

3
4
5 IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

6
7 I PODACI O KOMISIJI:

8
9 1. Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju:

10 18. april 2018. godine, 185. sednica Nastavno-naučnog veća Fakulteta veterinarske medicine
11 Univerziteta u Beogradu.

12
13 2. Sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, zvanja, naziva uže
14 naučne oblasti za koju je izabran u zvanje, godinom izbora u zvanje i naziv fakulteta,
15 ustanove u kojoj je član komisije zaposlen:

- 16 • prof. dr Dejan Krnjaić, redovni profesor, Mikrobiologija sa imunologijom, 2016.
17 godine, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
18 • dr Maja Velhner, naučni savetnik, Mikrobiologija sa imunologijom, 2005. godine,
19 Naučni institut za veterinarstvo Novi Sad.
20 • prof. dr Zoran Stanimirović, redovni profesor, Biologija – genetika, 2010. godine,
21 Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
22 • prof. dr Marina Radojičić, vanredni profesor, Mikrobiologija sa imunologijom, 2017.
23 godine, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
24 • dr Edita Grego, naučni saradnik, Molekularna genetika mikroorganizama, 2016.
25 godine, Institut za javno zdravlje Srbije Dr Milan Jovanovic Batut.

26
27 II PODACI O KANDIDATU:

28
29 1. Ime, ime jednog roditelja, prezime:

30 Dalibor, Stojan, Todorović

31
32 2. Datum rođenja, opština, Republika:

33 04.06.1987. godine, Novi Pazar, Novi Pazar, Republika Srbija

34
35 3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze*:

36
37 4. Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka*:

38
39 III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:

40 Karakterizacija mehanizama rezistencije na antibiotike i molekularna tipizacija izolata
41 *Escherichia coli* poreklom od goveda i svinja

42
43 IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broja strana poglavlja, slika, šema,
44 grafikona i sl.):

45 Doktorska disertacija kandidata Dalibora Todorovića napisana je na 104 strane i
46 sadrži sledeća poglavlja: Uvod (tri strane), Pregled literature (28 strana), Cilj i zadaci
47 istraživanja (jedna strana), Materijal i metode rada (17 strana), Rezultati (21 strana), Diskusija
48 (15 strana), Zaključci (tri strane), Literatura (11 strana), Prilog 1 (dve strane), Prilog 2 (tri
49 strane). Kratak sadržaj na srpskom i engleskom jeziku nalazi se na prve četiri strane, a
50 biografija kandidata i izjave na poslednjih pet strana disertacije. U disertaciji se nalazi 36 slika
51 (devet slika u poglavlju Pregled literature, 12 u poglavlju Materijal i metode i 15 u poglavlju
52 Rezultati), 10 tabela (jedna tabela u poglavlju Pregled literature, dve u poglavlju Materijal i
53 metode i sedam u poglavlju Rezultati), dva grafikona (u poglavlju Rezultati) i jedna šema (u
54 poglavlju Materijal i metode).

1 **V VREDNOVANJE POJEDINIH DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis**
2 **svakog poglavlja disertacije: uvoda-do 250 reči, pregleda literature-do 500 reči, cilja i**
3 **zadataka istraživanja-nije ograničeno, materijal i metoda – nije ograničeno, rezultata –**
4 **nije ograničeno, diskusije-do 100 reči, spiska referenci-navesti broj referenci u**
5 **doktorskoj disertaciji):**

6 U **Uvodu** kandidat se osvrnuo na značaj očuvanja efikasnosti antibiotika kod lečenja
7 infekcija ljudi i životinja, i istakao da je prekomerna, nestručna i nesvrshodna primena
8 antibiotika i hemioterapeutika dovela do masovne pojave rezistencije bakterija prema
9 antibioticima praćene neefikasnom terapijom, težim zdravstvenim stanjem i povećanjem
10 smrtnosti obolelih. Naglašava da brojna naučna istraživanja ukazuju na kontinuirano
11 pojavljivanje i proširivanje rezistencije kod bakterija, što opravdava strahovanja o povratku
12 čovečanstva u doba preantibiotske ere i pojavi fatalnih infektivnih oboljenja bez mogućnosti
13 efikasne antimikrobne terapije. Pojava multiplorezistentnih mikroorganizama kod životinja ima
14 značajne implikacije po zdravlje ljudi, usled rizika od direktnog ili indirektnog prenošenja
15 rezistentnih patogenih bakterija sa životinja na ljude, kao i od horizontalnog transfera gena
16 rezistencije od bakterija poreklom od životinja u bakterije patogene za ljude. Kandidat
17 naglašava neophodnost odgovorne i racionalne primene antibiotika usled sposobnosti
18 bakterija da razviju rezistenciju na sve klase antibiotika, bilo da se radi o prirodnim
19 supstancama, polusintetičkim ili sintetičkim preparatima, a poseban problem predstavlja
20 primena antibiotika istog ili sličnog hemijskog sastava i/ili mehanizma delovanja u
21 veterinarskoj i humanoj medicini. Kandidat je opisao najvažnije mobilne genetičke elemente
22 kod bakterija, plazmide, transpozone, genske kasete i integrone kao i sposobnost bakterija da
23 ugrade, uklone i/ili podele gene rezistencije. Kandidat u uvodu ukazuje na značaj otkrivanja
24 multiplorezistentnih bakterija i determinacije mobilnih genetičkih elemenata, a time i mogućnosti
25 prenošenja rezistencije na druge mikroorganizme, i da praćenje rezistencije kod indikatorskog
26 mikroorganizma *Escherichia coli* (*E. coli*) može da posluži kao važan pokazatelj prisustva i
27 raširenosti rezistencije u životnoj sredini.

