

Оцену готове докторске тезе,
достава.-

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
МЕДИЦИНСКОГ ФАКУЛТЕТА ВМА
УНИВЕРЗИТЕТА ОДБРАНЕ**

На 34. седници Наставно-научног већа Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду одржаној 26.11.2015. године одлуком бр. 52/34 одређени смо у комисију за оцену готове докторске тезе ВС асист. мр сц. Дејане Савић, из Института за микробиологију СПМ ВМА, под насловом „ФЕНОТИПСКЕ И ГЕНОТИПСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ИЗОЛАТА БАКТЕРИЈЕ *BACILLUS CEREUS* ПОРЕКЛОМ ИЗ РАЗЛИЧИТИХ УЗОРАКА“.

Након темељног проучавања готове докторске тезе и увидом у научни и стручни рад докторанда, комисија у саставу: ВС проф. др Соња Радаковић (Медицински факултет ВМА УО) – председник комисије, ВС проф. др Елизабета Ристановић (Војна академија УО) – ментор и члан комисије, проф. др Биљана Миљковић Селимовић (Медицински факултет Универзитета у Нишу) – члан, научни саветник др сц. Зорица Лепшановић (Медицински факултет ВМА УО) – члан комисије и пк проф. др Зоран Тамбур (Стоматолошки факултет Универзитета у Панчеву) – члан, подноси Наставно-научном већу МФ ВМА УО следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСКЕ ТЕЗЕ

Докторски рад ВС асист. мр сц. Дејане Свић написан је на 96 страна текста и подељен је на следећа поглавља: УВОД (28 страна), ХИПОТЕЗА И ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА (1 страна), МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ (11 страна), РЕЗУЛТАТИ (18 страна), ДИСКУСИЈА (12 страна), ЗАКЉУЧЦИ (1 страна) и ЛИТЕРАТУРА (24 стране). Резултати су илустровани са укупно 12 табела и 25 слика. У раду је цитирано 190 литературних података. Рад по својој структури има све елементе докторског рада.

Истраживање у докторском раду припада области микробиологије и односи се на испитивање патогенетског потенцијала бактерије *Bacillus cereus* у човековој околини, утврђивањем продукције токсина и отпорности ове бактерије на антибиотике и то у узорцима различитог материјала (столица пацијената, хране и животне и радне средине).

2. ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

У поглављу УВОД докторант даје опширан преглед досадашњих сазнања о врстама бактерије *Bacillus cereus*, њеним спорогеним карактеристикама, затим геному, култивацији и идентификацији врсте.

Врсте које припадају роду *Bacillus* су аеробни и факултативно анаеробни, Грам-позитивни, спорогени штапићи. Распрострањени су у земљи, води, ваздуху, храни, као и у фецесу људи и животиња. *Bacillus cereus* (*B. cereus*), од свих врста овог рода најчешће изазива алиментарне интоксикације и токсикоинфекције код људи. Ова обољења су повезана са конзумирањем различитих прехранбених производа, у којима доминирају скроб и протеини, као што су: пиринач, месо и месне прерађевине, дезерти, и конзервисана храна. Веома често је присутан као контаминант намирница анималног и биљног порекла, јер због отпорних спора може праживети различите физичке и хемијске услове њихове обраде и припреме. При оптималним физичко-хемијским уасловима *B. cereus* продукује две врсте токсина: еметични токсин и ентеротоксине. Еметични токсин, цереулин доводи до појаве еметичног синдрома који се код људи манифестује обилним повраћањем. Терморезистентне споре *B. cereusa* преживљавају термичку обраду намирнице и уколико се она чува дужи временски период на собној температури, доћи ће до раста и размножавања вегетативних облика, као и до продукције токсина. Ентеротоксини доводе до дијареје и абдоминалних болова. Ентеротоксини узрочници дијареје су термолабилни и синтетишу се у храни и у танком цреву. Како ентеротоксини нису стабилани на повишеној температури, излагање и обрада намирница на високој температури уништава токсине, а самим тим онемогућава и развој обољења.

Поред алиментарних инфекција *B. cereusa* изазива и читав низ других обољења: септимични менингитис, целулитис, гангрену, и бројне инфекције очију.

Како се *B. cereus* налази у храни, води, околини као микрофлора која не мора да изазове обољења код људи, од значаја је утврдити патогенетски потенцијал (продукцију токсина и отпорност на антибиотике) овог микроорганизма у човековој околини. Имајући у виду да су молекуларне методе идентификације брже од класичних, њихово упоређивање би дало корисне податке о ефикасности употребе PCR технике за идентификацију бактерије *B. cereus*. С обзиром на то да тежина клиничке слике код неких болесника захтева хоспитализацију, неопходно је познавати осетљивост овог микроорганизма на антибиотике који се примењују у терапији дијарејне болести.

