

3
4
5 **ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

6
7 **I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ:**

8
9 **1. Датум и назив органа који је именовео комисију:**

10 Комисија је именована на 156 седници Наставно–научног већа Факултета ветеринарске
11 медицине Универзитета у Београду, одржаној 20.05.2015.године.

12 **2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива**
13 **уже научне области за коју је изабран у звање, годином избора у звање и назив**
14 **факултета, установе у којој је члан комисије запослен:**

15 1. **др Душан Мишић**, ван. проф., Микробиологија са имунологијом, 2014, Факултет
16 ветеринарске медицине Универзитета у Београду

17 2. **др Јаков Нишавић**, ван.проф., Микробиологија са имунологијом, 2014, Факултет
18 ветеринарске медицине Универзитета у Београду

19 3. **др Ивана Ћирковић**, доцент, Микробиологија и имунологија, 2010,
20 Медицински факултет Универзитета у Београду

21 **II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:**

22 1. **Име, име једног родитеља, презиме:** Јелена, Петар, Ашанин

23 2. **Датум рођења, општина, Република:** 27.09. 1975.год., Београд, Савски Венац,
24 Република Србија

25 **III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

26 „Упоредна примена класичних метода и ланчане реакције полимеразе (PCR) у
27 детекцији сојева стафилокока резистентних на метицилин“.

28
29 **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (навести броја страна поглавља, слика,**
30 **шема, графикона и сл.):**

31 Докторска дисертација кандидата Јелене Ашанин написана је на 97 страница
32 компјутерски куцаног текста јасним и разумљивим стилем. Дисертација садржи 8
33 уобичајених поглавља: Увод (4 стране), Преглед литературе (45 страна), Циљ и задаци
34 (1 страна), Материјал и методе (8 страна), Резултати испитивања (18 страна), Дискусија
35 (7 страна), Закључци (1 страна) и Списак литературе(13 страна). Последње 4 стране
36 садрже биографију кандидата и изјаве. Дисертација је документована са 5 табела, 11
37 слика и 6 графикона. Дисертација на почетку садржи кратак садржај на српском и
38 енглеском језику.

39 **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (дати кратак**
40 **опис сваког поглавља дисертације: увода, прегледа литературе, циља и задатака**
41 **истраживања, материјал и метода, резултата, дискусије, списка референци):**

42 У поглављу **Увод** кандидат је изнела податке на основу којих се може видети да род
43 *Staphylococcus* са својим најпознатијим представником, врстом *Staphylococcus aureus*
44 познатом више од 130 година, припада бактеријама које су дуго и детаљно проучаване,
45 али још увек представљају велики изазов у савременој микробиологији. Већина
46 *Staphylococcus* врста су коменсали који су саставни део микробиома коже код људи и
47 животиња и не доводе до болести. Данас се зна да већина стафилокока има
48 способност да се преноси са једне врсте животиње на другу, са животиња на човека и
49 обрнуто, тако да су званично сврстане у зооноске агенсе. Практично не постоји класа
50 антибиотика на коју ове бактерије нису стекле резистенцију, а најзначајнији тип
51 резистенције на антибиотике коју врсте из овог рода могу имати је резистенција на
52 метицилин. Стафилококе које припадају категорији МРС (метицилин резистентне
53 стафилококе) резистентне су на β -лактамске антибиотике. Појава резистенције
54 *Staphylococcus* врста на ванкомицин, који је представник гликопептидних антибиотика,
55 највећа је опасност, јер су гликопептидни антибиотици последња линија одбране од
56 инфекција сојевима МРСА.

57 Коагулаза-негативне стафилококе (CoNS) су дуго времена биле запостављане, јер се
58 деценијама сматрало да немају патогени потенцијал и да представљају контаминанте у

1 клиничким материјалима, па чак и онда када су биле изоловане из примарно стерилних
2 регија тела у чистој култури. Данас је велика пажња усмерена на њих из више разлога:
3 1) велики број сојева CoNS је мултирезистентан на антибиотике (чак 80% изолованих
4 сојева CoNS из болничких средина припада категорији MPC), 2) CoNS изазивају велики
5 број инфекција код болесника у болницама и 3) CoNS представљају резервоар гена
6 резистенције за различите сојеве метицилин-осетљивих стафилокока, укључујући и
7 метицилин-осетљиве сојеве *Staphylococcus aureus* (MSSA). Осим *mecA* гена, откривено
8 је и присуство *mecC* гена за који се сматра да потиче од говеда, што још више
9 компликује детекцију резистенције на метицилин. Промене препорука које дају Институт
10 за клиничке и лабораторијске стандарде (*Clinical and Laboratory Standards Institute*,
11 CLSI) и Европски комитет за испитивање осетљивости на антимикробне лекове
12 (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST), захтева много
13 детаљнији приступ испитивању стафилокока, што прелази оквире рутинске
14 микробиолошке дијагностике.

