

3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13 **ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**
14

15
16
17 **I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ:**
18

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

20 151. седница одржана 26.11.2014. године. Наставно-научно веће Факултета
21 ветеринарске медицине Универзитета у Београду
22

23 **2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива**
24 **уже научне области за коју је изабран у звање, годином избора у звање и назив**
25 **факултета, установе у којој је члан комисије запослен:**
26

- 27 1. Др Вера Катић, редовни професор. У звање редовног професора за ужу научну
28 област Хигијена и технологија млека изабрана је 1996. године. Запослена је на
29 Факултету ветеринарске медицине у Београду.
- 30 2. Др Зора Мијачевић, редовни професор. У звање редовног професора за ужу научну
31 област Хигијена и технологија млека изабрана је 1994. године. Запослена је на
32 Факултету ветеринарске медицине у Београду.
- 33 3. Др Бранко Велебит, научни сарадник, 2011. Запослен на Институту за хигијену и
34 технологију меса, Београд.

35
36 **II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:**
37

38 **1. Име, име једног родитеља, презиме:** Радослава (Радисав) Савић Радовановић
39

40 **2. Датум рођења, општина, Република:** 23.07.1968. година, Савски венац, Београд.
41

42 **3. Датум одбране, место и назив магистарске тезе*:** 03.11.2000. године, Београд:
43 "Идентификација механизма који утичу на деструкцију заједнице *Staphylococcus aureus*
44 у сиревима".
45

46 **4. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука*:**
47 Ветеринарске медицине.
48

49 **III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:** "Процена ризика од налаза ентеротоксина
50 стафилокока у меким сиревима"
51

52 **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (навести броја страна поглавља, слика,**
53 **шема, графикона и сл.):**
54

55 Докторска дисертација написана је на 143 стране компјутерски обрађеног текста.
56 Садржи уобичајена поглавља: Кратак садржај на српском (3 стране) и енглеском језику
57 (3 стране), Увод (3 стране), Преглед литературе (44 страна), Циљ и задаци рада (1
58 страна), Материјал и методе (23 стране), Резултати (23 страна), Дискусија (13 страна),
59 Закључци (2 стране), Прилози (12 страна). У писању дисертације коришћено је 204

1 библиографских јединица. Документована је са 30 табела, 12 слика и 2 графикона и 10
2 табела у прилогу.

3
4 **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (дати кратак**
5 **опис сваког поглавља дисертације: увода, прегледа литературе, циља и задатака**
6 **истраживања, материјал и метода, резултата, дискусије, списка референци):**

7 У **Уводу** докторанд наводи да се сиреви традиционално производе у Србији вековима,
8 представљају културно наслеђе и акумулирано искуствено знање, које се преноси са
9 генерације на генерацију. Према дефиницији FAO/WHO, сир представља свеж, или
10 сазрео производ од млека, који се добија после коагулације протеина и одвајања
11 сурутке из млека, павлаке, делимично обраног млека, млаћенице, или мешавине ових
12 полупроизвода. Сир спада у храну спремну за конзумирање, што значи да није
13 намењено да се пре конзумирања термички обрађује поступцима који су по
14 ефикасности еквивалентни пастеризацији. Сиреви, који се могу наћи на тржишту
15 градуваног млека, а пореклом су из индивидуалних домаћинствима од куваног или
16 процесу производње ових сирева коагулација се одвија додавањем сирила у млеко, без
17 додавања познатих стартер култура, што значи да у процесу зрење учествује само
18 пориродна микробиота млека, па се ови сиреви означавају као слаткокоагулишући
19 сиреви. Другу групу сирева представљају киселокоагулишући сиреви који су
20 произведени кишелњем млека. Сиреви се у промет могу ставити као: сиреви са
21 зрењем и сиреви без зрења. Сиреви са зрењем су сиреви, који морају имати процес
22 зрења са дефинисаним периодом у току којег се дешавају одговарајуће биохемијске и
23 физичке промене и на тај начин попримају своје специфичне сензорне карактеристике.
24 Сиреви без зрења су сиреви који су спремни за конзумирање непосредно после
25 производње. И слаткокоагулишући и киселокоагулишући сиреви према реолошким
26 карактеристикама припадају меким сиревима. Велики број сирева присутан на тржишту
27 градских пијаца може се сврстати у групу меких сирева без зрења. Будући да се
28 одређен број сирева без зрења производи од некуваног млека постоји могућност да са
29 сировим млеком у сир доспеју коагулаза позитивне стафилококе. Главни представник
30 коагулаза позитивних стафилокока, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, је
31 микроорганизам, који припада роду *Staphylococcus* и фамилији *Staphylococcaceae*. Као
32 убиквитарни микроорганизам налази се на кожи људи и животиња, а често колонизује
33 *ductus papillaris* млечне жлезде крава. Код 20-30% здравих људи *Staphylococcus aureus*
34 стално, а код 60% популације повремено колонизује кожу и слузокожу. Овај
35 микроорганизам може се наћи на слузокожи носа, грла и у инфицираним ранама на
36 кожи. Резервоар ове бактерије представљају инфицирана млечна жлезда музних
37 животиња и инфицирана ткива људи. Са аспекта безбедности хране значај овог
38 микроорганизма огледа се у томе што ствара термостабилне ентеротоксине који унети
39 у одређеној количини, путем хране, у организму човека доводе до интоксикације.