Вођена уоченим проблемом, а на основу расположивих литературних података и свог претходног искуства у овој области, кандидаткиња формулише следећу радну хипотезу:

Сојеви *B. cereus* изоловани из околине, хране и људи разликују се према заступљености фактора вируленције, осетљивости према антибиотцима и заступљености генотипова.

У циљу провере ове радне хипотезе, одређени су следећи циљеви истраживања:

1. Изоловати сојеве *B. cereus* из узорак столице пацијената, хране и околине на селективној подлози.
2. Идентификовати сојеве *B. cereus* помоћу комерцијалних биохемијских тестова за идентификацију Грам- позитивних врста и PCR методеом.
3. Испитати осетљивост изолата *B. cereus* на антибиотике.
4. Доказати присуство гена за еметични токсин.
5. Доказати присуство гена за дијарејалне токсине.
6. Типизирати изолате *B. cereus* применом молекуларних метода (RAPD).
7. Утврдити да ли постоји корелација између RAPD профила и порекла бактерије.

У поглављу МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ кандидаткиња је јасно и детаљно представила дизајн и методологију истраживања. Истраживање је дизајнирано и спроведено као проспективна аналитичка студија, а одобрено је од стране Етичког одбора ВМА. У току 2013. године прикупљено је 62 узорка течне столице хоспитализованих и амбулантних пацијената на Одељењу за микробиологију Института за јавно здравље у Нишу (уз претходно прибављање писане информисане сагласности). У истом периоду, прикупљено је 40 узорак хране (чајеви, дијететски производи, зачини, млеко у праху и шунка), као и 146 брисева околине (36 из болничког окружења, а 110 из земљишта), и то у Сектору за превентивну медицину ВМА (Институт за хигијену и Институт за микробиологију) и у Одељењу за генетику Одсека за микробиологију Института за земљиште у Београду.

Све анализе извршене су у Сектору за превентивну медицину ВМА (Институт за хигијену, Институт за микробиологију и Институт за епидемиологију).

За изолацију је коришћена селективна хранљива подлога за *B. cereus*: MYP агар (Mannitol-Egg Yolk-Polymyxin Agar). За класичну идентификацију испитивањем биохемијских особина коришћени су комерцијални китови: Кристал кит за идентификацију Грам-позитивних бацила BD BBL CRYSTAL (Becton Dickinson, USA). Прајмери специфични за *B. cereus* коришћени су за идентификацију применом PCR методе.

Осетљивост сојева је испитана диск – дифузионом методом (Bionalyse, Ankara, Turska Cef-F, *bioMérieux*, *Marcy l'Etoile*, France). Продукција еметичног и дијарејалних токсина испитана је специфичним прајмерима (Invitrogen, SAD). За генотипску карактеризацију сојева *B. cereus* коришћена је RAPD метода (прајмери Invitrogen, SAD).

За израчунавање статистички значајне разлике коришћен је Фишеров и χ^2 тест, а вредност $p < 0,05$ сматрана је за значајну. Све статистичке анализе урађене су помоћу софтвера SPSS 11.5 (SPSS Inc. USA) и STATISTICA 8 (за кластер анализу RAPD профила).

Добијени резултати показују:

- Применом класичних, биохемијских и молекуларних метода из узорак столице пацијената, хране и околине, изоловано је и идентификовано по 30 сојева *B. cereus*;
- Испитивањем осетљивости сојева *B. cereus* на антибиотике утврђена је велика осетљивост на већину тестираних антибиотика. Значајно мања осетљивост

- детектована је на тетрациклин код сојева изолованих из столице пацијената и на триметоприм-сулфаметоксазол код сојева из хране и околине;
- Код свих тестираних изолата *B. cereus* утврђена је резистенција изолата на цефалоспорине треће генерације, пеницилин и ампицилин;
 - PCR анализом утврђено је присуство гена за еметични токсин код свих сојева *B. cereus* изолованих из столице пацијената, код 28/30 и 25/30 изолата из узорака хране и околине;
 - Присуство гена за ентеротоксине *hbla* и *entFM* доказано је у 29/30 изолата столице пацијената, 23/30 изолата из хране и 24/30 изолата из околине, а гена *entFM* у свих 30 изолата из столице пацијената и из хране, а у 28/30 изолата из околине;
 - Присуство сва три тестирана гена за токсине детектовано је у великом броју изолата из све три групе (29/30, 22/30, 21/30);
 - Учесталост гена за токсине у узорцима хране и околине указује на потенцијално висок ризика за људско здравље;
 - RAPD анализом утврђено је присуство изолата и из столице пацијената, хране и околине у истим кластерима, што указује на могућност постојања сличних сојева и у околини, земљишту, храни и столици пацијента, у складу са њиховим кружењем у природи кроз ланац исхране.