15 У поглављу **Преглед литературе** кандидат је ради прегледности поделила ово
16 поглавље на следеће области: историјат и таксономија стафилокока, морфолошке,
17 културелне и физиолошке особине стафилокока, фактори вируленције, екологија и
18 епидемиологија, стафилококе код људи, стафилококе код животиња, стафилококе у
19 намирницама животињског порекла, резистенција *Staphylococcus* врста на антибиотике,
20 резистенција стафилокока на β -лактаме, резистенција стафилокока на пеницилин,
21 резистенција стафилокока на метицилин, резистенција на метицилин код стафилокока
22 изолованих од људи, резистенција на метицилин код стафилокока изолованих од
23 животиња, резистенција на метицилин код стафилокока изолованих из намирница
24 животињског порекла, резистенција стафилокока на макролиде, линкозамиде и
25 стрептограмине, резистенција стафилокока на аминогликозиде, резистенција
26 стафилокока на хинолоне, резистенција стафилокока на тетрациклине, резистенција
27 стафилокока на фениколе, резистенција стафилокока на сулфонамиде и триметоприм,
28 резистенција стафилокока на гликопептиде и методе за испитивање осетљивости
29 *Staphylococcus* врста на антибиотике.

30 У поглављу **Циљ и задаци** кандидат је на основу података из литературе и сопствених
31 прелиминарних испитивања за циљ истраживања поставила да изолује, идентификује
32 сојеве стафилокока различитог порекла и испита њихову осетљивост на антибиотике са
33 посебним акцентом на метицилин, упоредном применом класичних метода,
34 комерцијалних тестова и применом ланчане реакције полимеразе (PCR).

35 Ради остварења постављеног циља дефинисани су следећи задаци:

- 36 1. Изолација коагулаза-позитивних и коагулаза-негативних врста стафилокока из
37 клиничких узорака пореклом од болесних људи и животиња, намирница анималног
38 порекла (млека и сирева), узорака хране за животиње и болничког окружења
- 39 2. Идентификација изолованих врста стафилокока применом конвенционалних метода
40 микробиолошке дијагностике као и комерцијалних идентификационих система.
- 41 3. Испитивање осетљивости, односно резистенције на одабрани број антибиотика,
42 укључујући оксацилин и цефокситин, код изолованих врста стафилокока применом диск
43 дифузионе методе.
- 44 4. Испитивање осетљивости, односно резистенције на оксацилин и цефокситин код
45 изолованих врста стафилокока применом микродилуционе методе у бујону.
- 46 5. Детекција сојева MRS применом хромогених подлога.
- 47 6. Утврђивање присуства PBP2a протеина кодираног *mecA* геном код изолованих сојева
48 стафилокока применом латекс аглутинационог теста.
- 49 7. Утврђивање присуства *mecA* гена код изолованих сојева стафилокока применом PCR
50 методе.
- 51 8. Анализа добијених резултата.

52 У поглављу **Материјал и методе** кандидат је полазећи од природе планираних
53 испитивања као материјал користила изоловане сојеве стафилокока пореклом од
54 хоспитализованих људи, као и сојеве стафилокока изоловане из болничког окружења
55 (површине) у Клиничком центру Србије, затим сојеве изоловане из брисева узетих од
56 болесних животиња који су допремани на Катедру за микробиологију Факултета
57 ветеринарске медицине Универзитета у Београду, сојеве изоловане из узорака млека
58 крава са клинички манифестним маститисом, који су добијени из Лабораторије за
59 бактериологију Научног института за ветеринарство Србије, узорке хране за животиње