28 Poglavlje **Pregled literature** je podeljeno u devet potpoglavlja. U prva dva
29 potpoglavlja kandidat je izvršio analizu radova koji se odnose na morfologiju, fenotipske
30 osobine, identifikaciju i karakteristike *E. coli* kao oportunističkog patogena. U narednim
31 potpoglavljima veoma detaljno se navode podaci vezani za genetiku bakterija, antibiotike i
32 rezistenciju bakterija, transfer gena i mobilne genetičke elemente, mehanizme rezistencije
33 bakterija na antibiotike uključujući betalaktamske antibiotike, hinolone i fluorohinolone,
34 hloramfenikol i florfenikol, aminoglikozide, sulfonamide, trimetoprim i tetracikline. Kandidat je
35 u poslednja tri potpoglavlja pregleda literature detaljno analizirao literaturne podatke o
36 prevalenciji antimikrobne rezistencije u svetu, državama Evropske unije, Republici Srbiji i
37 državama okruženja.

38 **Cilj istraživanja** u okviru ove doktorske disertacije je bio da se sprovede ispitivanje
39 mehanizama rezistencije sojeva *E. coli* izolovanih od goveda i svinja kao i utvrđivanje značaja
40 infekcija rezistentnim sojevima i mogućeg transfera gena rezistencije po zdravlje životinja i
41 ljudi. Da bi se ispunio zadati cilj postavljeni su sledeći **zadaci**:

- 42 1. Utvrđivanje pojave multiple rezistencije kod izolata *E. coli* poreklom od svinja i iz
43 mleka krava sa kliničkim mastitisom primenom disk difuzionog testa.
- 44 2. Utvrđivanje vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika prema izolatima
45 *E. coli* primenom mikrodilucione metode u bujonu.
- 46 3. Utvrđivanje filogenetske pripadnosti multiplorezistentnih izolata *E. coli* određenim
47 filogenetskim grupama A, B1, B2 i D metodom lančane reakcije polimeraze
48 (Polymerase Chain Reaction - PCR).
- 49 4. Utvrđivanje genetičke srodnosti izolata *E. coli* metodom elektroforeze u pulsnom polju
50 i metodom nasumične amplifikacije polimorfne DNK (Random Amplified Polymorphic
51 DNA-RAPD).
- 52 5. Utvrđivanje prisustva gena *E. coli* koji kodiraju rezistenciju na određene klase
53 antibiotika PCR metodom.
- 54 6. Detekcija tačkastih mutacija na genima *E. coli* koji kodiraju enzime topizomeraze, a
55 koje uzrokuju rezistenciju na hinolone.

- 1 7. Detekcija gena *E. coli* odgovornih za rezistenciju na hinolone kodiranih sa plazmida
2 PCR metodom.
- 3 8. Utvrđivanje zastupljenosti integraza 1 i 2 i integrona 1 i 2 kod izolata *E. coli* PCR
4 metodom.
- 5 9. Utvrđivanje genetičkog sastava integrona, sekvenciranjem PCR produkata „primer
6 walking“ metodom i analiziranje sekvenci korišćenjem softver programa.
- 7 10. Ispitivanje mogućnosti prenosa plazmida između bakterija putem konjugacije i
8 detekcija gena rezistencije koji se nalaze na konjugabilnim plazmidima PCR
9 metodom.

