

ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

-обавезна садржина- свака рубрика мора бити попуњена

(сви подаци уписују се у одговарајућу рубрику, а назив и место рубрике не могу се мењати или изоставити)

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ
<ol style="list-style-type: none"> 1. Датум и орган који је именовao комисију 23.06.2016. год., Наставно-научно веће Пољопривредног факултета Универзитета у Новом Саду 2. Састав комисије са знаком имена и презимена сваког члана, звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање, датума избора у звање и назив факултета, установе у којој је члан комисије запослен: <ol style="list-style-type: none"> 1. Др Марија Пајић, доцент, Болести животиња и хигијена анималних производа, 16.04.2015. год., Пољопривредни факултет, Нови Сад – ментор; 2. Др Бранко Велебит, виши научни сарадник, Микробиологија хране, 28.01.2016. год., Институт за хигијену и технологију меса, Београд - ментор; 3. Др Станко Бобош, редовни професор, Болести животиња и хигијена анималних производа, 01.09.2006. год., Пољопривредни факултет, Нови Сад; 4. Др Миодраг Радиновић, доцент, Болести животиња и хигијена анималних производа, 04.06.2013. год., Пољопривредни факултет, Нови Сад; 5. Др Анка Поповић Врањеш, редовни професор, Сточарство, 03.07.2006. год., Пољопривредни факултет, Нови Сад.
II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ
<ol style="list-style-type: none"> 1. Име, име једног родитеља, презиме: Милијана, Мирко, Бабић 2. Датум рођења, општина, држава: 28.04.1984. год., Лазаревац, Република Србија 3. Назив факултета, назив студијског програма дипломских академских студија – мастер и стечени стручни назив Пољопривредни факултет Универзитета у Новом Саду, Ветеринарска медицина, доктор ветеринарске медицине 4. Година уписа на докторске студије и назив студијског програма докторских студија 2012. год., Ветеринарска медицина 5. Назив факултета, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране: - 6. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука: -
III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:
„Испитивање експресије гена за синтезу стафилококног ентеротоксина А и токсина TSST-1 код <i>Staphylococcus aureus</i> у млеку“

IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Навести кратак садржај са знаком броја страна, поглавља, слика, шема, графикона и сл.

КРАТАК САДРЖАЈ

Staphylococcus aureus је убиквитаран микроорганизам, широко распрострањен у животној средини. Главни је узročник маститиса код млечних крава, па тако узрокује велике здравствене и економске проблеме. Може бити присутан у млеку и производима од млека који се термички не обрађују, али и у термички обрађеним производима накнадном контаминацијом од стране човека. Битна карактеристика овог микроорганизма је способност стварања екстрацелуларних ензима и токсина који представљају главни узрок тровања храном. Да би се синтетисала довољна количина ентеротоксина која може изазвати интоксикације код људи, потребно је да у храни буде присутно више од 10^5 CFU *S. aureus*/mL.

S. aureus синтетише више врста токсина који изазивају различите ефекте на ћелије човека и других сисара. Синтеза ентеротоксина зависи од активности гена за регулацију експресије стафилококних ентеротоксина (SEs) и TSST-1. Постоји више фактора који спречавају или стимулишу синтезу ентеротоксина као што су: температура, рН, a_w , кисеоник, редокс потенцијал и др. Ентеротоксини се синтетишу при температури у распону од 10°C до 46°C, при рН од 5 до 9,6, активности воде од 0,86 до 0,99 и концентрацији NaCl до 12%.

Налаз ентеротоксогених стафилокока у храни не значи да ће доћи до тровања, јер услови матрикса хране и средине одређују преживљавање, раст популације стафилокока и стварање довољне количине ентеротоксина које могу изазвати обољење код људи.

Циљ овог истраживања био је да се испита утицај различите температуре, времена чувања и матрикса на степен експресије гена за синтезу ентеротоксина А и токсина TSST-1, како би се спровела што објективнија анализа ризика.