1 који су допремани у Лабораторију за микробиолошко испитивање хране за животиње
2 Научног института за ветеринарство Србије из којих је даље вршена изолација
3 стафилокока, као и сојеве стафилокока изоловане из узорак намирница анималног
4 порекла, који су добијени из Лабораторије за испитивање намирница анималног
5 порекла Научног института за ветеринарство Србије. Након прелиминарних
6 испитивања, из сваке наведене групе изабрани су само они сојеви који су били сумњиви
7 да припадају категорији MPC, укупно 49 сојева. Од сојева стафилокока изолованих од
8 људи одабрано је укупно 14 сојева, од којих је 5 потицало из брисева носа, 8 из брисева
9 коже аксиларне регије и један из бриса коже око нокта. Од сојева стафилокока
10 изолованих од животиња одабрано је њих 16, од којих је 10 потицало од паса (5 из
11 брисева ушију, 3 из брисева рана, 1 из узорка урина и 1 из бриса носа), 4 од мачака (по
12 један изолат из носа, са коже, ока и ране) и по један сој изолован из млека краве са
13 маститисом и из бриса грла кокошке. Из болничког окружења су одабрана 4 изолована
14 соја. Из намирница животињског порекла је одабрано 8 изолованих сојева из сирева, од
15 чега је 7 потицало из узорак белог сира у кришкама и један из узорка фета сира. Од
16 узорак хране за животиње одабрано је 7 изолованих сојева, 3 соја пореклом из
17 узорак замене млека за храну за животиње (све од различитих произвођача) и по
18 један сој из узорак сојине сачме, сунцокретове сачме, сировог пиварског требера и
19 хране за бројлере. Изолација је вршена из клиничких материјала пореклом од
20 животиња засејавањем узорак на Columbia agar са додатком 5% овчије крви,
21 (bioMérieux, Francuska).

22 Након извођења прелиминарних тестова, вршена је идентификација изолованих сојева,
23 применом комерцијалних, идентификационих система ID32 STAPH (bioMérieux,
24 Francuska) и BBL Crystal Gram-Positive ID Kit (Becton Dickinson, SAD) према упутствима
25 произвођача. За одређени број изолованих сојева стафилокока (један сој пореклом од
26 људи и сви изоловани сојеви из сирева и хране за животиње) извршена је
27 идентификација применом апарата Vitek MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francuska).

28 Осетљивост изолованих стафилокока пореклом од људи, животиња и из окружења
29 испитивана је на следеће антибиотике: оксацилин (OX-1 μ g), пеницилин (P-10U),
30 цефокситин (FOX-30 μ g), гентамицин (GM-10 μ g), еритромицин (E-15 μ g), клиндамицин
31 (CC-2 μ g), тетрациклин (TE-30 μ g) и ванкомицин (VA-30 μ g) применом диск дифузионе
32 методе.

33 Осетљивост изолованих стафилокока пореклом из намирница и хране за животиње је
34 испитивана на следеће антибиотике: оксацилин, пеницилин, цефокситин, гентамицин,
35 еритромицин, хлорамфеникол (C-30 μ g), тетрациклин, ципрофлоксацин (CIP-5 μ g),
36 сулфаметоксазол/ триметоприм (SXT-23.75/1.25 μ g) и ванкомицин применом диск
37 дифузионе методе. Осетљивост свих изолованих стафилокока је испитивана на
38 оксацилин и цефокситин применом микродилуционе методе у бујону према
39 препорукама NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 2003 -
40 сада CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*), а тумачење резултата је вршено
41 према препорукама CLSI из 2008. и 2014. године. Коришћени су антибиограм дискови
42 произвођача Becton Dickinson (SAD), а чисте супстанције оксацилина и цефокситина,
43 коришћене за микродилуциону методу у бујону, произвођача Sigma Aldrich, SAD. За
44 детекцију резистенције стафилокока на метицилин у испитивањима се примењују
45 оксацилин и цефокситин. Цефокситин у препорукама CLSI и EUCAST има предност у
46 односу на оксацилин, јер се сматра да је овај антибиотик бољи и прецизнији предиктор
47 резистенције на метицилин.

48 Осетљивост на антибиотике код изолованих сојева стафилокока методом диск
49 дифузије испитивана је на Mueller Hinton agarу (bioMérieux, Француска). Након директне
50 суспензије колонија у стерилном физиолошком раствору (0.5 McFarland стандард) и
51 наносења на плоче, ређани су дискови антибиотика. Плоче су затим инкубирани током
52 18-24 часова на температури од 37⁰C, а резултати су читавани мерењем пречника
53 зона инхибиције, на основу којих су утврђиване интерпретативне категорије (С, И, Р). За
54 контролу квалитета извођења ове методе, као и квалитета антибиограм дискова
55 коришћен је референти сој *S. aureus* ATCC 25923. Осетљивост на антибиотике
56 изолованих сојева стафилокока методом микродилуционе методе у бујону је
57 испитивана у Mueller Hinton II бујону (Becton Dickinson, SAD). Раствори антибиотика у
58 чистим супстанцама су припремани према препорукама CLSI. За испитивање
59 осетљивости изолованих сојева стафилокока на оксацилин, у подлогу је додаван
60 натријум-хлорид у концентрацији од 2%. Метода је извођена у микротитрационим