10 **Materijal i metode rada** su detaljno opisani u posebnom poglavlju. Uzorci su
11 prikupljeni sa privatnih gazdinstva i farmi industrijskog tipa goveda i svinja sa teritorije
12 Autonomne pokrajine Vojvodine, kao i sa jedne farme sa teritorije Mačvanskog upravnog
13 okruga centralne Srbije. Uzorci u okviru istraživanja predstavljali su mleko krava kod kojih je
14 prethodno ustanovljen povećan broj somatskih ćelija kao i feces i rektalni brisevi bolesne
15 odlučene prasadi i tovljenika. Izolacija i identifikacija sojeva *E. coli* sa navedenih farmi muznih
16 krava i svinja izvedena je klasičnim mikrobiološkim metodama. Ispitivanje osetljivosti izolata
17 *E. coli* prema antibioticima vršeno je disk difuzionom metodom na agaru u skladu sa
18 standardom M100-S25 Instituta za klinička i laboratorijska ispitivanja (Clinical and laboratory
19 Standards Institute - CLSI). Ispitivanje osetljivosti disk difuzionom metodom izvedeno je
20 prema ampicilinu, amoksicilinu sa klavulonskom kiselinom, hloramfenikolu, ciprofloksacinu,
21 gentamicinu, nalidiksinskoj kiselini, streptomycinu, sulfonamidu, tetraciklinu, trimetoprimu sa
22 sulfametoksazolom, trimetoprimu, cefpodoksimu, cefotaksimom i ceftazidimom. Ispitivanje
23 produkcije enzima β -laktamaza proširenog spektra kod izolata *E. coli* (ESBL produceri)
24 izvedeno je primenom disk difuzione metode, u skladu sa standardom M100-S25 Instituta za
25 klinička i laboratorijska ispitivanja (CLSI), pomoću testa sinergizma antibiotika, cefotaksima i
26 cefotaksima sa klavulonskom kiselinom, odnosno ceftazidima i ceftazidima sa klavulonskom
27 kiselinom. Ispitivanje osetljivosti izolata *E. coli* prema antibioticima vršeno je mikrodilucionom
28 metodom u bujonu, određivanjem minimalne koncentracije antibiotika koja inhibira rast
29 bakterija (MIK), a u skladu sa standardom M007-A10 Instituta za klinička i laboratorijska
30 ispitivanja (CLSI). Kod izolata *E. coli* minimalna inhibitorna koncentracija je određivana sa
31 sledeće antibiotike: ampicilin, amoksicilin sa klavulonskom kiselinom, hloramfenikol,
32 ciprofloksacin, gentamicin, nalidiksinska kiselina, streptomycin, sulfametoksazol, tetraciklin,
33 trimetoprim, cefotaksim, ceftazidim i florfenikol (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Nemačka).
34 Primenom PCR metode utvrđena je filogenetska pripadnosti izolata *E. coli* prema određenim
35 filogenetskim grupama A, B1, B2 i D, sa tri prajmera *YjaA*, *TspE*, *ChuA*. Genetička srodnosti
36 izolata *E. coli* određivana je metodom elektroforeze u pulsnom polju i metodom nasumične
37 amplifikacije polimorfne DNK (Random Amplified Polymorphic DNA-RAPD – sa prajmerima
38 1254, 1290, 1252). Elektroforeza u pulsnom polju (PFGE) izvedena je u Institutu za javno
39 zdravlje Srbije "Milan Jovanović-Batut" korišćenjem sistema CHEF DR-III (Bio-Rad
40 Laboratories, Hercules, Sjedinjene Američke Države - SAD) i digestijom sa *XbaI* enzimom.
41 Detekcija gena rezistencije izolata *E. coli* vršena je PCR metodom i to gena koji kodiraju
42 rezistenciju prema hloramfenikolu (*catA1*, *catA2*, *catA3*, *cmlA*), trimetoprimu (*dfrA1*, *dfrA5/14*,
43 *dfrA7/17*, *dfrA12*, *dfrB1/B2*), florfenikolu (*floR*), streptomycinu (*strA*, *strB*), sulfonamidima (*sul1*,
44 *sul2*, *sul3*), tetraciklinu (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetH*, *tetM*, *tetO*),
45 streptomycinu/spektinomycinu (*aadA1*, *aadA2*), gentamicinu (*aac(3)-I*, *aac(3)-II*, *aac(3)-III*,
46 *aac(3)-IV*, *ant(2"-I)*), aminoglikozidima (*armA*), hinolonima (PMQR geni – *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*,
47 *qnrD*, *qnrS*, *aac 6'-Ib-cr*, *qepA*, *oqxA*, *oqxB*), fluorohinolonima (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*), i β -
48 laktamskim antibioticima (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M 8-25}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-2}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CM}).
49 PCR metoda je primenjivana i kod utvrđivanje prisustva integraza 1 i 2 kao i integrona 1 i 2
50 (*Int1*, 5'3'CS, *Int2*, Hep74 i Hep51). Ekstrakcija DNK izolata *E. coli* izvršena je držanjem
51 mikrotuba u ključaloj vodi u trajanju od 5 minuta, a za potrebe metode sekvenciranja, kao i
52 metode nasumične amplifikacije polimorfne DNK (Random Amplified Polymorphic DNA-
53 RAPD), DNK je ekstrahovana komercijalnim kitom za ekstrakciju DNK (QiAamp DNA Mini Kit,
54 proizvođača Qiagen, Hilden, Nemačka). PCR metoda je izvedena u aparatu Thermal cycler
55 TECHNE (Bibby Scientific LTD, Ujedinjeno Kraljevstvo) po odgovarajućem protokolu i u
56 optimalnim uslovima. Elektroforeza je izvedena na aparatu Labnet (Enduro, Horizontal gel
57 System, Woodbridge, NJ, SAD). Za vizuelizaciju PCR produkata na gelu korišćena je boja
58 GelPilot Loading dye (Qiagen, Hilden, Nemačka), dok je za određivanje veličine fragmenata
59 korišćen marker GelPilot Plus Ladder (Qiagen, Hilden, Nemačka) od 1000 bp i marker