Материјал за експерименталну инокулацију представљало је краткотрајно стерилизовано и пастеризовано кравље млеко са 3,2% млечне масти и референтни сојеви *S. aureus* који синтетишу стафилококни ентеротоксин А и токсични шок синдром токсин 1. Експериментални рад одвијао се у две фазе. У првој фази експеримента, одабрана је храна анималног порекла (млеко) која симулира најчешће изворе токсинфекције *S. aureus*. Млеко (пастеризовано и УНТ) је инокулисано одређеном количином преконоћне бујонске суспензије референтног соја *S. aureus*, у којој је претходно утврђен иницијални број. Узорци су чувани при температурама 15°C и 22°C током 24, 48 односно 72 часа. Након 24, 48, односно 72 часа контаминирано млеко инокулисано је на Baird-Parker agar (ISO 6888-1), а након инкубације подлога пребројан је број израслих колонија *S. aureus* и упоређен са иницијалним бројем. Паралелно са инокулацијом ETGP агара, узета је одређена количина млека која је потом третирана течним азотом да би се конзервисала и РНК тј. да би се „замрзнуо“ експресиони генетски профил *S. aureus*. Из замрзнутих узорака екстрахована је РНК, која је потом методом реверзне транскрипције - *Real Time* PCR преведена у одговарајућу кДНК сваког од испитиваних гена. Квантификација стафилококног ентеротоксина А одређена је помоћу дијализне концентрације и ELFA методе.

У истраживањима ове дисертације може се уочити статистички значајна разлика између степена експресије *sea* гена у пастеризованом млеку чуваном при температури од 22°C током 24 сата у односу на калибратор (*S. aureus* у млеку чуваном при 8°C), што се поклапа са постигнутим бројем *S. aureus* од 10^5 CFU/mL и имунохроматографски детектованом количином ентеротоксина А. Степен експресије ентеротоксина А у пастеризованом млеку чуваном при температури од 15°C током 72 сата статистички се значајно разликује у односу на калибратор, што се такође подудара са детектованом количином ентеротоксина А. У УНТ млеку чуваном током 24 сата при температури од 22°C, односно током 48 сати при температури од 15°C утврђена је статистички значајна разлика у степену експресије у односу на калибратор, што се подудара са детектованом количином ентеротоксина А и динамиком промене броја *S. aureus*. На основу ових података можемо закључити да интензитет експресије *sea* гена одговара количини физички „*de novo*“ синтетисаног ентеротоксина А. Степен експресије *tst* гена показао је статистички значајну разлику у односу на калибратор у пастеризованом и УНТ млеку након 24 сата при температури од 22°C, и 48 сати при температури од 15°C, док је број *S. aureus* позитиван на TSST-1 прелазно 10^5 CFU/mL у пастеризованом и УНТ млеку након 24 сата чуваном при 15°C, односно 22°C.

Обзиром на мали број литературних података о утицају састава хране, температуре и

времена чувања као и других парagenetskih фактора на регулацију патогености *S. aureus*, добијени резултати могу представљати полазну основу за испитивање значаја генетског профила патогености *S. aureus* у храни на развој инфекције код потрошача.

Докторска дисертација садржи 97 страна, 8 табела, 10 графикана, 17 слика, 146 референци и један прилог, оригинал на српском језику и кратак садржај на српском и енглеском језику, подељена је у уобичајена поглавља: увод, преглед литературе, циљеви и задаци истраживања, материјал и методе, резултати, дискусија, закључци, литература, прилог и биографија.

V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Кратак садржај - Кратак садржај написан је на српском и енглеском језику, представља сажет и јасан општи преглед дисертације. Из њега се може стећи јасна слика проблема, главних налаза и кључних закључака ове дисертације.

Наслов рада – је јасно формулисан, прецизан и у складу са тематиком и садржајем дисертације.

Увод – У уводу је изнета проблематика присуства *Staphylococcus aureus* у млеку као и у производима од млека који се термички не обрађују, али и у термички обрађеним производима накнадно контаминираним од стране човека. Поред тога, укратко је описано и присуство ентеротоксина А и токсин TSST-1 у млеку.

Комисија сматра да је у уводу јасно наговештена и оправдана тема испитивања, исти је написан разумљиво и пружа уводне напомене актуелне проблематике истраживања.

Преглед литературе – У прегледу литературе дати су научни подаци о присуству *Staphylococcus aureus* и стафилококних ентеротоксина у млеку, као и експресија *sea* и *tst* гена, у циљу спречавања тровања храном код потрошача.