1 плочама са „У“ дном. Распон концентрација антибиотика се кретао за цефокситин од
2 0.12 до 256 µг/мл а за оксацилин 0.06 до 128 µг/мл. Испитивани сојеви су инокулисани у
3 базенчиће у финалној концентрацији од 5x10⁵CFU/мл. Инкубација је вршена на
4 температури од 37⁰С, током 16-18 h, осим за оксацилин, када је време трајања
5 инкубације износило 24 h. За контролу квалитета извођења ове методе, као и квалитета
6 употребљених антибиотика је коришћен референтни сој *S. aureus* ATCC 29213.
7 У испитивању је коришћена и хромогена подлога за брзу детекцију сојева МРСА
8 (chromID™MRSA, bioMérieux, Француска). Брисеви узети од пацијената из Клиничког
9 центра Србије су директно засејавани на ову подлогу.
10 За испитивање присуства пеницилин-везујућег протеина 2a (PBP2a или PBP2'),
11 коришћен је Slidex®MRSA Detection test (bioMérieux, Француска) који представља
12 продукт *tecA* гена и има низак афинитет за β-лактамске антибиотике. Примена овог
13 теста се изједначава са применом PCR методе. Наглашено је да је његова употреба
14 препоручена само за *Staphylococcus aureus*.
15 Као „златни стандард“ за проверу свих добијених резултата је коришћена метода PCR
16 (*Polymerase Chain Reaction*) у сврху детекције *tecA* гена. За методу PCR је било
17 потребно прво извршити екстракцију бактеријске геномске ДНК, а екстракција је
18 извођена на два начина: уз помоћ кита за екстракцију геномске ДНК бактерија
19 (Metabion, Немачка) и према протоколу референтне лабораторије Европске Уније за
20 антимикуробну резистенцију (EU Reference Laboratory-Antimicrobial resistance; Faculty of
21 Veterinary Medicine, Лисабон, Португал). Метода PCR је извођена према протоколу
22 Н. Isenberg-а и сарадника, 2004. година. Прајмери (Invitrogen, SAD) који су коришћени за
23 амплификацију региона *tecA* гена величине 533 bp су имали следеће секвенце:
24 прајмер 1 (5'-AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3') и прајмер 2 (5'-AGT TCT GCA GTA
25 CCG GAT TTG C-3'), сваки у финалној концентрацији од 0,25 µM (Isenberg, 2004).
26 Услови PCR реакције су били: иницијална денатурација на температури од 94⁰С током
27 5 минута, а затим 40 циклуса денатурације на температури од 94⁰С током 30 секунди,
28 затим везивање прајмера на температури од 55⁰С током 30 секунди и елонгација на
29 72⁰С током 1 минута, за којом следи финална елонгација на 72⁰С током 5 минута у
30 машини за PCR (Autorisierter Thermocycler; Eppendorf, Немачка). Након амплификације
31 PCR продукта, извођена је електрофореза на 1,5% агарозном гелу са етидијум
32 бромидом (1% водени раствор, Serva) концентрације 10 мг/мл у 1xTBE (10xTBE; 0,89 M
33 Tris; 0,89 M Boric acid; 0,02 M EDTA; Serva). Визуализација PCR продукта је извођена
34 на УВ трансилуминатору (Vilber Lourmat, Немачка). За читавање величине
35 фрагмената у овом испитивању је коришћен М-ФХ174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 9
36 (Fermentas). За контролу квалитета извођења реакција су коришћени референтни
37 сојеви: као позитивна контрола метицилин-резистентан *Staphylococcus aureus* ATCC
38 43300, а као негативна контрола *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, док је приликом
39 сваке припреме узорака за PCR, коришћена и контрола смеше за PCR.
40 У поглављу **Резултати** кандидат је добијене резултате приказала у 16 целина које су
41 документоване табеларно, графички и путем слика. Укупно је испитивањем обухваћено
42 49 изолата стафилокока. Свих 14 изолованих сојева стафилокока пореклом од људи је
43 било коагулаза-негативно, укључујући и једини изолат *S. aureus*. Од 16 сојева
44 стафилокока изолованих од од животиња, 13 сојева је било CoNS, док су 3 изолована
45 соја била коагулаза-позитивна (CoPS). Од 4 изолована соја пореклом из болничког
46 окружења, сва 4 су била CoNS. Од 8 сојева стафилокока пореклом из сирева, сви су
47 били CoNS. Од 7 сојева пореклом из узорака хране за животиње, сви су били CoNS.
48 Изоловане стафилококе су идентификоване до врсте применом комерцијалних тестова
49 ID32 STAPH и/или i BBL Crystal GP и/или применом Vitek MS .
50 **Идентификација *Staphylococcus* врста изолованих од људи**
51 Највећи број изолованих сојева код људи је припадао врсти *S. haemolyticus*, (57%),
52 затим врсти *S. epidermidis* (36%), а најмање врсти *S. aureus* (7%).
53 **Идентификација *Staphylococcus* врста изолованих од животиња**
54 Од укупно 16 изолованих сојева, 10 је идентификовано као *S. haemolyticus*. Два соја су
55 идентификована као *S. intermedius* (*S. pseudintermedius*), по један сој као *S. epidermidis* и
56 *S. aureus*, док су преостала 2 соја идентификована као *S. vitulinus* и *S. capitis*.
57 **Идентификација *Staphylococcus* врста изолованих из болничког окружења**
58 Од 4 соја изолована из болничког окружења, 3 су идентификована као *S. haemolyticus*,
59 док је један сој идентификован као *S. cohnii* ssp. *cohnii*.
60 **Идентификација *Staphylococcus* врста изолованих из сирева**

