađeno je 10 NAL rezistentnih izolata, odnosno svega 2.5%.“ (стр. 85). Изузимање је оправдано, али је требало да буде изречено, јер се иначе основица од 393 не може реконструисати.

Лабораторијски поступци описани су разумно потпуно, али с неколико неисказаних одступања од поступка CLSI, колико се он може видети у доступним издањима. Диск-дифузија је рађена по CLSI (M100-S18, 2008), а плоче су „inkubirane 24 h na 37°C“ (стр. 52; исти израз стоји и на стр. 49, за култивацију уопште); агар-дилуција је рађена по CLSI (M7-A7, 2006), уз исту инкубацију (стр. 54). Трајање је у оба случаја дуже од онога које CLSI прописује у издањима која претходе онима на која се рад позива (16–18 h за диск-дифузију, 16–20 h за агар-дилуцију; CLSI/NCCLS M100-S15,

2005), док је температура од 37 °C на горњој граници дозвољеног опсега (35 ± 2 °C, исто издање). Очитавање MIC описано је блаже него у стандарду: „Pod MIC-om je podrazumevana ona koncentracija antibiotika na kojoj nije bilo vidljivog porasta bakterija ili je taj porast zanemarljiv (2-3 kolonije).“ (стр. 54). Инокулум из капи од 3 µl суспензије од око 10^7 ћелија/ml износи око 3×10^4 ћелија, а не 10^4. Контролни опсег за ципрофлоксацин код соја E. coli ATCC 25922 наведен је као 0,008–0,03 mg/l, док табеле контроле квалитета важеће у време предаје рада дају опсег за једно разблажење нижи, 0,004–0,016 mg/l (EUCAST, QC табеле в. 1.3, 2010). Ниједно од тих одступања није означено као измена, али им је тежина мала: измерене вредности контролног соја (CIP 0,016 и 0,008 mg/l; NAL 1 и 2 mg/l) у исправном су опсегу, а сви изолати резистентни на NAL имали су MIC од најмање 128 mg/l. Одступања могу да помере само изолате на граници 0,064/0,125 mg/l за ципрофлоксацин и гранична очитавања зона за ампицилин и тетрациклин.

Две ставке тичу се граничних вредности и издања. Критеријуми за тетрациклин у табели 7 (R ≤ 14, I 15–18, S ≥ 19 mm) нису вредности издања на које се рад позива, него старије, ревидиране још 2007; пошто су интермедијерни изолати сврстани у резистентне, удео резистенције на TET и вишеструке резистенције код других серотипова могуће је прецењен, колико — не види се, јер пречници зона нису објављени. На налазе о хинолонима то не утиче. Друго, рад се 2011. позива на M100-S18 (2008) и M7-A7 (2006), док су у међувремену изашла новија издања (CLSI M02-A10 и M07-A8 из 2009, M100-S21 из јануара 2011), која сам издавач изричито тражи да се користе — „users should replace outdated editions with the current editions of CLSI documents“ (CLSI M100-S20-U, 2010, стр. i). Пошто ниједан изолат није био неосетљив на цефтриаксон, измена вредности за цефалоспорине на резултате не утиче; требало је, међутим, рећи зашто је задржано старије издање и уз диск-дифузију навести стандард методе (CLSI M02-A10), а не само табеле тумачења.

Сврставање интермедијерних изолата у резистентне отворено је исказано: „Izolati koji su dali intermedijernu zonu inhibicije za pojedine antibiotike svrstani su u rezistentne.“ (стр. 53). Такав избор је бранљив као опрезан приступ — дефиниције EUCAST-а интермедијерну категорију описују и као тампон-зону против техничких одступања: „it also indicates a buffer zone that should prevent small, uncontrolled, technical factors from causing major discrepancies in interpretations.“ (EUCAST, дефиниције граничних вредности, одељак Clinically Intermediate). Недостаје податак колико је изолата тим правилом прешло у резистентне, без кога учесталости у колекцији од 60 изолата нису непосредно упоредиве с другим студијама. За NAL то не важи, јер су сви резистентни изолати потврђени вредношћу MIC.

Најзад, две ситнице у опису реагенаса: у саставу декстрозног бујона наведено је непостојеће једињење K_2PO_4, а основни раствор етидијум-бромида дат је као 10 mg/l, по свој прилици омашком у јединици.