40 Током производње и складиштења меког сира коагулаза позитивне стафилококе могу
41 да се размножавају и стварају ентеротоксине, посебно ако у производњу сира није
42 укључена млечнокиселинска ферментација. Контаминација коагулаза позитивним
43 стафилококама меких сирева, направљених из термички обрађеног млека, може да
44 настане после топлотне обраде, а висока активност воде (0,94-0,96) и висока рН
45 вредност (6,0-6,2) у сиру омогућавају њихово размножавање. Пастеризација млека је
46 ефикасан поступак у елиминацији коагулаза позитивних стафилокока, па број ових
47 микроорганизма у меком сиру произведеном из пастеризованог млека, указује на
48 контаминацију после пастеризације. Уколико је број коагулаза позитивних стафилокока
49 висок у првих 48 часова производње сира постоји ризик од стварања ентеротоксина у
50 количини која изазива интоксикације људи. Број коагулаза позитивних стафилокока се
51 смањује за време зрења и складиштења меког сира, међутим, ентеротоксин остаје у
52 сиру за све време рока употребе. Процена ризика од налаза ентеротоксина
53 стафилокока у сиру могућа је само ако се број коагулаза позитивних стафилокока у сиру
54 одреди 48-72 часа од почетка производње сира. Довољна количина ентеротоксина, која
55 доводи до интоксикације, настаје при броју коагулаза позитивних стафилокока већем од
56 10^5 cfu/g хране. Услови током производње слаткокоагулишућих сирева слатком
57 коагулацијом погодују размножавању коагулаза позитивних стафилокока. Стога је за
58 процену ризика од налаза ентеротоксина стафилокока у меком сиру, произведеном у
59 домаћинству, важно да се одреде физичко хемијске карактеристике, број лактобацила и
60

1 лактокока, број коагулаза позитивних стафилокока у сиру и испита способност
2 стафилокока изолованих из сира да стварају ентеротоксине.

3 Поглавље **Преглед литературе** подељено је у два потпоглавља Процена ризика и
4 Фактори који утичу на раст *S. aureus* и стварање ентеротоксина. Прво потпоглавље
5 садржи 3 целине, а друго 13 целина. У првом поглављу у оквиру идентификације
6 хазарда приказана је таксономска позиција и карактеристике коагулаза позитивних
7 стафилокока. У оквиру процене изложености дати су подаци из литературе о налазу
8 коагулаза позитивних стафилокока у сиру. Приказани су подаци о епидемијама
9 интоксикација насталих после конзумирања сира контаминираних ентеротоксинима
10 стафилокока. У оквиру процене изложености дати су подаци из литературе о броју
11 коагулаза позитивних стафилокока у сиру и налазу ентеротоксина. У другом
12 подпоглављу приказани су подаци о утицају различитих физичко хемијских фактора на
13 налаз коагулаза позитивних стафилокока у сиру и условима за стварање
14 ентеротоксина.

15 **Циљ истраживања** ове докторске дисертације био је да се, на основу броја коагулаза
16 позитивних стафилокока у сиру, услова за њихово размножавање и стварање
17 ентеротоксина, као и присуства гена за синтезу ентеротоксина код коагулаза
18 позитивних стафилокока изолованих из сира, процени ризик од налаза ентеротоксина
19 стафилокока у меким сиревима.