1 Свих 8 изолата је идентификовано као *S. lentus*.
2 **Идентификација *Staphylococcus* врста изолованих из узорака хране за животиње**
3 Од 7 сојева изолованих из узорака хране за животиње, 4 соја су идентификована као *S.*
4 *lentus*, 2 као *S. sciuri* и један као *S. simulans*.
5 **Резултати испитивања осетљивости на антибиотике *Staphylococcus* врста**
6 **изолованих од људи применом диск дифузионе методе**
7 Код свих 14 испитиваних сојева стафилокока, утврђена је резистенција на пеницилин
8 (100%), оксацилин (100%) и цефокситин (100%). Резистенција на еритромицин је
9 утврђена код 9 сојева (64,3%), док су 2 соја (14,3%) била интермедијарно осетљива на
10 еритромицин. На клиндамицин је утврђена резистенција код 4 соја (28,6%), док је један
11 сој био интермедијарно осетљив (7,1%). Резистенција на гентамицин је утврђена код 8
12 сојева (57,1), а на тетрациклин код (21,4%) сојева.
13 **Резултати испитивања осетљивости на антибиотике *Staphylococcus* врста**
14 **изолованих од животиња применом диск дифузионе методе**
15 Сви испитивани сојеви су били резистентни на пеницилин (100%). Резистенција на
16 оксацилин и цефокситин је утврђена код 15 сојева (93,75%), на еритромицин код 10
17 сојева (62,5%), на клиндамицин код 2 соја (12,5%), док је један сој био интермедијарно
18 осетљив на клиндамицин. На гентамицин је утврђена резистенција код 12 сојева (75%),
19 док је један сој био интермедијарно осетљив. Код 9 сојева је утврђена резистенција на
20 тетрациклин (56,25%).
21 **Резултати испитивања осетљивости на антибиотике *Staphylococcus* врста**
22 **изолованих из болничког окружења применом диск дифузионе методе**
23 Код сва 4 соја је утврђена резистенција на пеницилин (100%), оксацилин (100%) и
24 цефокситин (100%). Код 2 соја је утврђена резистенција на еритромицин (50%), док је
25 један сој био интермедијарно осетљив на еритромицин (25%). На гентамицин су била
26 резистентна 3 соја (75%), а на тетрациклин један сој (25%).
27 **Резултати испитивања осетљивости на антибиотике *Staphylococcus* врста**
28 **изолованих из сирева применом диск дифузионе методе**
29 Свих 8 сојева *S. lentus* су били резистентни на пеницилин (100%), оксацилин (100%),
30 цефокситин (100%) и еритромицин (100%).
31 **Резултати испитивања осетљивости на антибиотике *Staphylococcus* врста**
32 **изолованих из узорака хране за животиње применом диск дифузионе методе**
33 Од 7 изолованих сојева пореклом из хране за животиње, 4 соја су била резистентна на
34 пеницилин (57,1%), цефокситин (57,1%) и еритромицин (57,1%), док је на оксацилин
35 било резистентно 6 сојева (85,7%).
36 **Резултати испитивања осетљивости на оксацилин и цефокситин *Staphylococcus***
37 **врста пореклом од људи применом микродилуционе методе у бујону**
38 Код 8 изолованих сојева *S. haemolyticus*, вредности минималне инхибиторне
39 концентрације (МИК) оксацилина су се кретале од 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ до преко 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Код 5
40 сојева *S. epidermidis*, вредности МИК оксацилина су се кретале од 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ до преко 128
41 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Вредност МИК оксацилина код јединог изолата *S. aureus* је износила 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Код
42 8 изолата *S. haemolyticus*, вредности МИК цефокситина су се кретале од 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ до
43 преко 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Код 5 изолата *S. epidermidis*, вредности МИК цефокситина су се
44 кретале од 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ до 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Вредност МИК цефокситина код изолата *S. aureus* је
45 износила 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
46 **Резултати испитивања осетљивости на оксацилин и цефокситин *Staphylococcus***
47 **врста пореклом од животиња применом микродилуционе методе у бујону**
48 Код 10 изолованих сојева *S. haemolyticus*, вредности МИК оксацилина су се кретале од
49 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ до 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Код 2 изолата *S. pseudintermedius* вредност МИК оксацилина је
50 била иста за оба изолата и износила је преко 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Вредност МИК оксацилина код
51 изолата *S. epidermidis* је износила 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Код изолата *S. aureus* вредност МИК
52 оксацилина је износила 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Вредност МИК оксацилина код изолата *S. capitis* је
53 износила 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Код изолата *S. vitulinus* вредност МИК оксацилина је износила 0,5
54 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Код 10 изолованих сојева *S. haemolyticus*, вредности МИК цефокситина су се
55 кретале од 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ до преко од 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Код 2 изолата *S. pseudintermedius* вредности
56 МИК цефокситина су износиле 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ и 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Вредност МИК цефокситина код
57 изолата *S. epidermidis* је износила 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Код изолата *S. aureus* вредност МИК
58 цефокситина је износила 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Вредност МИК цефокситина код изолата *S. capitis* је
59 износила 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, а код изолата *S. vitulinus* вредност МИК цефокситина је износила 1
60 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