VI Типизација и дискриминативна моћ

Најозбиљнија замерка раду у целини тиче се поновљивости RAPD профила. Правило за издвајање типа гласи: „prvo je definisan osnovni, preovlađujući tip za svaki prajmer i nazvan tip A, a zatim je svaki novi tip koji se razlikovao od osnovnog tipa u jednom ili više fragmenata označen kao tip B, C, D ili E.“ (стр. 56). Разлика у једној траци, дакле, довољна је за нови тип. Метод на који се рад позива поставља строжи праг и проверава се понављањем: Betancor и сар. 2004 узимају у обзир само траке између 200 и 2000 bp, а профиле сматрају различитим тек кад се разликују у више од две траке („patterns were considered different when they differed by more than two bands“), а сваки сој испитују четири пута („each strain was assayed four times by two different operators“). Дисертација то одступање не образлаже, нити каже да су реакције понављане и концентрација ДНК уједначавана — иако на стр. 80 сама наводи да се проблем поновљивости превазилази оптимизацијом услова PCR и стандардизацијом концентрације ДНК. Мерило је постојало у смерницама ESGEM, које за PCR-отиске препоручују референтни узорак на сваком петом или шестом месту у гелу: „Every fifth or sixth lane should include a reference sample for normalisation.“ (van Belkum и сар. 2007, одељак Molecular typing strategies in a nutshell). Пошто се већина од шеснаест RAPD група разликује од основног типа у једној траци, не види се колико је тих разлика стварни полиморфизам; број група и оба индекса треба читати као горњу процену моћи разликовања. Рад притом изолате у целини тумачи као високо сродне („genetički vrlo sličnih izolata“, стр. 81). Двоје иде у прилог раду: заједнички профил трију епидемијски повезаних изолата посредан је доказ да метода није давала случајне профиле, а PCR-отисци су и у смерницама тог доба описани као метод за локалну примену („The most simple and rapid genotypic method for local application is PCR fingerprinting.“, van Belkum и сар. 2007, одељак Molecular typing strategies in a nutshell), па међулабораторијска упоредивост од њих није ни очекивана.

Друга замерка тиче се оцене дискриминативне моћи. Закључак 1 каже да је RAPD метода с четири прајмера „pokazala je zadovoljavajuću diskriminativnu moć“ (стр. 100), а дискусија да је комбинација трију метода „pokazala zadovoljavajuću diskriminatornu moć (D = 0.828)“ (стр. 80) — оба пута без исказаног мерила. Рад индекс преузима од Hunter-a и Gaston-a, а не преноси праг који они наводе: „an index of greater than 0.90 would seem to be desirable if the typing results are to be interpreted with confidence“ (Hunter и Gaston 1988, стр. 2466). Тај праг није апсолутан, а за клонски серотип Enteritidis вредност око 0,83 висока је према објављеним вредностима (рад наводи D = 0,664 за ранију RAPD типизацију, стр. 80); замерка није да је 0,828 мало, него да оцена нема критеријум. Из истог извора долази и озбиљније ограничење: индекс је дефинисан за несродне сојеве — „The discriminatory power of a typing method is its ability to distinguish between unrelated strains.“ — и за велике, репрезентативне

збирке („it is of most value for large and representative (nonlocal) collections of distinct strains“). Збирка од 60 изолата локална је и садржи повезане изолате, па индексе треба читати као поређење метода на истом скупу, а разлике у трећој децимали и вредности за мале подгрупе не као стварне.

Трећа замерка тиче се Dice коефицијента. Рад тврди: „Kada se uporede razlike između profila, za svaki prajmer Dice koeficijent je viši od 0.8, što govori o visokoj srodnosti svih izolata.“ (стр. 68) — али вредности и матрица нису приказани, а праг је преузет из рада који га изводи на PFGE профилима са више од двадесет трака (Lima и сар. 1997), уз дефиницију коју рад тачно преноси: „The Dice coefficient was calculated as the number of bands common to two isolates multiplied by two and then divided by the total number of bands.“ (Lima и сар. 1997, одељак Materials and methods). На RAPD профилима с пет до десет трака по прајмеру, у којима се типови по конструкцији разликују од основног у једној до две траке, вредност изнад 0,8 следи аритметички из начина на који су типови дефинисани. Формулација са стр. 55 — „Smatra se da su izolati sa DC ≥ 0.8 visoko srodni, odnosno istog klonalnog porekla (Lima et al., 1997).“ — зато је јача него што метода допушта; опрезнија формулација из дискусије, да то „ukazuje na verovatnu klonalnu povezanost izolata“ (стр. 81), боље одговара подацима, у складу с упозорењем да је „evidence for clonality is best considered relative rather than absolute“ (Tenover и сар. 1995, стр. 2233). Закључак о високој сродности по садржини није споран; спорно је што се представља као независна потврда.

Четврта замерка тиче се мутација у QRDR као типизационог маркера. Њихов домет рад сам трезвено оцењује: „SNP metoda nije doprinela diferencijaciji više sojeva od kombinacije RAPD i rezistotipizacije kod humanih izolata i S. Enteritidis iz namirnica (D = 0.810 i D = 0.833).“ (стр. 83). Није речено да те мутације настају под селекционим притиском хинолона и могу настати независно у различитим лозама, па истоветна замена не значи сродност; допринос маркера дискриминацији зато је мали (D са 0,820 на 0,828). Ни резистотип ни мутације у QRDR нису неутрални генетички маркери, па групе добијене њиховим укључивањем треба читати као типове, који не морају одговарати клонским линијама.

Уз то иду рачунске ситнице, које ништа не мењају. Индекс за прајмер OPB-17 у табели 14 износи 0,250, док из расподеле типова (56, 2, 1, 1 од 60 изолата) по формули са стр. 55 излази 0,129; за прајмер P1254 по истој формули излази 0,417 уместо 0,412. Комбиновани индекс за три методе износи 0,826, а не 0,828, колико стоји у сажетку, резултатима, дискусији и закључку 1. На стр. 68 стоји да је полиморфизам мутација раздвојио „osam izolata rezistentnih na NAL“ у три групе, а према табели 13 подељена група има седам изолата (дискусија на стр. 83 то описује исправно).