20 За остваривање овог циља били су постављени задаци:

- 21 - Одредити број коагулаза позитивних стафилокока, *Lactococcus* spp. и *Lactobacillus* spp.
22 у сиревима произведеним од куваног и некуваног млека.
- 23 - Одредити физичко-хемијске параметре (pH, садржај NaCl, масти, суве материје и
24 активност воде) у сиревима произведеним од куваног и некуваног млека.
- 25 - Формирати пул коагулаза позитивних стафилокока изолованих из сирева и извршити
26 њихову идентификацију испитивањем макроморфолошких, микроморфолошких и
27 биохемијских особина.
- 28 - Испитати да ли коагулаза позитивне стафилококе, изоловане из сирева, стварају
29 ентеротоксине.
- 30 - Идентификовати ген или гене за синтезу ентеротоксина.
- 31 - Испитати на присуство ентеротоксина сиреве у којима је утврђен број
32 ентеротоксогених стафилокока изнад 10^5 cfu/g.

33 У поглављу **Материјал и методе** детаљно су описани материјал и методе коришћени
34 током израде докторске дисертације. За одређивање броја коагулаза позитивних
35 стафилокока испитано је 555 узорак меких сирева од куваног и некуваног млека,
36 произведених у индивидуалним домаћинствима из различитих географских локалитета
37 у Србији. За изоловање и одређивање броја коагулаза позитивних стафилокока
38 докторанд је користила методе описане у стандарду SRPS EN ISO 6888-1,
39 Микробиологија хране и хране за животиње-Хоризонтална метода за одрђивање
40 коагулаза позитивних стафилокока (*Staphylococcus aureus* и друге врсте) - Део 1:
41 Техника употребом агара по Baird-Parkeru, а за одређивање броја *Lactococcus* spp. и
42 *Lactobacillus* spp. користила је методу описану у стандарду ISO 27205:2010 (IDF
43 149:2010).

44 За идентификацију врста коагулаза позитивних стафилокока на основу биохемијских
45 особина користила је ID32 Staph (Biomerieux, Francuska) тест. За испитивање
46 способности изолата стафилокока да стварају ензим коагулазу користила је
47 лиофилизовану плазму кунџа. Испитивање способности изолата коагулаза позитивних
48 стафилокока да стварају ентеротоксине (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) доказаивано је
49 ELFA техником, VIDAS SET2 (BioMerieux, Francuska). Исту технику користила је и за
50 доказивање присуства ентеротоксина у узорцима сира из којих је изоловала коагулаза
51 позитивне стафилококе које стварају ентеротоксин. Испитивање присуства гена за
52 синтезу ентеротоксина стафилокока (SE) у добијеним екстрактима ДНК из 26 изолата
53 ентеротоксогених коагулаза позитивних стафилокока радила је применом
54 конвенционалне мултиплекс PCR технике (за гене *sea* и *seb*), односно техником Real-
55 Time PCR (за гене *sec*, *sed* и *see*).

56 За доказивање присуства *sea* гена користила је прајмере *sea-f* (5'-TCAATTTATGGCTA
57 GACGGTAAACAA-3') и *sea-r* (5'- GAAGATCCAACCTCCTGAACAGTTACA -3'), за присуство
58 *seb* користила је прајмере *seb-f* (5'- AACAACTCGCCTTATGAAACGGGAT -3') и *seb-r* (5'-
59 CTCCTGGTGCAGGCATCATGTCA -3'), за доказивање *sec* гена користила је прајмере
60 *sec-f* (5'- CGTATTAGCAGAGAGCCAACCA - 3') и *sec-r* (5'- GTGAATTTACTCGCTTT

1 GTGCAA-3'), за доказивање *sed* користила је прајмере *sed-f* (5'- AAACG
2 TTAAGCCAAATGAAAACA -3') и *sed-r* (- TGATCTCCTGTACTTTTATTTTCTCCTA -3'), а за
3 доказивање *see* користила је прајмере *see-f* (5'- TACCAATTAACCTTGTGGATAGAC -3') и
4 *see-r* (5'- CTCTTTGCACSTTACCGC -3').
5

6 **Резултати** су приказани табеларно и графички у шест целина. У циљу сагледавања
7 проблематике процене ризика од стварања ентеротоксина у меким сиревима без зрења
8 испитани су сиреви, који се производе различитим технологијама у индивидуалним
9 домаћинствима са више подручја у Србији, а износе на тржиште у Београду.
10 Испитивањем су обухваћени сиреви, који се производе од куваног или некуваног и
11 млека, различите старости, а подељени су у 2 групе на основу рН вредности. Групу
12 кисело-коагулишућих сирева чинили су сиреви у којима је измерена рН вредност била
13 4,6 и нижа, док су групу слатко-коагулишућих сирева чинили сиреви, чија је вредност рН
14 била виша од 4,6. Будући да је за стварање довољне количине ентеротоксина (најмање
15 20 µg), која може да изазове алиментарне интоксикације потребно да у сиру буде више
16 од 10⁵ cfu/g коагулаза позитивних стафилокока, испитан је налаз и ниво контаминације
17 сирева овим микроорганизмом. Од укупно 555 узорака сирева различите старости, који
18 су произведени од куваног или некуваног млека коагулаза позитивне стафилококе
19 доказала је у 168 (30,27%) узорака сирева. Од 168 узорака сирева у којима су доказане
20 коагулаза позитивне стафилококе, 140 (83,33%) узорака сира произведено је од
21 некуваног млека, а 28 (16,67%) узорака сира произведено је од куваног млека.