1 **Резултати испитивања осетљивости на оксацилин и цефокситин *Staphylococcus***
2 **врста изолованих из болничког окружења применом микродилуционе методе у**
3 **бујону**

4 Вредности МИК оксацилина за сва 3 изолата *S. haemolyticus* биле су веће од 128 µг/мл.
5 За изолат *S. cohnii ssp. cohnii* вредност МИК оксацилина је била већа од 128 µг/мл.
6 вредност МИК цефокситина код 3 изолата *S. haemolyticus*, су биле ≥ 256 µг/мл. Код *S.*
7 *cohnii ssp. cohnii* вредност МИК цефокситина износила је 64 µг/мл.

8 **Резултати испитивања осетљивости на оксацилин и цефокситин *Staphylococcus***
9 **врста изолованих из сирева применом микродилуционе методе у бујону**

10 Код 8 изолата *S. lentus* вредности МИК оксацилина кретале су се од 32 µг/мл до 128
11 µг/мл. Код изолата *S. lentus* вредности МИК цефокситина су се кретале од 16 µг/мл до
12 32 µг/мл.

13 **Резултати испитивања осетљивости на оксацилин и цефокситин *Staphylococcus***
14 **врста изолованих из хране за животиње применом микродилуционе методе у**
15 **бујону**

16 Вредности МИК оксацилина код 4 изолата *S. lentus* кретале су се од 4 µг/мл до 64
17 µг/мл. Код 2 изолата *S. sciuri* вредности МИК оксацилина су износиле 0,5 µг/мл и 1
18 µг/мл. Код изолата *S. simulans* вредност МИК оксацилина је износила 0,5 µг/мл. За сва
19 4 изолата *S. lentus* вредност МИК цефокситина је износила 16 µг/мл. Код оба изолата
20 *S. sciuri* вредност МИК цефокситина је износила 2 µг/мл. Код изолата *S. simulans*
21 вредност МИК цефокситина је износила 4 µг/мл.