Најзад, закључак на једном месту иде даље од података. Сажетак тврди: „tipizacija je dokazala nasumičnu raspoređenost tipova u sve tri kategorije izolata, odnosno cirkulaciju sojeva kroz razne stadijume lanca ishrane.“ (сажетак). Подаци су с тим тумачењем сагласни, али га не доказују, јер је друго објашњење ограничена моћ разликовања код клонског серотипа, које рад наводи на стр. 82, а сажетак изоставља. По јачини тврдње одржив је одмерени закључак 3: „U ljudskoj i živinskoj populaciji na području Južnobačkog okruga cirkulišu visoko srodni izolati S. Enteritidis.“ (стр. 100), уз географску ограду из одељка V. Слично важи за фабрику бисквита: по табели 13 два од три изолата (641 и 1898) имају исти RAPD профил, па RAPD сам разликује два типа, а не три, како стоји на стр. 89; на најмање четири соја долази се тек кад се као разлике рачунају резистотип и тачкаста мутација. Навод са стр. 81 о три генетички различита соја тачан је у смислу генетичких група из табеле 13, које укључују и резистотип и мутацију. Налаз је сагласан с контаминацијом из више јаја, али је не доказује; подаци типизације не замењују епидемиолошке („Strain typing data do not substitute for epidemiologic data.“, Tenover и сар. 1995, стр. 2234), што је овде испоштовано тамо где је епидемиолошки податак постојао (хамбургерија), а мање у тумачењу налаза из фабрике бисквита.

VII Резистенција, MIC и мутације у QRDR

Молекуларни део је најчвршћи део рада. Свих 35 изолата резистентних на NAL секвенцирано је, уз унутрашњу контролу — „Sekvenciranjem QRDR regiona referentnog soja Salmonella Typhimurium ATCC 14028 (osetljiv na NAL) nisu otkrivene mutacije ni na jednom od ovih lokusa.“ (стр. 65). Закључак 8 прецизно је ограничен на испитано: „Kod svih NAL rezistentnih S. Enteritidis nađena je po jedna mutacija na 83. ili 87. poziciji QRDR regiona gyrA gena.“ (стр. 101). Праг смањене осетљивости узет је из рада који га изричито предлаже за салмонеле — „a breakpoint of ≥0.125 μg/ml for fluoroquinolones should be used when evaluating both laboratory sensitivity tests and for the surveillance of resistance to this important group of antimicrobials in both human and veterinary medicine.“ (Aarestrup и сар. 2003, стр. 828) — и јасно одвојен од клиничких граничних вредности. Разлику између епидемиолошких и клиничких граничних вредности рад јасно излаже: „Epidemiološke granične vrednosti detektuju bilo kakvu devijaciju u osetljivosti od divljeg tipa, ali nisu odgovarajuće za određivanje uspešnosti terapije antibiotikom.“ (стр. 92).

Епидемиолошка гранична вредност записана је погрешним знаком: „Za CIP prema EUCAST standardu izolati sa MIC ≥ 0.06 mg/l su epidemiološki rezistentni (Kahlmeter et al., 2003).“ (стр. 92). Извор на који се рад позива дефинише супротан однос — „The epidemiological cut-off value is expressed as WT ≤ X mg/L (in Figure 1 it is defined as WT ≤ 0.064 mg/L). In analogy with resistance, non-WT is defined as >X mg/L.“ (Kahlmeter и сар. 2003, стр. 146). Последица је да тврдња да би по епидемиолошком мерилу „svi

izolati NAL rezistentnih S. Enteritidis u ovom istraživanju bili bi rezistentni na CIP“ (стр. 92) важи за 34 од 35 изолата: изолат с вредношћу 0,064 mg/l био би дивљег типа. Уз то, слика 1 у том раду односи се на *Escherichia coli*, па је вредност за салмонеле наведена преко посредног извора уместо из табеле EUCAST-а.

Из истог круга је једна изостављена напомена. Табеле граничних вредности EUCAST важеће у време предаје рада уз ципрофлоксацин носе упозорење: „Salmonella spp. - there is clinical evidence for ciprofloxacin to indicate a poor response in systemic infections caused by Salmonella spp. with low-level fluoroquinolone resistance (MIC>0.064 mg/L).“ (EUCAST, Breakpoint tables в. 1.3, 05.01.2011, Enterobacteriaceae, напомена уз ципрофлоксацин); та напомена обухвата 34 од 35 изолата из рада. Закључак 6, да „Nije nađen nijedan izolat rezistentan na ciprofloksacin prema CLSI (‚Clinical and Laboratory Standards Institute‘) graničnim vrednostima.“ (стр. 100), тачан је и коректно ограђен називом стандарда, али је уз њега требало навести ту напомену. Садржину те напомене — да смањена осетљивост „može dovesti do neuspeha u terapiji“ (стр. 91) — рад ипак износи у дискусији. У прилог раду иде закључак 7, који тражи одређивање MIC код свих изолата резистентних на NAL „da bi se ustanovio nivo smanjene osetljivosti i kliničarima eventualno preporučila alternativna terapija“ (стр. 101) — најупотребљивија препорука рада, утемељена на подацима.