1 GelPilot Plus Ladder (Qiagen, Hilden, Nemačka) od 3000 bp. Rezultati su očitavani na UV
2 transluminatoru proizvođača UVP, Upland, SAD. Za potrebe metode sekvenciranja, koja je
3 izvedena uslužno u laboratoriji GATC Biotech u Kelnu u Nemačkoj, dobijeni PCR produkti su
4 prečišćeni komercijalnim kitom za purifikaciju PCR produkata (PEQLAB, Wilmington, SAD).
5 Za analizu poređenja u BLAST-u dobijene sekvence obrađene su do konsenzus sekvence u
6 programu Bioedit. Utvrđivanje sekvence integrona metodom "primer walking" izvedeno je na
7 Institutu za kvalitet i bezbednost hrane u Hanoveru u Nemačkoj. Za analiziranje sekvenci
8 korišćen je softverski program DNAMAN verzija 7 (Lynnon, Corporation, Kvebec, Kanada).
9 Eksperiment konjugacije je izveden u Luria Bertani bujonu (Becton Dickinson, Le Pont de
10 Claix, Francuska) sa *E. coli* recipientom HK225 koji je rezistentan na rifampicin i streptomycin,
11 a elektroforezom u pulsnom polju (PFGE) determinisan je genetički profil dobijenih
12 transkonjuganata. Prisustvo gena rezistencije na transkonjugantima potvrđeno je PCR
13 metodom.

14 Originalni podaci koji su dobijeni u ovoj disertaciji izneti su u poglavlju **Rezultati**, a
15 prikazani su tekstualno, tabelarno, u slikama i grafikonima. Tokom 2013. i 2014. godine od
16 ukupno 104 uzorka mleka krava, *E. coli* je izolovana iz devet uzoraka. Primenom disk
17 difuzione metode utvrđeno je da su sedam izolata *E. coli* bili multiplorezistentni, odnosno da
18 su se odlikovali rezistencijom na tri i više antibiotika, dok su dva izolata imala rezistenciju na
19 manje od tri antibiotika. Tokom 2013. i 2014. godine ukupno je ispitano 39 uzoraka rektalnih
20 briseva. Iz svih briseva izolovana je *E. coli*, a primenom disk difuzione metode multipla
21 rezistencija ustanovljena je kod 15 izolata. Za dalja ispitivanja po principu, jedna farma jedan
22 izolat, odabrano je ukupno 22 multiplorezistentnih izolata *E. coli* sa farmi muznih krava i svinja,
23 od kojih su po dva izolata ispoljili rezistenciju na tri i četiri antibiotika, četiri na pet antibiotika,
24 četiri na šest antibiotika, jedan na sedam antibiotika, po dva na osam i devet antibiotika, četiri
25 na 10 antibiotika i jedan na 12 antibiotika. Svih 22 ispitanih izolata odlikovala su se
26 rezistencijom na streptomycin i tetraciklin (100%), 21 izolat na sulfonamide (95.5%), 17 izolata
27 na ampicilin (77.3%), 13 izolata na nalidiksinsku kiselinu (59.1%), 12 izolata na trimetoprim i
28 trimetoprim/sulfametoksazol (54.5%), 11 izolata na hloramfenikol (50%), 9 izolata na
29 ciprofloksacin (40.1%) i 7 izolata na gentamicin (31.8%). Samo kod dva izolata utvrđena je
30 rezistencija na cefpodoksim i cefotaksim (9.1%), a kod jednog izolata na ceftazidim (4.5%).
31 Kod dva izolata, po jedan poreklom od krava i svinja, primenom disk difuzione metode i
32 pomoću testa sinergizma cefotaksima i i cefotaksima sa klavulonskom kiselinom, odnosno
33 ceftzidima i ceftazidima sa klavulonskom kiselinom, dokazana je sposobnost produkcije β -
34 laktamaza proširenog spektra. Primenom mikrodilucione metode u bujonu određene su
35 vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika kod svih 22 izolata *E. coli*. Vrednosti
36 minimalne inhibitorne koncentracije kretale su se u opsegu od 2 do >512 mg/L za ampicilin,
37 od 4 do >128 mg/L za amoksicilin, od 2 do 16 mg/L za amoksicilin/klavulonsku kiselinu, od
38 0,25 do 32 mg/L za ceftazidim, od 0,031 do >32 mg/L za cefotaksim, od 0,004 do >128 mg/L
39 za ciprofloksacin, od 2 do 128 mg/L za hloramfenikol, od 4 do 512 mg/L za florfenikol, od 0,5
40 do 64 mg/L za gentamicin, od 2 do >1024 mg/L za nalidiksinsku kiselinu, od 8 do >1024 mg/L
41 za sulfametoksazol, od 32 do >512 mg/L za streptomycin, od 2 do 512 mg/L za tetraciklin, i od
42 0,25 do >512 mg/L za trimetoprim. Utvrđivanjem filogenetske pripadnosti izolata *E. coli* PCR
43 metodom od ukupno sedam ispitanih izolata poreklom od muznih krava šest izolata je
44 pripadalo komensalnoj filogenetskoj grupi A, a jedan izolat filogenetskoj grupi B1. Od ukupno
45 15 ispitanih izolata *E. coli* poreklom od svinja 11 izolata pripadalo je filogenetskoj grupi A, dok
46 su po dva izolata pripadali grupi B1 i grupi D. Prisustvo ekstraintestinalnih izolata *E. coli*
47 filogenetske B2 grupe nije ustanovljeno. Ispitivanjem genetičke srodnosti sojeva *E. coli*
48 razgradnjom sa *Xba*I enzimom i elektroforezom u pulsnom polju (PFGE) utvrđeni su njihovi
49 međusobno različiti PFGE fragmenti. I metodom nasumične amplifikacije polimorfne DNK
50 (RAPD) sa tri prajmera 1254, 1252 i 1290 kod svih ispitanih izolata ustanovljeni su drugačiji
51 PCR produkti. Na osnovu preporuke CLSI za kontrolu antimikrobne rezistencije kod familije
52 Enterobacteriaceae, primenom PCR metode izvršeno je kod izolata *E. coli* utvrđivanje
53 prisustva gena koji kodiraju rezistenciju na određene klase antibiotika. PCR metodom i
54 sekvenciranjem amplifikata kod 16 izolata *E. coli* utvrđena je rezistencija na ampicilin
55 kodirana gen *bla*_{TEM-1}. PCR metodom kod dva izolata *E. coli*, sa pozitivnim fenotipskim testom
56 za sinergizam antibiotika (cefalosporini sa i bez klavulonske kiseline), detektovan je gen
57 *bla*_{CTX-M1}. Dva izolata poreklom iz mleka krava imali su gene *bla*_{OXA} i *bla*_{CTX-M8-25}, koji nisu
58 ekspimirani s obzirom da fenotipski testovi za sinergizam nisu bili pozitivni, dok je prisustvo
59 gena utvrđeno PCR metodom. Rezistencija na gentamicin je pronađena kod šest izolata a