22 **Резултати испитивања присуства RBP2a применом латекс аглутинационог теста и**
23 **присуства *tecA* гена применом методе PCR**

24 Свих 8 изолата *S. haemolyticus*, пореклом од људи је применом латекс аглутинационог
25 теста било позитивно на присуство RBP2a, и код 6 изолата *S. haemolyticus* је утврђено
26 присуство *tecA* гена применом методе PCR. Код свих 5 изолата *S. epidermidis* пореклом
27 од људи применом латекс аглутинационог теста добијена је позитивна реакција
28 аглутинације на присуство RBP2a и код свих је детектовано присуство *tecA* гена. Код
29 јединог изолата *S. aureus* пореклом од људи, применом латекс аглутинационог теста
30 добијена је позитивна реакција на присуство RBP2a и утврђено је присуство *tecA* гена.
31 Код свих 10 изолата *S. haemolyticus*, пореклом од животиња применом латекс
32 аглутинационог теста добијене су позитивне реакције на присуство RBP2a и код свих 10
33 изолата детектовано је присуство *tecA* гена. Код оба изолата *S. pseudintermedius*
34 реакција аглутинације је била позитивна на присуство RBP2a, и оба изолата су била
35 позитивна на присуство *tecA* гена. Код јединог изолата *S. epidermidis* пореклом од
36 животиња, реакција аглутинације је била позитивна на присуство RBP2a, а утврђено је
37 и присуство *tecA* гена. Изолат *S. aureus* је био позитиван на присуство RBP2a,
38 применом латекс аглутинационог теста и позитиван на присуство *tecA* гена. Применом
39 латекс аглутинационог теста код изолата *S. capitis* је добијена позитивна реакција на
40 присуство RBP2a и применом методе PCR је утврђено присуство *tecA* гена. Код
41 изолата *S. vitulinus* реакција аглутинације на присуство RBP2a је била негативна, а није
42 утврђено ни присуство *tecA* гена. Од изолата пореклом из болничког окружења, сва 3
43 изолата *S. haemolyticus* су била позитивна на присуство RBP2a, док је присуство *tecA*
44 гена утврђено само код једног изолата. Код изолата *S. cohnii ssp. cohnii* реакција
45 аглутинације је била негативна на присуство RBP2a, док је применом методе PCR
46 утврђено присуство *tecA* гена. Свих 8 изолата *S. lentus* пореклом из сирева је дало
47 позитивну реакцију аглутинације и сви су били позитивни на присуство *tecA* гена. Код
48 сва 4 изолата *S. lentus* пореклом из хране за животиње, реакција аглутинације на
49 присуство RBP2a је била позитивна и сви изолати су били позитивни на присуство *tecA*
50 гена. Реакција аглутинације на присуство RBP2a је код оба изолата *S. sciuri* пореклом
51 из хране за животиње била позитивна и детектовано је присуство *tecA* гена код оба
52 изолата. Код јединог изолата *S. simulans* пореклом из хране за животиње реакција
53 аглутинације на присуство RBP2a била је негативна а није утврђено ни присуство *tecA*
54 гена.

55 У поглављу **Дискусија** кандидат је дала критички осврт на добијене резултате
56 поредећи их са резултатима испитивања аутора чије је референце користила током
57 израде докторске дисертације.

58 У поглављу **Списак литературе** кандидат је навела 117 референци.

59 **VI ЗАКЉУЧЦИ ИСТРАЖИВАЊА (навести закључке који су приказани у докторској**
60 **дисертацији):**

1 На основу спроведених истраживања и добијених резултата изведени су следећи
2 закључци:

3 1. Утврђено је доминантно присуство врсте *Staphylococcus haemolyticus* код изолованих
4 сојева пореклом од људи, болесних животиња и из болничког окружења.

5 2. Доминантно присуство коагулаза-негативних стафилокока, а посебно врсте
6 *Staphylococcus lentus* утврђено је код сојева изолованих из сирева и из хране за
7 животиње.

8 3. Применом методе PCR утврђено је присуство *mecA* гена код укупно 43 соја (87,75%)
9 и они су категоризовани као метицилин резистентне стафилококе.

10 4. Сви сојеви стафилокока изоловани из сирева код којих је била детектована
11 резистенција на оксацилин и цефокситин, припадали су категорији метицилин
12 резистентних стафилокока.