Тврдња о првенству изречена је шире него што један налаз носи: „Ovo je prvi poznati nalaz da je mutacija na poziciji 87 u QRDR gyrA gena uslovila MIC CIP ispod 0.125 mg/l.“ (стр. 93). Почива на једном одређивању MIC код једног изолата, једно двоструко разблажење испод прага, без понављања, док два изолата с истом заменом имају тачно 0,125 mg/l; обим претраге литературе није исказан. Јединствени захтеви уредника биомедицинских часописа, важећи у време предаје рада, траже уздржаност те врсте: „Avoid claiming priority or alluding to work that has not been completed.“ (ICMJE, Uniform requirements, април 2010, IV.A.8). Налаз је вредан као запажање, али као налаз који у прегледаној литератури није нађен и који тражи потврду.

Закључак 9 у другом делу тврди више него што анализа даје: „Nije ustanovljena korelacija između tipa mutacija i minimalnih inhibitornih koncentracija za nalidiksičnu kiselinu i za ciprofloksacin.“ (стр. 101). Веза није испитана ниједним тестом, групе су мале (23, 8 и 4 изолата) и разлике износе једно разблажење, па се однос не може ни потврдити ни искључити. Распон за једну замену није тачно пренет из сопствених табела: „Kod više izolata sa identičnom Asp87Gly mutacijom MIC za NAL kretao se od 128 do 512 mg/l, a za CIP od 0.064 do 0.512 mg/l (dijapazon od čak četiri razređenja).“ (стр. 93), док табеле 11 и 18 за осам изолата с том заменом дају MIC за NAL 128–256

mg/l и за CIP 0,064–0,256 mg/l. Поента остаје, у ужем распону, а сва три изолата с најнижим вредностима за ципрофлоксацин носе управо ту замену, што је требало поменути; исправније је рећи да на овом узорку веза није могла бити утврђена.

Закључак 10 категоричнији је од дискусије и сажетка: „Distribucija različitih mutanata NAL rezistentnih S. Enteritidis kao i diskontinuitet u šestogodišnjem periodu ukazuju da na području Južnobačkog okruga ne postoji klonalno širenje NAL rezistentnih sojeva S. Enteritidis.“ (стр. 101). Двадесет шест изолата из веће колекције није типизовано, а тип мутације није маркер клонске сродности; изостанак изолата резистентних на NAL у 2008. и разноврсност мутација говоре против једног доминантног клона, али не искључују ограничено клонско ширење. Дискусија је у томе опрезнија: каже да „govori o tome da je mala verovatnoća da postoji klonalno širenje NAL rezistentnih sojeva na teritoriji Južnobačkog okruga“ (стр. 94), а сажетак још тачније — „Nisu nađeni dokazi o klonalnom širenju sojeva rezistentnih na nalidiksičnu kiselinu.“ (сажетак). Та формулација требало је да стоји и у закључку.

Две мере опреза недостају око самих учесталости. Селекција је рађена на 64 mg/l NAL, једно (двоструко) разблажење изнад граничне вредности резистенције коју рад усваја (MIC ≥ 32 mg/l), па изолати с вредношћу 32 mg/l нису могли бити откривени; учесталости од 2,9 % и 9,7 % формално су доње границе, што рад не наводи — иако је, с обзиром на празнину у сопственим подацима између MIC ≤ 8 и ≥ 128 mg/l, потцењивање вероватно мало. Друго, проценти нису праћени интервалима поверења: „When possible, quantify findings and present them with appropriate indicators of measurement error or uncertainty (such as confidence intervals).“ (ICMJE, април 2010, IV.A.6.c).

Неколико бројчаних и терминолошких омашки треба исправити, иако не мењају смер налаза. Реченица „U većem uzorku, među 900 izolata S. Enteritidis iz ljudi i namirnica nađeno je svega 4.3% (11 izolata) sa nekim markerom rezistencije.“ (стр. 84) рачуна проценат на 254 рутинска антибиограма, не на 900 изолата, а тај подузорак не обухвата 26 изолата резистентних на NAL из истог скупа, од којих су дванаест били резистентни и на ампицилин. Резистенција једног изолата на цефалотин, цефалоспорин прве генерације, на стр. 87 названа је резистенцијом на цефалоспорине треће генерације — иако је рад на стр. 63 и 83 тачно означава, а на цефтриаксон није био резистентан ниједан изолат. На стр. 75 стоји „Rezistencija na CFT karakteristična je samo za serotip Hadar“, док табела 19 на истој страни ту резистенцију бележи и код једног изолата серотипа Typhimurium. Удео замене Asp87Gly наведен је као 22,8 % уместо 22,9 %, а удружена резистенција на ампицилин као 46,1 % уместо 46,2 %. Најзад, реченица на стр. 86 изводи да „se oni javljaju u istoj bakteriji nezavisno“, што се тешко мири са сопственим налазом да је 46 % изолата носило резистенцију на ампицилин и налидиксичну киселину заједно и с тумачењем на стр. 97–98 о њиховој учесталој удружености.