1 kod svih izolata PCR metodom detektovan je gen *aac(3)-II* koji kodira enzim aminoglikozid
2 acetiltransferazu. Kod 17 izolata *E. coli* otkrivena je rezistencija na streptomycin determinisana
3 *strA* i *strB* genima. Takođe, potvrđeno je postojanje rezistencije na streptomycin kodirane od
4 strane *aadA1* i *aadA2* gena. Pet izolata je imalo oba gena, pet izolata samo *aadA1* gen, a
5 jedan izolat gen *aadA2*. Rezistencija na sulfonamide bila je kodirana *sul1* genom kod pet
6 izolata, a preko *sul2* gena kod šest izolata. Gen *sul3* nađen je u kombinaciji sa *sul2* genom
7 kod dva izolata, dok su u kombinaciji geni *sul1* i *sul2* nađeni kod šest izolata. Rezistencija na
8 hloramfenikol je utvrđena kod 11 izolata, dok je kombinovana rezistencija na hloramfenikol i
9 florfenikol nađena kod pet izolata. Rezistencija izolata *E. coli* na hloramfenikol bila je kodirana
10 *cat1* genom kod četiri izolata, dok je samo kod jednog izolata nađen *cmlA* gen koji
11 obezbeđuje rezistenciju efluks mehanizmom. Kod pet izolata *E. coli* ustanovljeno je prisustvo
12 *floR* gena koji determiniše rezistenciju na florfenikol, a kod jednog izolata nađena su oba
13 gena *cmlA* i *floR*. Rezistencija na trimetoprim kodirana je preko gena dihidrofolat reduktaze
14 (*dfr*), a koji je ustanovljen kod 12 izolata *E. coli*. Gen *dfrA5/A14* je pronađen kod dva izolata *E.*
15 *coli* poreklom iz mleka krava i kod tri izolata poreklom od svinja. Gen *dfrA1* je nađen kod dva
16 izolata iz mleka krava i kod dva izolata od svinja. Gen *dfrA7/A17* detektovan je kod dva
17 izolata *E. coli* od svinja dok je gen *dfrA12* nađen samo kod jednog izolata *E. coli* iz mleka
18 krava. Za rezistenciju prema tetraciklinu odgovorni su *tet* geni, koji kodiraju transmembranske
19 proteine efluks pumpe. PCR metodom *tet* geni su nađeni kod svih ispitanih izolata *E. coli*. Kao
20 pojedinačni geni, *tetA* gen je detektovan kod 11 izolata *E. coli*, a *tetB* kod 10 izolata *E. coli*. U
21 kombinaciji *tetA/tetB* geni nađeni su samo kod jednog izolata *E. coli*. Od ukupno 22 ispitana
22 izolata *E. coli*, poreklom iz mleka krava i od svinja, rezistencija na ciprofloksacin je utvrđena
23 kod devet izolata, a rezistencija na nalidiksinsku kiselinu je utvrđena kod 13 izolata. Kod
24 izolata koji su imali minimalne inhibitorne koncentracije za ciprofloksacin od 4 do 32 mg/L
25 pronađene su tačkaste mutacije na *gyrA*, *parC* i *parE* genima koji kodiraju topoizomeraze. Na
26 *gyrB* genu nisu nađene mutacije ni kod jednog izolata. Najčešće zastupljene aminokiselinske
27 supstitucije su bile: Ser83→Leu, Asp87→Asn na *gyrA* genu, Ser80→Ile na *parC* genu i
28 Ser458→Ala na *parE* genu. Samo kod jednog izolata nađene su mutacije Ser83→Leu,