13 5. Код 95,35% сојева који су били позитивни на присуство *mecA* гена, претходно је била
14 утврђена резистенција на оксацилин и цефокситин, како у диск дифузионој методи, тако
15 и у микродилуционој методи у бујону.

16 6. Код 4 соја *Staphylococcus haemolyticus* (8,2% од укупног броја сојева) пореклом од
17 људи и из болничког окружења, детектована је резистенција на оксацилин и
18 цефокситин, као и присуство RBP2a, али су ови сојеви били негативни на присуство
19 *mecA* гена.

20 7. Код 2 соја коагулаза-негативних стафилокока пореклом од животиња и из хране за
21 животиње, код којих је детектована резистенција на оксацилин и осетљивост на
22 цефокситин, није детектован *mecA* ген.

23 8. Код свих изолата који су припадали врстама *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus*
24 *pseudintermedius*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lentus* и *Staphylococcus*
25 *capitis* сви добијени резултати свим коришћеним методама се подударају.

26 **VII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА**
27 **(навести да ли су добијени резултати у складу са постављеним циљем и**
28 **задацима истраживања, као и да ли закључци произилазе из добијених**
29 **резултата):**

30 Резултати истраживања до којих је кандидат дошла током израде докторске
31 дисертације у потпуности су са постављеним циљем и задацима истраживања.
32 Добијени резултати су приказани табеларно, графички и уз помоћ слика, а њихов опис
33 је дат логичним редоследом, прегледно, јасним и разумљивим стилем. Изведени
34 закључци су јасно формулисани и у складу су са постављеним циљем и добијеним
35 резултатима истраживања.

36 **VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

37 **1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави**
38 **теме?**

39 Докторска дисертација кандидата др мед. Јелене Ашанин под насловом

40 „Упоредна примена класичних метода и ланчане реакције полимеразе (PCR) у
41 детекцији сојева стафилокока резистентних на метицилин“ написана је у складу са
42 образложењем наведеним у пријави теме.

43 **2. Да ли дисертација садржи све елементе прописане за завршену докторску**
44 **дисертацију?**

45 Докторска дисертација кандидата др мед. Јелене Ашанин под насловом „Упоредна
46 примена класичних метода и ланчане реакције полимеразе (PCR) у детекцији сојева
47 стафилокока резистентних на метицилин“ садржи све битне елементе у складу са
48 захтевима за завршену докторску дисертацију.

49 **3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?**

50 Досадашња научна испитивања ове проблематике како у Републици Србији тако и у
51 свету, била су конципирана тако да је углавном коришћен мањи број метода примењен
52 на само једну категорију стафилокока, на пример, стафилококе пореклом од болничких
53 пацијената, стафилококе од животиња, и сл. За разлику од досадашњих испитивања, у
54 овом истраживању истовремено су примењене готово све расположиве методе за
55 детекцију сојева MPC које су акутелне како у рутинској микробиолошкој дијагностици
56 тако и у научним испитивањима. Ове методе су биле примењене на сојевима
57 стафилокока који су потицали из потпуно различитих еколошких ниша и који, у складу
58 са тим, имају различите микробиолошке карактеристике и епизоотиолошки и
59 епидемиолошки значај. Ово је једно од првих испитивања овако свеобухватног
60 карактера у Републици Србији које даје могућност прецизног увида у поузданост већине

1 расположивих метода и њихову применљивост код CoNS и CoPS пореклом од болесних
2 и здравих људи, животиња, хране за животиње, намирница анималног порекла и из
3 болничког окружења. Искуства стечена током израде ове дисертације реално се могу
4 имплементирати у рутинску микробиолошку праксу у виду нових приступа у детекцији
5 сојева MPC, нарочито тамо где су оваква испитивања проблематична због недостатка
6 довољно поузданих и брзих метода, а то је у детекцији сојева MP-CoNS.

7
8
9 **IX ПРЕДЛОГ:**

10 **На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже (одабрати једну од три**
11 **понуђених могућности):**

12 - да се докторска дисертација прихвати а кандидату Јелени Ашанин одобри
13 одбрана
14

15
16 ДАТУМ

17 11.06.2015.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

18
19 **1. др Душан Мишић, ван. проф.**

20 Факултет ветеринарске медицине Универзитета у
21 Београду

22
23 **2. др Јаков Нишавић, ван. проф.**

24 Факултет ветеринарске медицине Универзитета у
25 Београду

26
27 **3. др Ивана Ћирковић, доцент**

28 Медицински факултет Универзитета у Београду
29