Тумачење ниске учесталости резистенције ослања се на објашњење које у раду нема потврду. Мања примена флуорохинолона код кока носиља и порекло родитељских јата изнети су по усменом саопштењу именованог стручњака (стр. 88), а рад сам наводи да праћење потрошње антибиотика у живинарству не постоји; сопствени налаз од пет изолата резистентних на NAL међу тридесет изолата из пилића ту претпоставку не подупире. Означавање извора је коректно, а рад објашњење износи као могуће — и тако га треба и читати: као претпоставку коју сопствени подаци не потврђују. И поређење са суседним земљама у закључцима 4 и 6 је описно: за непосредне суседе рад податке о резистенцији нема.

Најзад, тврдња о првенству у Србији: „Ovo je prvo istraživanje u Srbiji koje se bavi rezistencijom salmonela na hinolone, kao jednim od najznačajnijih problema salmoneloza.“ (стр. 84). Она се тешко брани, јер попис литературе рада садржи домаће саопштење о разлици резистенције серотипова Enteritidis и Infantis према налидиксичној киселини (Stojanov и сар. 2010). Тврдња са стр. 89 — „U ovom istraživanju prvi put u Srbiji analizirana je priroda mutacija koje determinišu smanjenu osetljivost na fluorohinolone.“ — тиме није погођена, али је и њу требало ограничити исказаним обимом претраге.

VIII Стандарди, епидемиолошки подаци, слике, табеле и језик

Позивања на стандарде тестирања осетљивости у целини су уредна: за сваки кључни поступак наведен је стандард или изворни рад с годином. Два места траже исправку. Пун назив европског тела на стр. 27 (као и у списку скраћеница) гласи „European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing“, уместо Committee on; иста омашка понавља се на стр. 91. Тврдња да је то тело „2009. godine usvojio nove, niže kliničke granične vrednosti za osetljivost na CIP koje podrazumevaju da su sojevi rezistentni već pri MIC > 1 mg/l, a osetljivi pri MIC ≤ 0.5 mg/l (EUCAST, 2009)“ (стр. 91) тачна је по вредностима, али не и по години усвајања, јер су вредности објављене раније.

Епидемиолошки део ослања се на извештаје који су тада били најновији (ECDC 2010; EFSA и ECDC 2011a; 2011b) и у највећем делу их преноси тачно. Стопе инциденце на стр. 76, међутим, нису из извештаја на који се позивају: за Словенију је наведено 118,1 и за Мађарску 134,6 на 100 000, док извештај за 2009. (EFSA и ECDC 2011a) даје 30,3 односно 58,2, а за Данску 38,6 уместо 33,1; вредност за Војводину (26,3) просек је за 2008–2010, не за 2007–2009. Закључак о релативно ниској пријављеној инциденци у Војводини остаје, али је распон преувеличан. Удео серотипа Enteritidis у Европи од 64,5 % (стр. 19) тачно је пренет (ECDC 2010), али се односи на 2007, што на том месту није речено. Реченица „Trenutno je od 1990-tih dominantan fagotip DT104“ (стр. 29) преноси стање из извора из 2000, док је по извештају за 2009. из пописа литературе рада (EFSA и ECDC 2011a) најчешћи

фаготип серотипа Typhimurium у ЕУ био DT193. На стр. 77 пораст случајева у Аустрији и Италији, који извештај бележи за људе, пренет је на живину. Ниједан од тих података не носи сопствени налаз; треба их исправити ради тачности.

Локални подаци имају назначен период и именовану установу, али не и појединачне изворе: бројеви о салмонелозама у Војводини на стр. 21 (септикемије, смртни исходи, удео деце, клицоноше) изнети су уз општу ознаку установе, па се не види који је број из ког годишњег извештаја, а узрасна расподела из извештаја за једну годину изречена је као општа особина. Основице од 1558 примоизолата и 254 антибиограма коректно су означене као интерни подаци, али без датума извода нису проверљиве.

Слике и табеле у резултатима, у целини, испуњавају задатак. Уредничких омашки има више него што приличи: у натписима слика 6 и 7 заостала је ознака „Slika 4.“; на сликама 3, 4 и 6 једна трака означена је бројем 358585, а изолат у табелама носи број 348585; маркер на слици 11 на гелу носи ознаку 50 bp, у натпису L500, а у методама је описан као маркер од 100 до 1000 bp; слика 11 приказује једанаест од двадесет шест изолата, без негативне контроле, а величина PCR продукта региона QRDR нигде није наведена; на стр. 70 панел антибиотика упућен је на табелу 6 уместо на табелу 5.

Језик и запис имају неколико неуједначености. Наслов одељка 3.2.8 гласи „3.2.8. Određivanje Simsonovog indeksa diverziteta (D)“ (стр. 55), док је у тексту одељка име исправно; пун назив америчког тела на стр. 88 гласи „Clinical Laboratory Standard Institute“; име серотипа јавља се и као S. Entritidis и као S. Enteriditis; за исто својство смењују се придеви дискриминативна, дискриминаторна и дискриминациона. Ниједна од ових ставки не мења смисао.

IX Научни апарат

Апарат рада је, у основи, уредан: свих 209 јединица пописа цитирано је у тексту, без празнина и двоструких јединица, а преузети приказ слике 1 и табеле 1 носе ознаку извора. Секвенце прајмера, реакциони састави и термички програми поклапају се с изворима, а референтна секвенца наведена је приступним бројем, сојем и изворним радом, што поравнање чини поновљивим.