22 Применом ELFA технике утврђено је присуство ентеротоксина у 2 од 26 испитаних
23 узорака сира произведеног од некуваног млека у којима је број коагулаза позитивних
24 стафилокока био већи од 5 log cfu/g. Коагулаза позитивне стафилококе изоловане из та
25 два узорка сира стварале су ентеротоксине, а мултиплекс PCR техником код тих
26 изолата доказано је присуство гена за синтезу ентеротоксина А и В (*sea* i *seb*). На
27 основу биохемијски особина оба изолата идентификована су као *Staphylococcus aureus*.
28 Вредност рН у оба сира била је виша од 4,60, а вредност за активност воде била је
29 0,960 и 0,962. При овим вредностима могућ је раст *S. aureus*, а ако је температура за
30 раст била оптимална у условима производње сира, микроорганизам је имао довољно
31 времена и повољне услове да се умножи до вредности изнад 5 log cfu/g и створи
32 довољну количину ентеротоксина, која је детектована. Садржај NaCl у 2 узорка сира у
33 којима су доказани ентеротоксини био је 0,497 и 1,872%. У узорцима сира, у којима је
34 доказано присуство ентеротоксина, број *Lactococcus* spp. је био 7,84 и 8,23 log cfu/g а
35 број *Lactobacillus* spp 5,32 log cfu/g и 6,73 log cfu/g.

36 Применом скрининг метода VIDAS SET2 (Biomerieux, Француска) доказано је да од 85
37 изолата коагулаза позитивних стафилокока 26 (30,59%) изолата има способност да
38 ствара ентеротоксине. Од 26 ентеротоксигених изолата, 20 (76,92%) изолата је било
39 пореклом из узорака сира произведених од некуваног млека, а 6 (23,08%) изолата
40 пореклом из узорака сирева произведених од куваног млека. Испитивањем
41 биохемисјских особина применом теста ID 32 Staph (Biomerieux, Француска) 26 изолата
42 коагулаза позитивних стафилокока, које су стварале ентеротоксине идентификовано је
43 као *S. aureus* (61,54% изолата), *S. xylosus* (15,48% изолата), *S. lentus* (11,54% изолата) и
44 *S. sciuri* (15,48% изолата). Код свих 26 примозолата коагулаза позитивних стафилокока
45 из сирева произведених од куваног и некуваног млека утврђено је присуство гена за
46 синтезу ентеротоксина А (*sea*), док је код 24 изолата утврђено истовремено присуство
47 гена за синтезу ентеротоксина А (*sea*) и гена за синтезу ентеротоксина В (*seb*). Број
48 коагулаза позитивних стафилокока у овим сиревима кретао се од 1,00 до 5,97 log cfu/g.
49 Ниједан изолат није поседовао гене за синтезу ентеротоксина С (*sec*), D (*sed*) i E (*see*).
50 Од 26 испитаних узорака сира ентеротоксин је доказан у 2 (7,69%) узорка слатко-
51 коагулишућег сира произведеног од некуваног млека у којима је број коагулаза
52 позитивних стафилокока био изнад 5 log cfu/g. Слатко-коагулишући сиреви произведени
53 од некуваног млека, у којима је број коагулаза позитивних стафилокока већи од 5 log
54 cfu/g, могу да садрже ентеротоксине у количинама које изазивају интоксикације и
55 представљају ризик по здравље људи.

56 У поглављу **Дискусија** добијени резултати детаљно су објашњени и упоређени са
57 подацима из литературе. За поређење резултата добијених у оквиру ове докторске
58 дисертације корешћена је 161 библиографска јединица са освртом на најновије
59 резултате истраживања у области од интереса.