3. ОЦЕНА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА

У поглављу ДИСКУСИЈА докторант коректно, садржајно и критички сагледава добијене резултате у светлу постојећих сазнања добијених прегледом литературе која се бави проблематиком распрострањености и патогености *B. cereus*. Начин на који је дискусија написана указује на то да докторант у потпуности влада материјом из области којој припада тема докторског рада. Већина студија цитираних у овом раду на сличан начин описује распрострањеност генотипова *B. cereus* у различитом материјалу, али ово је прво истраживање у нашој средини, што умногоме доприноси значају ове тезе. Тамо где има смисла, мр сц. Дејана Савић аргументовано објашњава разлике између својих резултата и оних из сличних истраживања, а које су настале услед различитих навика у исхрани, односно конзумирања различитих намирница, као и разлика у гајењу биљака и животиња за људску исхрану.

Посебан квалитет овом истраживању даје карактеризација изолата према генском профилу *B. cereus*, што је омогућило анализу кластера у којима се налазе блиско сродни изолати. Ова метода се користи за генско мапирање у токсеномским и филогенетским студијама код бројних организама, али у овом случају омогућава увид у пут заражавања пацијената (конзумирање хране на истом месту и сл.). На овај начин се може идентификовати извор контаминације у некој епидемији, на пример, или потврдити узрок резистенције на антибиотике (услед примене антибиотика у ветеринарској медицини, на животињама намењеним за људску исхрану). Кандидаткиња је утврдила присуство изолата из све три групе у истом кластеру, чиме је указала на могућност постојања сличних сојева у околини, земљишту, храни и столици пацијената, и тиме потврдила кружење сојева у природи кроз ланац исхране.

4. ОБЈАВЉЕНИ РЕЗУЛТАТИ

Кандидаткиња је као аутор и коаутор објавила следеће радове:

ВС асист. мр сц. Дејане Савић (рођ. Чанчар)

1. M. Kataranovski, D.Kataranovski, **D. Savić**, G. Jovičić, Z. Bogdanović, T. Jovanović. Granulocyte and Plasma Cytokine Activity in Acute cadmium Intoxication in Rats.Physiol. Res. 47, 1998.
2. **D.Čančar**, M.Kataranovski, D.Kataranovski, I.Ivanović, V.Mihajlović. Toxicity of cadmium in rats I. Evaluation by changes of some biochemical and immunologically relevant parameters in short-term cultured lung explants. I RegionalSymp. "Chemistry and enviroment", Book of Proc. 1, 515-518. Vrnjačka Banja 1995.
3. M.Kataranovski, D.Kataranovski, M. Popović, **D. Čančar**. Toxicity of cadmium in rats II. Induction apoptosis (programmed cell death) in rats following cadmium administration. I Regional Symp. "Chemistryand enviroment", Book of Proc. 1, 523-526. Vrnjačka Banja 1995.
4. M. Kataranovski, M. Popović, D.Kataranovski, **D.Čančar**. Immunotoxicity of pesticides as monitored by *in vitro* tests of granulocyte funcion. I Regional Symp. "Chemistryand enviroment", Book of Proc. 1, 527-530. Vrnjačka Banja 1995.
5. M.Kataranovski, **D.Čančar**, S.Vujanić, I.Ivanović, V.Mihajlović, D.Kataranovski, A. Dujić. Short-term organ culture of animal and human skin explants as approach in toxicologicalstudies.IRegionalSymp."Chemistry and enviroment", Book of Proc. 1, 531-534. Vrnjačka Banja 1995.
6. S.Popović, M.Kataranovski, D.Kataranovski, **D. Čančar**, S. Mandić-Radić.Genotoxic effect of locally epicutaneously applied rodenticides: Assessment of cytogenetic damage to bone marrov by polychromatic erythrocyte (PCE) assey. I RegionalSymp."Chemistry and enviroment", Book of Proc. 1, 615-618. Vrnjačka Banja 1995.
7. M.Kataranovski, **D. Čančar**, M.Popović, Z. Bogdanović, D.Kataranovski, A. Dujić. Posttraumatic changes in lung compartment in two inberd strains of rats: Evolution by isolated rat lungs in hort-term culture. Pro-ceedings of the 8th European congress of IntesiveCare Medicine. Vol II Free Papers 709-712.Editor Roussos, Ch., Coeds:Papadatos, J., Papa-ndonatos, D., Risidakis, A. Publ.-Monduzzi editore Intern. Proc. Div., Bologna, Italy1995.
8. **D.Čančar**, D.Kataranovski, M.Kataranovski, Z. Bogdanović, A. Dujić, G.Jovičić. Pulmonary toxicity of cadmium in rats. Proceedings of the Third Intern. Sympos. and Enhhbition on Environ. Contam. In Central and EsternEurope, Sempthember 10-13, Warsaw, Poland:518-520; 1996.
9. **D.Čančar**, M.Kataranovski, D.Kataranovski, O.Vukićević. Evaluation of cadmium toxicity in rats by analysis of pulmonary toxicity: Influence of population attributes.