Пропусти су формални, али бројни. Четири позивања немају јединицу у попису (Jacobsen и сар. 2011 на стр. 2; Eaves и сар. 2002 на стр. 35; Sjölund-Karlsson и сар. 2010 на стр. 40; Eaves и сар. 2005 на стр. 90), у два случаја вероватно због погрешне године уз постојећу јединицу. Три јединице немају годину (Gast и Holt; Giraud и сар.; Hakanen и сар.). Јединица за Ling и сар. 2003 носи свеску и стране другог рада, презимена су на више места погрешно написана (Robicsek, Jacoby, Schwarz, de Jong),

а азбучни ред нарушен је на шест места. Облик позивања није доследан, а код двају извештаја европских агенција из исте године то чини позивање двосмисленим, јер се ознаке a и b местимично изостављају.

Два пропуста прелазе оквир лектуре.

Први су секвенце. Секвенце региона QRDR за 35 изолата нису депоноване у јавну базу нити приложене уз рад, а методе не кажу да ли је секвенцирано у оба смера. Мерило за то у клиничкој микробиологији било је изричито и пре предаје рада: „Newly determined nucleotide and/or amino acid sequence data must be deposited and GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers must be included in the manuscript no later than the modification stage of the review process.“ (American Society for Microbiology 2011, Journal of Clinical Microbiology, упутство ауторима, Editorial Policy). То упутство дисертацију не обавезује, али показује шта се тражило за налаз ове врсте. Главни молекуларни налаз, саопштен само као кодон и замена по изолату, не може се независно проверити; с обзиром на слагање с фенотипом и на секвенцирани контролни сој, то је недостатак проверљивости, а не разлог за сумњу у налаз.

Други су интернет-извори и стандарди без датума приступа и ознаке издања — битно управо код табела граничних вредности и извештаја агенција, на којима почивају поређења у дискусији. Уз то, за диск-дифузију наведен је само документ с табелама тумачења, не и стандард методе, а епидемиолошка гранична вредност наведена је преко секундарног рада.

Усмена саопштења јасно су означена, с именом и установом, али без датума и писаног записа. Историјски део (стр. 3) и податак о синтези налидиксичне киселине (стр. 31) изнети су без позивања; како је реч о неспорним уџбеничким чињеницама, пропуст је само формалан.

X Однос рада и извештаја Комисије

Извештај Комисије, без иједне замерке, истиче да је у дисертацији приказана „прва молекуларно епидемиолошка анализа сојева S. Enteritidis који циркулишу међу пилићима и људима на северу Србије и прва анализа учесталости и молекуларних механизама резистенције на хинолоне код салмонела“. Оглед јесте самосталан и изведен у два корака, а његова два носећа налаза — кружење високо сродних изолата у ланцу исхране и расподела мутација у региону QRDR уз смањену осетљивост на ципрофлоксацин — утемељена су у подацима. Приказ огледа у извештају верно прати рад, укључујући и бројеве (26 од 900 изолата резистентних на NAL; смањена осетљивост код 25 од 26; три типа мутација). Три ствари, ипак, ваља рећи.

Прва: једна оцена извештаја не слаже се с прегледом литературе у самој дисертацији. Извештај наводи да постоје три врсте мутација које су и други аутори налазили, „с тим што нигде није нађена доминација Asp87Asn мутације као у овом истраживању“, а дисертација на стр. 90 сама наводи да је та замена била једина мутација код хуманих изолата у Литванији. Тврдња се може бранити само као доминација у збирци мешовитог порекла; то је недостатак извештаја, не рада.

Друга: извештај без ограде преузима тврдњу о првенству („У овом раду први пут је детектована мутација у QRDR региону gyrA гена код изолата који није показивао феномен смањене осетљивости на флуорохинолоне.“), чији је домет размотрен у одељку VII.

Трећа је начелна и тиче се домета сагласности коју је Веће научних области природних наука дало 26. априла 2012 (Одлука Већа, 2012). Веће оцењује реферат, а не сам рукопис: по Правилнику о већима научних области на Универзитету у Београду (2007, чл. 23, који изменама из 2009. и 2011. није мењан), веће научних области у том поступку оцењује да ли је дисертација у складу с темом на коју је Универзитет дао сагласност и да ли наводи реферата потврђују да су се стекли услови за одбрану. Одсуство примедаба у том поступку, дакле, не значи да их у раду нема.

XI Шта остаје

Дисертација Гордане Козодеровић самосталан је и добро изведен експериментални рад који домаћој микробиологији и молекуларној епидемиологији зооноза доноси: упоредну молекуларну карактеризацију сојева S. Enteritidis из пилића, намирница и људи с једног подручја, процену учесталости резистенције на хинолоне на узорку од више од половине свих примоизолата тог серотипа у шест година, и приказ природе мутација у региону QRDR гена *gyrA* уз измерене вредности MIC. Уз то доноси налаз с непосредном применом — жариште у погону који јаја користи као сировину — и препоруку лабораторијској пракси која из података следи без остатка: код сваког изолата резистентног на налидиксичну киселину одредити MIC за ципрофлоксацин. Нацрт огледа је промишљен, концентрација за скрининг изведена из сопствених мерења, свака позитивна селекција изолата S. Enteritidis потврђена двема независним методама, а грађа приказана до појединачног изолата. Тврдње рада у највећем делу се слажу с изворним текстовима и с његовим сопственим табелама, а рад на кључном месту проверава и исправља сам себе.