Детаљно су обрађене следеће области: *Staphylococcus aureus*, Особине *Staphylococcus aureus*, Биохемијске особине *S. aureus*, Патогеност *S. aureus*, Експресија гена, Фактори који утичу на раст *S. aureus* и на синтезу ентеротоксина, Токсин 1 токсичног шок синдрома, Храна као извор тровања стафилококним ентеротоксинима, Присуство гена за синтезу ентеротоксина *S. aureus* у млеку и производима од млека, ELFA метода, Ланчана реакција полимеразе (PCR), Историја настанка методе, Принцип методе PCR, Развој квантитативног PCR-а, *Real Time* PCR, Квантификација у *Real Time* PCR систему, Реверзна транскрипција- *Real Time* PCR.

Укупно гледано, преглед литературе веома је садржајан, са логичним следом и узима у обзир све до сада познате чињенице које указују на значај одабране теме и анализу добијених резултата.

Циљеви и задаци дисертације - Поглавље Циљеви и задаци дисертације приказано је на јасан начин са датим разлозима који ово испитивање чине актуелним. Изложени задаци јасно су приказани и представљају логичну целину.

Материјал и методе - Материјал и методе наведени су прецизно и систематично, омогућују поновљивост испитивања и огледа. Истраживања су спроведена у Лабораторији за хигијену намирница анималног порекла Департмана за ветеринарску медицину, Пољопривредног факултета у Новом Саду и у Институту за хигијену и технологију меса у Београду. Материјал за експерименталну инокулацију представљао је краткотрајно стерилизовано и пастеризовано кравље млеко са 3,2% млечне масти и референтни сојеви *S. aureus* који синтетишу стафилококни ентеротоксин А и токсин 1 токсичног шок синдрома. Експериментални рад одвијао се у две фазе. У првој фази експеримента, одабрана је храна анималног порекла (млеко) која симулира најчешће изворе токсинфекције *S. aureus*. Млеко (пастеризовано и УНТ) је инокулисано одређеном количином преконоћне бујонске суспензије референтних сојева *S. aureus*, у којима је претходно утврђен иницијални број. Узорци су чувани при температурама 15°C и 22°C током 24, 48 односно 72 часа. Након 24, 48, односно 72 часа контаминирано млеко инокулисано је на Baird-Parker agar (ISO 6888-1), а након инкубације подлога пребројан је број израслих колонија *S. aureus* и упоређен са иницијалним бројем. Паралелно са инокулацијом ETGP агара, узета је одређена количина млека која је потом третирана течним азотом да би се конзервисала иРНК тј. да би се „замрзнуо“ експресиони генетски профил *S. aureus*. Овако третиран узорак чуван је при температури од -30°C до почетка друге фазе експеримента. После упоређивања броја израслих колонија *S. aureus* из испитиваних узорака и иницијалног броја, затим замрзавања експресионог профила, приступило се другој фази експеримента. Из замрзнутих узорака екстрахована је РНК, која је потом методом реверзне транскрипције преведена у одговарајућу кДНК сваког од испитиваних гена. На крају експеримента кДНК *sea* и *tst* гена релативно је квантификована у односу на референтни ген и на тај начин израчунат је ниво експресије ових гена у млеку при различитим температурама и времену

чувања у односу на експресију у нормалним условима. Експеримент је поновљен три пута да би се добили што кохерентнији резултати. Методе које су коришћене у експерименту су: SRPS ISO 6888-1:2009 Хоризонтална метода за одређивање броја коагулаза позитивних стафилокока (*Staphylococcus aureus* и друге врсте) - део 1: техника употребом агара по Берд Паркеру, испитивање експресије гена за синтезу ентеротоксина А и токсина TSST-1 техником реверзне транскрипције и *Real Time PCR* и екстракција и квантификација стафилококног ентеротоксина А помоћу дијализне концентрације и ELFA методе.

Коришћени материјал и методе за испитивање одговарају савременим методама и у складу су са постављеним циљевима и задацима.

Резултати испитивања – Резултати испитивања приказани су темељно и јасно уз коришћење табела, графикана и слика. Редослед приказаних резултата прати ток научног истраживања. Прво су изнети резултати о промени броја *Staphylococcus aureus* који носи ген за стафилококни ентеротоксин А и токсин TSST-1 у пастеризованом и УНТ млеку чуваном при различитим температурама (15°C и 22°C) током 24, 48 и 72 сата. Затим су изнети резултати о синтези стафилококног ентеротоксина А у пастеризованом и УНТ млеку чуваним при температурама од 15°C и 22°C током 24, 48 и 72 сата. На крају приказани су резултати експресије *sea* и *tst* гена у пастеризованом и УНТ млеку чуваним при температурама од 15°C и 22°C током 24, 48 и 72 сата.