Proceedings of 19th Panhellenic Meeting of H.S.B.S. and 1st Biological Meeting of Balkan Countries, 15-18 May, Tessaloniki: 56-58, 1997.

10. **D.Čančar**, M.Kataranovski, D.Kataranovski, S.Popović, G.Jovičić, A.Dujić. Cadmium Induced Inflammation: Changes of granulocyte function. Frst Balkan Immunology Conference, Progr. And Abstr. Book, OP 265. Belgrade 1995.
11. M.Kataranovski, D.Kataranovski, **D. Čančar**, A. Dujić. Dermal toxicity of epicutaneously applied rodeticides. Third Intern. Sympos. And Exhibit. On Environm. Contamin. Central and Eastern Europe, Abstr. 174, p. 92. Warsaw. Poland 1996.
12. **D.Čančar**, M.Kataranovski, D.Kataranovski, A.Dujić. Pulmonary toxicity of cadmium in rats. Third Intern. Sympos. And Exhibit. On Environm. Contamin. Central and Eastern Europe, Abstr. 175, p. 93. Warsaw. Poland 1996.
13. M.Kataranovski, **D.Čančar**, D.Kataranovski, G.Jovičić, S. Popović, Ž. Jovičić, Z. Bogdanović, N.Pejnović, A.Dujić. Posttraumatic changes of inflammatory response in two inbred strains with different resistence to burn injury. Seventh Congr. Europ. Shock Soc., Manchester, UK, Suppl. To Shock, Vol. 5, Abstr. 3, p.8. 1996.
14. **D. Savić**. Istraživanja ekotoksikološki efekti kadmijuma na osnovu analize pulmonarne toksičnosti kod eksperimentalnih populacija sivog pacova. Magistarska teza 1998.
15. Z. Lepšanović, **D. Savić**. Detekcija *Borrelia burgdorferi* METODOM "NESTED PCR" Dezinfekcija, dezinfekcija i deratizacija u zaštiti zdravlja ljudi. IX Simpozijum sa međunarodnim učešćem. Zbornik radova. Beograd 2003.
16. Z.Lepšanović, **D.Savić**. Detekcija mycobacterium tuberculosis u nerespiratornim uzorcima pomoću Amplicor MTB PCR testa. 6th congres medicinske mikrobiologije. Beograd 11-14. jun 2008.
17. N. Kuljić Kapulica, D. Jovanović, **D.Savić**, N. Drašković, D.Stamatović, LjTukić, Lj, Ignjatović. CMV infekcija u transplantiranih bolesnika. 6th congres medicinske mikrobiologije. Beograd 11-14. jun 2008.
18. **D. Savić**, N. Kuljić Kapulica, D. Jovanović. Značaj PCR metode za rano otkrivanje i praćenje CMV infekcije kod transplantiranih bolesnika. IV Kongres genetičara Srbije. Tara, 1-5. juna 2009.
19. S. Lazić, S. Radaković, E. Ristanović, R. Čekanac, S. Rađen, Ž. Jadranin, **D. Savić**, J. Mladenović, D.Jovanović, M.Krstić, J.Čitić. 25. Univezijada u Beogradu kao preventivno-medicinski izazov. Teći međunarodni kongres "Ekologija, zdravlje, rad, sport" Banja Luka, 10.-13. 2009.
20. Z. Lepšanović, **D. Savić**, B.Tomanović. Pouzdanost primene Cobas Amplicor PCR Testa za detekciju Mycobacterium tuberculosis iz respiratornih i nerespiratornih

uzoraka. VSP 2010.