29 Asp87→Asn na *gyrA* genu, Ser80→Ile na *parC* genu i Ser458→Thr na *parE* genu. Minimalna
30 inhibitorna koncentracija na ciprofloksacin kod navedenog izolata bila je >128 mg/L. Izolati *E.*
31 *coli* kod kojih je ustanovljena rezistencija na nalidiksinsku kiselinu, a ne na ciprofloksacin,
32 imali su samo jednu mutaciju na *gyrA* genu. Kod tri izolata koja su bila rezistentna na
33 nalidiksinsku kiselinu nađena je supstitucija Ser83→Leu, a samo kod jednog izolata je
34 nađena substitucija Asp87→Asn. Primenom PCR metode i sekvenciranjem amplifikata kod tri
35 izolata *E. coli* nađeni su geni koji su kodirani sa PMQR plazmida, i to kod dva izolata gen
36 *aac(6)-Ib-cr*, a kod jednog gen *qnrS*. Integroni klase 1 su otkriveni kod 12 izolata *E. coli*, i to
37 kod tri izolata poreklom iz mleka krava sa mastitisom i kod devet izolata poreklom od svinja.
38 Integron klase 2 detektovan je samo kod jednog izolata poreklom od svinje, i to u kombinaciji
39 sa integronom klase 1. Najčešće zastupljena kombinacija genskih kasete je bila *dfrA17-*
40 *aadA5* i to kod četiri izolata poreklom od svinja. Kombinacija genskih kasete *dfrA1-aadA1*
41 detektovana je kod tri izolata. Dva izolata *E. coli* imala su gensku kasetu *aadA1*, dok su
42 gensku kasetu *aadA23* imala dva izolata. Kod jednog izolata *E. coli* nađene su genske kasete
43 *aadA2-linF*, a kod jednog izolata u integronu klase 2 genske kasete *aadA1-sat2*. Kod dva
44 izolata *E. coli* iako su PCR metodom detekovani *int1* i *int2*, nisu nađeni integroni klase 1 i 2.
45 Kod sva 22 izolata *E. coli* dokazano je prisustvo plazmida, a kod 16 izolata (73%) nađeni su
46 konjugabilni plazmidi. Eksperimentom konjugacije preko plazmida najčešće su preneti geni
47 koji kodiraju rezistenciju na ampicilin. Od ukupno 16 dobijenih *E. coli* transkonjuganta, gene
48 koji kodiraju rezistenciju prema ampicilinu imalo je 15, prema sulfonamidima 11, prema
49 tetraciklinu šest, prema florfenikolu pet i prema aminoglikozidima i trimetoprimu po dva
50 transkonjugata. Na jednom konjugabilnom plazmidu *E. coli* transkonjuganta PCR metodom
51 nađeni su geni *bla_{TEM}* i *bla_{CTX-M-1}* zajedno sa genom *sul2*, koji kodira rezistenciju na
52 sulfonamide. Kod jednog *E. coli* transkonjuganta sa *bla_{TEM}* genom na konjugabilnom plazmidu
53 detektovan je i *qnrS* gen koji kodira plazmidski prenosivu rezistenciju na fluorohinolone.
54 Eksperimentom konjugacije kod dva izolata *E. coli* dokazano je na plazmidima prisustvo po
55 pet različitih prenosivih gena rezistencije na antibiotike, i to kod jednog na ampicilin,
56 hloramfenikol, gentamicin, sulfonamide i trimetoprim, a kod drugog na ampicilin, gentamicin,
57 sulfonamide, trimetoprim i tetraciklin