Може се закључити да су налази по постављеним задацима јасно приказани, научно значајни и потпуно разумљиви.

Дискусија - Дискусија је свеобухватна и јасно написана и у њој се дотичу сви резултати из дисертације. Дискусија разматра добијене резултате, пореди их са досадашњим истраживањима и тумачи према најновијим сазнањима из обрађене области. У дискусији нису утврђене нелогичности, даје се укупан приказ рада који допуњује досадашња истраживања из области разматрања.

Закључци - Изнесени закључци потпуно су у складу са задацима и циљевима испитивања и правилно су изведени из добијених резултата. Закључци изведени из добијених резултата значајни су за науку и праксу.

Литература - Коришћена литература је савремена и правилно одабрана према захтевима теме која се разматра.

VI СПИСАК НАУЧНИХ И СТРУЧНИХ РАДОВА КОЈИ СУ ОБЈАВЉЕНИ ИЛИ ПРИХВАЋЕНИ ЗА ОБЈАВЉИВАЊЕ НА ОСНОВУ РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА У ОКВИРУ РАДА НА ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

M23

- **Babić M, Pajić M, Nikolić A, Teodorović V, Mirilović M, Milojević L, Velebit B. (2018)** Expression of toxic shock syndrome toxin-1 gene of *Staphylococcus aureus* in milk – a proof of concept. *Mljekarstvo*. 68(1): *in press*

Таксативно навести називе радова, где и када су објављени. Прво навести најмање један рад објављен или прихваћен за објављивање у часопису са ISI листе односно са листе министарства надлежног за науку када су у питању друштвено-хуманистичке науке или радове који могу заменити овај услов до 01. јануара 2012. године. У случају радова прихваћених за објављивање, таксативно навести називе радова, где и када ће бити објављени и приложити потврду о томе.

VII ЗАКЉУЧЦИ ОДНОСНО РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

На основу резултата добијених у оквиру ове докторске дисертације изведени су следећи закључци:

- Број SEA позитивног *S. aureus* у узорцима пастеризованог млека чуваног при 15°C, премашио је критичну вредност од 10⁵ CFU/mL, која представља праг за синтезу ентеротоксина и повећан ризик од алиментарне стафилококне интоксикације, за мање од 48 сати инкубације, док је код млека чуваног при 22°C, та вредност достигнута за само 24 сата инкубације.
- Број SEA позитивног *S. aureus* у узорцима УНТ млека чуваног при 15°C, односно 22°C премашио је вредност од 10⁵ CFU/mL за само 24 сата инкубације.
- Број TSST-1 позитивног *S. aureus* и у узорцима пастеризованог и УНТ млека чуваним при 15°C и 22°C премашио је вредност од 10⁵ CFU/mL за само 24 сата инкубације.
- Утицај матрикса (пастеризовано и УНТ млеко) на промену броја SEA позитивног и

TSST-1 позитивног *S. aureus*, није показивао статистички значајне разлике у нето вредностима броја у периоду од момента контаминације до краја огледа. Међутим, утврђена је статистички значајна разлика у динамици промене броја *S. aureus* у појединачним временским интервалима од по 24 сата, тако да се промена броја SEA позитивног и TSST-1 позитивног *S. aureus* одвијају нешто брже у УНТ млеку него што је то случај код пастеризованог млека.