Слабости су четвороструке, и ниједна не руши носеће налазе: непроверена поновљивост RAPD типизације, због које су број група и индекси горња процена; оцене дискриминативне моћи и сродности без мерила, интервала поверења и теста; закључци који на три места иду даље од опрезнијих формулација из дискусије и

сажетка (клонско ширење, кружење сојева, првенство налаза); и празнине у апарату (недепоноване секвенце, позивања без јединице, неуједначено навођење). Мерење је у овој дисертацији брижљивије од закључивања, а оно што у закључцима треба поправити у највећем броју случајева већ је тачно написано на другом месту у истом раду. Реч је, дакле, о раду који тражи редакцију, а не ново истраживање.

За евентуално монографско издање или наставак истраживања најплодније би биле пет измена: исказати поновљивост типизације (поновљене реакције за профиле који се разликују у једној траци, уједначена количина ДНК, референтни узорак у сваком гелу, праг разлике из метода на који се рад позива); уз сваки индекс дати интервал поверења и мерило оцене — објављене вредности за исти, клонски серотип; ускладити закључке с дискусијом и сажетком; исправити мерне и бројчане ставке из одељака V–VIII и рећи да су учесталости резистенције, због прага селекције, доња граница; депоновати секвенце и ускладити попис и позивања.

Уз такву редакцију ова дисертација остаје вредан и употребљив допринос: њен нацрт у два корака, препорука о одређивању MIC и налаз о жаришту у прехрамбеном погону имају шта да кажу лабораторијској пракси и службама надзора, а њени подаци остају оно што им је највећа вредност — проверљиви.

Литература

Предмет осврта

Kozoderović, Gordana V. *Analiza prirode rezistencije na hinolone i molekularna tipizacija odabranih serotipova Salmonella enterica subspecies enterica* [докторска дисертација]. Биолошки факултет Универзитета у Београду, 2012. (Национални репозиторијум дисертација у Србији (НаРДуС), https://nardus.mpn.gov.rs/handle/123456789/2036; DOI 10.2298/bg20120614kozoderovic.)

Извештај Комисије за преглед и оцену докторске дисертације мр Гордане В. Козодеровић (Ј. Лозо, В. Милошевић, М. Велхнер, Н. Голић). Београд, 23.03.2012. (Материјал 16. седнице Већа научних области природних наука Универзитета у Београду, 26.04.2012.)

Одлука Већа научних области природних наука Универзитета у Београду о давању сагласности на реферат, 02 број: 06-18368/29-12, 26.04.2012.

Одлука Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду о прихватању извештаја ментора и образовању Комисије за преглед и оцену, бр. 15/526-04.11.2011 (наведена у извештају Комисије).

Валидација и тумачење метода типизације

Hunter PR, Gaston MA. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol 26(11): 2465–2466. doi:10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 33(9): 2233–2239. doi:10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995.

Grundmann H, Hori S, Tanner G. 2001. Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. J Clin Microbiol 39(11): 4190–4192. doi:10.1128/JCM.39.11.4190-4192.2001.

van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Fussing V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisse S, Struelens M; ESCMID Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM). 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. Clin Microbiol Infect 13(Suppl 3): 1–46. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01786.x.

Lima AAM, Sidrim JJC, Lima NL, Titlow W, Evans ME, Greenberg RN. 1997. Molecular epidemiology of multiply antibiotic-resistant Shigella flexneri in Fortaleza, Brazil. J Clin Microbiol 35(5): 1061–1065. doi:10.1128/jcm.35.5.1061-1065.1997.

Betancor L, Schelotto F, Martinez A, Pereira M, Algorta G, Rodríguez MA, Vignoli R, Chabalgoity JA. 2004. Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of Salmonella enterica serovar Enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. J Clin Microbiol 42(3): 1155–1162. doi:10.1128/JCM.42.3.1155-1162.2004.

Тестирање осетљивости, граничне вредности и надзор

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)/NCCLS. 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifteenth informational supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15. Wayne (PA): CLSI. (Коришћен званични португалски превод ANVISA.)

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard — seventh edition. CLSI document M7-A7. Wayne (PA): CLSI.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement. CLSI document M100-S18. Wayne (PA): CLSI.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard — eighth edition. CLSI document M07-A8. Wayne (PA): CLSI.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard — tenth edition. CLSI document M02-A10. Wayne (PA): CLSI.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement (June 2010 update). CLSI document M100-S20-U, Vol. 30 No. 15. Wayne (PA): CLSI.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement. CLSI document M100-S21, Vol. 31 No. 1. Wayne (PA): CLSI.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2011. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.3, January 5, 2011.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2010. EUCAST recommended strains for internal quality control. QC Tables, Version 1.3, December 2010.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST definitions of clinical breakpoints and epidemiological cut-off values [интернет-страница; документ из 2005, стање на снимку од 07.08.2011].

Kahlmeter G, Brown DFJ, Goldstein FW, MacGowan AP, Mouton JW, Österlund A, Rodloff A, Steinbakk M, Urbaskova P, Vatopoulos A. 2003. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. J Antimicrob Chemother 52(2): 145–148. doi:10.1093/jac/dkg312.