58 U poglavlju **Diskusija** kandidat je razmotrio dobijene rezultate i uporedio ih sa
59 dostupnim podacima iz domaće i strane literature.

Poglavlje **Literatura** sadrži 146 bibliografskih jedinica uglavnom iz strane literature.

VI **ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA** (navesti zaključke koji su prikazani u doktorskoj disertaciji):

1. Kod sojeva *E. coli* poreklom sa farmi i gazdinstva goveda i svinja sa teritorije Autonomne pokrajine Vojvodine ustanovljena je široka rasprostranjenost multiple rezistencije,
2. Kod 22 reprezentativna soja sa istog broja farmi i gazdinstava utvrđena je kod 100% ispitanih izolata rezistencija na streptomycin i tetraciklin, 95.5% na suflonamide, 77.3% na ampicilin, 59.1% na nalidiksinsku kiselinu, 54.5% na trimetoprim i trimetoprim/sulfametoksazol, 50% na hloramfenikol, 40.1% na ciprofloksacin, 31.8% na gentamicin, 9.1% na cefpodoksim i cefotaksim, kao i 4.5% na ceftazidim.
3. Poređenjem dobijenih rezultata ispitivanja osetljivosti izolata *E.coli* disk difuzionom metodom i mikrodilucionom metodom u bujonu utvrđena je njihova izuzetno visoka podudarnost.
4. PCR metodom utvrđeno je da 17 izolata *E. coli* poreklom od krava i svinja pripadalo filogenetskoj grupi A a tri izolata grupi B1, grupama u koje spadaju uglavnom komensalni sojevi. Filogenetskoj grupi D u koju spadaju potencijalni ekstraintestinalni sojevi pripadalo je dva izolata, a nijedan izolat nije spadao u filogenetsku grupu B2 ekstraintestinalnih sojeva *E. coli*.
5. Metodama elektroforeze u pulsnom polju (PFGE) i nasumične amplifikacije polimorfne DNK (RAPD) utvrđeno je da izolati *E. coli* nisu genetički srodni, odnosno imali su različite makrorestriktivne i RAPD profile.
6. PCR metodom kod ispitanih izolata *E. coli* utvrđeno je prisustvo gena koji kodiraju rezistenciju na 14 antibiotika. Najzastupljeniji geni su bili *strA* i *strB* kod 17 izolata, zatim *bla_{TEM-1}* kod 16 izolata, kao i *tetA* i *tetB* kod 11 izolata. Genske kasete *aadA1* i *aadA2* imalo je 11 izolata *E. coli*, i to *aadA1* pet izolata, *aadA2* jedan izolat, dok je kombinaciju oba gena imalo pet izolata. Kod sedam izolata otkriveni su *sul2* geni, kod pet izolata *sul1* gen, kod šest izolata kombinacija *sul1* i *sul2*, a kod dva izolata kombinacija *sul2* i *sul3*. Geni koji kodiraju dihidrofolat reduktazu (*dfrA1*) nađeni su kod četiri izolata, *dfrA5-14* kod četiri izolata, *dfrA7-17* kod dva izolata i *dfrA12* kod jednog izolata. Geni koji kodiraju rezistenciju na hloramfenikol (*cat*, *cmlA* i *floR*) nađeni su kod četiri izolata (*cat* gen), kod šest izolata *floR* gen i kod jednog izolata *cmlA* gen.
7. Rezistencija na prošireni spektar beta laktamskih antibiotika kodirana *bla_{CTX-M-1}* genom nađena je kod dva izolata *E. coli*, i to kod jednog iz mleka krave sa mastitisom i drugog poreklom od svinje. Geni *bla_{OXA-1}*, *bla_{CTX-M8-25}* nađeni su kod dva izolata *E. coli* poreklom iz mleka krava sa mastitisom, ali nije potvrđeno da izolati imaju sposobnost produkcije ESBL.
8. Kod šest izolata *E. coli* utvrđena je rezistencija na aminoglikozide (gentamicin) kodirana *aac(3)-II* genom.
9. Kod pet izolata *E. coli*, tri poreklom od krava a dva od svinja, nađene su četiri mutacije na genima giraze A i topoizomeraze IV, i to dve mutacije na *gyrA* genu i po jedna mutacija na *parC* i *parE* genima. Četiri izolata poreklom od svinja imali su tri mutacije i to dve na *gyrA* genu i po jednu mutaciju na *parC* genu, a četiri izolata mutaciju samo na *gyrA* genu.
10. Kod jednog izolata *E. coli* iz mleka i kod jednog izolata poreklom od svinje ustanovljen je gen *aac6'lb-cr* koji kodira rezistenciju na hinolone i aminoglikozide, a lociran je na plazmidu. Kod jednog izolata *E. coli* poreklom od svinje pronađen je gen *qnrS* koji kodira rezistenciju na hinolone, takođe sa plazmida.
11. Kod 14 izolata *E. coli* otkriveno je prisustvo integraze 1, a kod dva izolata integraze 2. Kod 12 izolata *E. coli* ustanovljeni su integroni klase 1, a kod jednog izolata nađen je i integron klase 2 u kombinaciji sa integronom klase 1.
12. U integronima klase 1 kod dva izolata *E. coli* nađena je genska kasete *aadA1*, kod četiri izolata genske kasete *dfrA17-aadA5*, a kod tri izolata genske kasete *dfrA1-aadA1*. Kod jednog izolata *E. coli* iz mleka krava nađene su genske kasete *aadA2-linF*. Genska kasete *aadA23* pronađena je kod jednog izolata *E. coli* poreklom od svinje, a kod jednog izolata *E. coli* poreklom od svinje na integronu 1 je detektovana genska kasete *aadA23* a na integronu 2 su nađene kasete *aadA1-sat2*.

- 1 13. Svih 22 izolata *E. coli* poreklom od goveda i svinja posedovali su plazmide. Prisustvo
2 konjugabilnih plazmida je potvrđeno kod 16 izolata *E. coli*, odnosno kod 72,73%, a
3 kod 10 izolata, odnosno kod 45.45%, nađeni su multirezistentni konjugabilni plazmidi
4 sa genima rezistencije na tri i više antibiotika. Integroni klase 1 i 2 nisu dokazani na
5 konjugabilnim plazmidima.
- 6 14. Dobijeni rezultati prevalencije rezistencije i prisustva mnogobrojnih gena rezistencije
7 na antibiotike, kako u hromozomu tako u plazmidima uključujući i konjugabilne, kao i
8 integraza, integrona i genskih kaseti, jasno potvrđuju značaj *E.coli* po zdravlje
9 životinja i ljudi usled pojave infekcija rezistentnim sojevima i transfera gena
10 rezistencije poreklom od životinja u bakterije patogene za ljude.