- Стафилококни ентеротоксин А био је присутан у обе врсте млека (пастеризовано и УНТ) након 24 сата чувања при температури од 22°C, при чему је број *S. aureus* прелазео вредност од 10⁵ CFU/mL. Синтеза ентеротоксина А у пастеризованом млеку чуваном при 15°C уочена је у периоду између 48 и 72 сата, при чему је број *S. aureus* прешао вредност од 10⁵ CFU/mL након 48 сати, док је у УНТ млеку синтеза ентеротоксина А уочена након 48 сати, а број *S. aureus* прешао је вредност 10⁵ CFU/mL након 24 сата чувања.
- Интензитет експресије *sea* гена у обе врсте млека при истим температурама инкубације одговара количини физички „*de novo*“ синтетисаног стафилококног ентеротоксина А, што указује да при неадекватним условима чувања млека не долази до посттранслационе модификације нарастајућег полипептидног ланца.
- Статистички значајна разлика у степену експресије *tst* гена у односу на калибратор (*S. aureus* у млеку чуваном при 8°C) у пастеризованом и УНТ млеку након 24 сата инкубације при 22°C, односно 48 сати инкубације при 15°C указује да је у млеку чуваном у неадекватним условима, могућа синтеза TSST-1 токсина.
- Обзиром на мали број литературних података о утицају парагенетских фактора на регулацију вирулетности *S. aureus*, добијени резултати могу представљати полазну основу за квантитативну процену ризика за безбедност потрошача у условима нарушавања хладног ланца у производњи млека.

VIII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

Експлицитно навести позитивну или негативну оцену начина приказа и тумачења резултата истраживања.

Резултати испитивања приказани су јасно, како кроз текстуални део тако и помоћу табела, графикона и слика. Коришћене методе су одговарајуће. Резултати су логично тумачени. Због наведених чињеница, приказ и тумачење резултата оцењују се позитивно.

IX КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Експлицитно навести да ли дисертација јесте или није написана у складу са наведеним образложењем, као и да ли она садржи или не садржи све битне елементе. Дати јасне, прецизне и концизне одговоре на 3. и 4. питање:

1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме

Комисија констатује да је докторска дисертација Милијане Бабић написана потпуно у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

2. Да ли дисертација садржи све битне елементе

Докторска дисертација је потупна и садржи све битне елементе: опис циљева и задатака истраживања, полазне хипотезе и методологију, преглед досадашњих истраживања везаних за област и тему дисертације, оригинално експериментално испитивање експресије гена за SEA и TSST-1 токсин, јасну и објективну анализу резултата и систематичан приказ најважнијих закључака.

3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци

Оригиналан допринос науци огледа се у добијању увида у молекуларне механизме повећања вирулентног потенцијала *Staphylococcus aureus* у условима нарушавања хладног ланца транспорта, чувања и дистрибуције млека. Вредан оригинални допринос дају и резултати испитивања понашања TSST-1 позитивних изолата *Staphylococcus aureus* који примарно узрокују лезије на кожи људи, јер досадашња истраживања о контаминацији млека нису укључивала ову групу коагулаза позитивних стафилокока као потенцијалне узрочнике стафилококних токсинфекција. У дисертацији је развијена стратегија „in situ“ моделирања за анализу кинетике раста и експресије гена вирулентности *Staphylococcus aureus* помоћу којих су постигнути одлични резултати. Дисертација има и практичан значај зато што се на основу напред наведене стратегије моделирања могу одредити гранична времена употребљивости и безбедности млека у нарушеним условима чувања.

На основу детаљног прегледа и анализе докторске дисертације, а узимајући у обзир и верификацију резултата кроз њихово објављивање у референтном међународном часопису, Комисија констатује да достављена докторска дисертација представља оригинални научни рад.

4. Недостаци дисертације и њихов утицај на резултат истраживања

Након прегледа дисертације, Комисија констатује је иста урађена у планираном оквиру, те да не постоје недостаци који би негативно утицали на резултате истраживања.

X ПРЕДЛОГ:

На основу укупне оцене докторске дисертације, кандидаткиње Милијане Бабић, под насловом „Испитивање експресије гена за синтезу стафилококног ентеротоксина А и токсина TSST-1 код *Staphylococcus aureus* у млеку“, Комисија предлаже Наставно-научном већу Пољопривредном факултету Универзитета у Новом Саду да се докторска дисертација прихвати и да се кандидаткињи одобри одбрана.

НАВЕСТИ ИМЕ И ЗВАЊЕ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ
ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

Др Марија Пајић,
доцент,

Др Бранко Велебит,
виши научни сарадник,

Др Станко Бобош,
редовни професор,

Др Миодраг Радиновић,
доцент,

Др Анка Поповић Врањеш
редовни професор.

НАПОМЕНА: Члан комисије који не жели да потпише извештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извештај образложење односно разлоге због којих не жели да потпише извештај.