Aarestrup FM, Wiuff C, Mølbak K, Threlfall EJ. 2003. Is it time to change fluoroquinolone breakpoints for Salmonella spp.? Antimicrob Agents Chemother 47(2): 827–829. doi:10.1128/AAC.47.2.827-829.2003.

Commission of the European Communities. 2007. Commission Decision of 12 June 2007 on a harmonised monitoring of antimicrobial resistance in Salmonella in poultry and pigs (2007/407/EC). Official Journal of the European Union L 153, 14.6.2007: 26–29.

Епидемиолошки извештаји и референтни подаци

European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. 2011a. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. EFSA Journal 9(3): 2090. doi:10.2903/j.efsa.2011.2090.

European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. 2011b. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. EFSA Journal 9(7): 2154. doi:10.2903/j.efsa.2011.2154.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2010. Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe 2009 — revised edition. Stockholm: ECDC. (Поглавље Salmonellosis, подаци за 2007.)

Grimont PAD, Weill FX. 2007. Antigenic formulae of the Salmonella serovars. 9th ed. Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur.

Механизми резистенције и упоредни налази

Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC. 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nat Med 12(1): 83–88. doi:10.1038/nm1347.

Howard AJ, Joseph TD, Bloodworth LLO, Frost JA, Chart H, Rowe B. 1990. The emergence of ciprofloxacin resistance in Salmonella typhimurium. J Antimicrob Chemother 26(2): 296–298. doi:10.1093/jac/26.2.296.

Hof H, Ehrhard I, Tschäpe H. 1991. Presence of quinolone resistance in a strain of Salmonella typhimurium. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 10(9): 747–749. doi:10.1007/BF01972501.

Gaind R, Paglietti B, Murgia M, Dawar R, Uzzau S, Cappuccinelli P, Deb M, Aggarwal P, Rubino S. 2006. Molecular characterization of ciprofloxacin-resistant Salmonella enterica serovar Typhi and Paratyphi A causing enteric fever in India. J Antimicrob Chemother 58(6): 1139–1144. doi:10.1093/jac/dkl391.

Ahmed D, D'Costa LT, Alam K, Nair GB, Hossain MA. 2006. Multidrug-resistant Salmonella enterica serovar Typhi isolates with high-level resistance to ciprofloxacin in Dhaka, Bangladesh. Antimicrob Agents Chemother 50(10): 3516–3517. doi:10.1128/AAC.00667-06.

Lunn AD, Fàbrega A, Sánchez-Céspedes J, Vila J. 2010. Prevalence of mechanisms decreasing quinolone-susceptibility among Salmonella spp. clinical isolates. Int Microbiol 13(1): 15–20.

Радови из пописа литературе дисертације

Радови које осврт помиње као изворе дисертације (Heck 2009, Kownhar и сар. 2007, Olive и Bean 1999, Van Duijkeren и сар. 2003, Giraud и сар. 1999 и други) наводе се према њеном попису литературе (стр. 102–118), где их читалац може наћи, и овде се

не понављају; у наставку су издвојена четири рада о чијој садржини осврт износи највише појединости.

Kotetishvili M, Stine OC, Kreger A, Morris JG, Sulakvelidze A. 2002. Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental Salmonella strains. J Clin Microbiol 40(5): 1626–1635. doi:10.1128/JCM.40.5.1626-1635.2002.

Rychlik I, Svestkova A, Karpiskova R. 2000. Subdivision of Salmonella enterica serovar Enteritidis phage types PT14b and PT21 by plasmid profiling. Vet Microbiol 74: 217–225.

Weigel RM, Qiao B, Teferedegne B, Suh DK, Barber DA, Isaacson RE, White BA. 2004. Comparison of pulsed field gel electrophoresis and repetitive sequence polymerase chain reaction as genotyping methods for detection of genetic diversity and inferring transmission of Salmonella. Vet Microbiol 100: 205–217.

Stojanov I, Tambur Z, Ratajac R, Stojanović D, Prodanov-Radulović J, Pušić I, Kapetanov M. 2010. Razlika rezistencije Salmonella Enteridis i Salmonella Infantis prema nalidiksičnoj kiselini. Zbornik kratkih sadržaja, Simpozijum Stočarstvo, veterinarska medicina i ekonomika u ruralnom razvoju i proizvodnji zdravstveno bezbedne hrane sa međunarodnim učešćem, Divčibare: 39.

Извештавање и научни апарат

International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). 2010. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: writing and editing for biomedical publication. Updated April 2010.

American Society for Microbiology. 2011. Journal of Clinical Microbiology: 2011 instructions to authors. J Clin Microbiol 49(1): 1–21. doi:10.1128/JCM.01912-10.

Правни оквир поступка (стање у новембру 2011)

Закон о универзитету. „Службени гласник РС“, бр. 21/2002 (чл. 55, 58).

Закон о високом образовању. „Службени гласник РС“, бр. 76/2005, 100/2007 – аутентично тумачење, 97/2008, 44/2010 (чл. 128).

Правилник о већима научних области на Универзитету у Београду. „Гласник Универзитета у Београду“, бр. 134/2007, 150/2009 и 158/2011 (чл. 23 у основном тексту, изменама непромењен).