11
12 **VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li**
13 **su dobijeni rezultati u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li**
14 **zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):**
15

16 Rezultati istraživanja, koje je u okviru izrade doktorske disertacije sproveo kandidat, su u
17 potpunosti u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja. Dobijeni rezultati prikazani
18 su precizno, logičnim redosledom, pregledno, jasnim i razumljivim stilom, a izvedeni zaključci
19 su jasno formulisani i u skladu sa postavljenim ciljem i proizilaze iz dobijenih rezultata
20 istraživanja.

21
22 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**
23

24 **1. Da li je disertacija napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme?**
25

26 Doktorska disertacija kandidata Dalibora Todorovića pod naslovom „Karakterizacija
27 mehanizama rezistencije na antibiotike i molekularna tipizacija izolata *Escherichia coli*
28 poreklom od goveda i svinja“ je napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi
29 teme.

30
31 **2. Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?**
32

33 Doktorska disertacija kandidata Dalibora Todorovića pod naslovom „Karakterizacija
34 mehanizama rezistencije na antibiotike i molekularna tipizacija izolata *Escherichia coli*
35 poreklom od goveda i svinja“ sadrži sve bitne elemente u skladu sa zahtevima za završenu
36 doktorsku disertaciju.

37
38 **3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?**
39

40 U okviru doktorske disertacije kandidata Dalibora Todorovića izvršena je sveobuhvatna
41 karakterizacija mehanizama rezistencije na antibiotike i molekularna tipizacija izolata
42 *Escherichia coli* poreklom od goveda i svinja. Dobijeni rezultati su prvi takve vrste u Republici
43 Srbiji i omogućavaju dalja istraživanja prisustva i mehanizama antimikrobne rezistencije i
44 mogućnosti borbe protiv pojave i širenja rezistencije bakterija na antibiotike kod životinja i kod
45 ljudi.

46
47 **IX SPISAK NAUČNIH RADOVA SADRŽINSKI POVEZANIH SA DOKTORSKOM**
48 **DISERTACIJOM U KOJIMA JE DOKTORAND PRVI AUTOR ODNOSNO AUTOR SA**
49 **NAJVEĆIM DOPRINOSOM (napisati imena svih autora, godinu objavljivanja, naslov**
50 **rada, naziv časopisa, impakt faktor i klasifikaciju prema Pravilniku o postupku, načinu**
51 **vrednovanja, i kvantitativnom iskazivanju naučnoistraživačkih rezultata istraživača):**

52 1. **Dalibor Todorović**, Maja Velhner, Edita Grego, Dejan Vidanović, Dubravka Milanov, Dejan
53 Krnjaić, Corinna Kehrenberg, 2018, Molecular characterization of multidrug resistant
54 *Escherichia coli* isolates from bovine clinical mastitis and pigs in the Vojvodina Province,
55 Serbia, Microbial Drug Resistance, Volume 24, Number 1, 95-103, IF 2.306, M22.

56 2. **Todorović Dalibor**, Velhner Maja, Milanov Dubravka, Vidanović Dejan, Suvajdžić Ljiljana,
57 Stojanov Igor, Krnjaić Dejan, 2015, Characterization of tetracycline resistance of *Salmonella*
58 enterica subspecies enterica serovar Infantis isolated from poultry in the northern part of
59 Serbia, Acta Veterinaria-Belgrade, Volume 65, Number 4, 548-556, IF 0,741, M22.

60

1 X PREDLOG:
2

3 Na osnovu ukupne ocene disertacije, komisija predlaže (odabrati jednu od tri
4 ponuđenih mogućnosti):

5 - da se doktorska disertacija prihvati a kandidatu odobri odbrana

6 - da se doktorska disertacija vrati kandidatu na doradu

7 - da se doktorska disertacija odbije
8

9
10 DATUM

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

11
12 28.05. 2018. godine
13

- 14
15
16 1. Dr Dejan Krnjaić, red.prof.
17 Fakultet veterinarske medicine
18 Univerzitet u Beogradu
19
20
21
22
23 2. Dr Maja Velhner, naučni savetnik,
24 Naučni institut za veterinarstvo
25 Novi Sad
26
27
28
29
30 3. Dr Zoran Stanimirović, red. prof.
31 Fakultet veterinarske medicine
32 Univerzitet u Beogradu
33
34
35
36
37 4. Dr Marina Radojičić, vanred. prof.
38 Fakultet veterinarske medicine
39 Univerzitet u Beogradu
40
41
42
43
44 5. Dr Edita Grego, naučni saradnik,
45 Institut za javno zdravlje Srbije
46 Dr Milan Jovanovic Batut
47
48
49