1 **VI ЗАКЉУЧЦИ ИСТРАЖИВАЊА (навести закључке који су приказани у докторској**
2 **дисертацији):**

3
4 На основу резултата испитивања могу се извести следећи закључци:

5 1. Од укупно 555 узорака сирева, коагулаза позитивне стафилококе доказане су у 168
6 (30,27%) узорака сира. Од 168 узорака сира коагулаза позитивне стафилококе су
7 доказане у 140 (83,33%) узорака сира произведеног од некуваног млека и 28 (16,67%)
8 узорка сира произведеног од куваног млека.

9
10 2. Број коагулаза позитивних стафилокока у 83 узорка сира кретао се од 1 до 5,90 log
11 cfu/g. Највећи број коагулаза позитивних стафилокока (5,90 log cfu/g) утврђен је у узорку
12 слатко-коагулишућег сира.

13
14 3. Коагулаза позитивне стафилококе изоловане из сира најчешће су стварале бета
15 хемолизу (50,98%), затим алфа плус бета хемолизу (22,55%), алфа хемолизу (4,90%),
16 најређе делата хемолизу и делта плус бета хемолизу (2,94%), а хемолизу на крвном
17 агару није стварало 15,69% изолата.

18
19 5. Коагулаза позитивне стафилококе изоловане из сира, за које је утврђено да стварају
20 ентеротоксине, на основу биохемијских особина идентификоване су као *S. aureus*
21 (61,54%), *S. xylosus* (15,38%), *S. sciuri* и *S. lentus* (11,54%).

22
23 6. ELFA техником утврђено је да 26 (30,59%) изолата коагулаза позитивних
24 стафилокока ствара класичне ентеротоксине (SEA-SEE).

25
26 7. Код свих 26 изолата коагулаза позитивних стафилокока, изолованих из узорка сира
27 за које је ELFA техником утврђено да стварају ентеротоксин, доказан је ген за
28 ентеротоксин А (*sea*), а код 24 изолата је поред *sea* гена доказан и ген за синтезу
29 ентеротоксина В (*seb*). Ниједан изолат није поседовао гене за синтезу ентеротоксина С
30 (*sec*), D (*sed*) и E (*see*).

31
32 8. Ентеротоксин је доказан у два узорка сира у којима је број коагулаза позитивних
33 стафилокока био изнад 5 log cfu/g .

34
35 9. Слатко-коагулишући сиреви произведени од некуваног млека, у којима је број
36 коагулаза позитивних стафилокока већи од 5 log cfu/g, могу да садрже ентеротоксине у
37 количинама које изазивају интоксикације и представљају ризик по здравље људи.

38
39 **VII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА**
40 **(навести да ли су добијени резултати у складу са постављеним циљем и**
41 **задацима истраживања, као и да ли закључци произилазе из добијених**
42 **резултата):**

43
44 Резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације су у складу са постављеним
45 циљем и задацима. Током остварења постављеног циља, одговорено је на све задатке.
46 Резултати су упоређени са подацима из домаће и стране литературе. За поређење
47 резултата коришћено је 204 библиографских јединица. Закључци произилазе из
48 добијених резултата.

49
50 **VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

51
52 1. **Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави**
53 **теме?**

54 Дисертација је написана у складу са образложењем написаним у пријави.

55
56 2. **Да ли дисертација садржи све елементе прописане за завршену докторску**
57 **дисертацију?**

58
59 Дисертација садржи све елементе битне за дисертацију.

60

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

2 Велика количина сирева се производи у домаћинствима и ставља у промет у
3 Републици Србији. У научној и стручној литератури нема довољно података о ризику
4 који те врсте сирева, када су у питању интоксикације ентеротоксинима стафилокока,
5 представљају по здравље људи. Резултати добијени испитивањем физичко хемијских
6 карактеристика сира, микробиоте сира, броја коагулаза позитивних стафилокока,
7 особина коагулаза позитивних стафилокока и присуства гена за синтезу ентеротоксина,
8 као и присуства ентеротоксина у сиру се могу користити за процену ризика од налаза
9 ентеротоксина коагулаза позитивних стафилокока у меком сиру произведеном у
10 домаћинству.

11 **IX ПРЕДЛОГ:**

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

14 - да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана

15
16
17
18
19 ДАТУМ 3.12.2014. године

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

20
21
22
23
24 1. др Вера Катић, редовни професор
25 Факултет ветеринарске медицине
26 Универзитет у Београду

27
28
29
30 2. др Зора Мијачевић, редовни професор
31 Факултет ветеринарске медицине
32 Универзитет у Београду

33
34
35
36 3. др Бранко Велебит, научни сарадник
37 Институт за хигијену и технологију
38 меса, Београд.