21. N.Kuljić-Kapulica, D.Stamatović, **D.Savić**, D.Jovanović, LJ. Tukić. Monitoring of CMV infection after Allogeneic cell transplantation. *Vojnosanit Pregl* 2010; May vol.67(No.5):pp.349-442.
22. N.Kuljić-Kapulica, D.Jovanović, **D. Savić**, E. Ristanović, D. Nožić, D. Raljić. Terapija hroničnog hepatitisa C – Praćenje virusološkog odgovora. *Vojnosanit Pregl* 2010; Nov vol. 67 (No.11):pp. 877-952.
23. D. Jovanović, **D. Savić**, D. Đurić-Petković, D.Tasić, N. Kuljić Kapulica. PCR u dijagnostici HBV infekcije.VII Kongres mikrobiologa Srbije, Beograd, 03-05. jun 2010.
24. Sonja S. Radaković, Maja Šurbatović, Elizabeta Ristanović, Slavica Rađen, Nikola Čikiriz, Zoran Tambur, **Dejana Savić**, Srđan Lazić. Kontrola ispravnosti hrane za vreme velikih sportskih manifestacija.Zbornik Radova, Banja Luka, 2011.
25. Sonja S. Radaković, Maja Šurbatović, Elizabeta Ristanović, Slavica Rađen, Nikola Čikiriz, Zoran Tambur, **Dejana Savić**, Srđan Lazić. Kontrola ispravnosti vode u bazenima za vreme velikih sportskih manifestacija.Zbornik Radova, Banja Luka, 2011.
26. Sonja S. Radaković, Milica Vukašinović-Vesić, Maja Šurbatović, Elizabeta Ristanović, Dragutin Jovanović, Zoran Tambur, **Dejana Savić**, Srđan Lazić, Slavica Rađen. Kontrola ispravnosti hrane za vreme velikih sportskih manifestacija.Hrana i ishrana (Beograd), vol.53. No.1., 43-48, 2012.
27. Zorica Lepšanović, Branka Tomanović, Bojan Rakonjac, Momčilo Đurić, Jelena Perovanović, Gorjana Rackov, Dragana Jošić, Maja Milosavljević, **Dejana Savić**, Srđan Lazić. Molekularna karakterizacija sojeva *Pseudomonas aeruginosa* koji produkuju metalo- β -laktamaze. *MD-Medical Data*. vol. 4 (3):249-252, 2012.
28. **Dejana Savić**, Dragutin Jovanović, Danijela Đurić Petković, Ljiljana Radojčić, Miljanović Gora, Elizabeta Ristanović, Zorica Lepšanović. Laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection detected by direct fluorescent antibody and polymerase chain reaction. *MD-Medical Data*. vol5 (4):343-346, 2013.
29. **Dejana Savić**, Biljana Miljković-Selimovic, Zorica Lepsanovic, Zoran Tambur, Sonja Konstantinovic, Nemanja Stankovic, Elizabeta Ristanovic. Antimicrobial Susceptibility and β -lactamase production in *Bacillus cereus* Isolates from Human stool, Food and Environment Samples. *Vojnosanit Pregl*, DOI br 10.2298/VSP .
30. **Dejana Savić**, Dragana Josic, Elizabeta Ristanovic, Radmila Pivic. Aleksandra Stanojkovic-Sebic, Zorica Lepsanovic. Detection of toxin genes and RAPD analysis of *Bacillus cereus* isolates from different soils. *Genetica*, Vol. 47, No.2, 627-638, 2015.

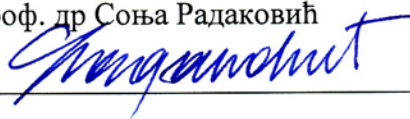
5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Кандидаткиња ВС асист. мр сц. Дејана Свић испуњава све услове дефинисане одлуком Наставно-научног већа бр. 6/488 од 25.10.2007. године. Докторска теза под насловом „ФЕНОТИПСКЕ И ГЕНОТИПСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ИЗОЛАТА БАКТЕРИЈЕ *BACILLUS CEREUS* ПОРЕКЛОМ ИЗ РАЗЛИЧИТИХ УЗОРАКА“ представља оригинални научни рад из области микробиологије. Истраживање је спроведено по свим начелима научно-истраживачког рада. Теза је написана јасно, систематично, студиозно и целовито. Добијени резултати доприносе сазнањима о распрострањености, патогеном потенцијалу и отпорности на антибиотике бактерије *B. cereus* у болесничком материјалу, али такође и у храни, болничкој околини и земљишту. На основу изнетог, чланови Комисије једногласно закључују да докторска теза ВС асист. мр сц. Дејане Савић испуњава све предвиђене критеријуме које академска пракса захтева, и као таква представља значајан допринос проучавању дате проблематике. С обзиром да кандидаткиња испуњава све законом предвиђене услове за одбрану тезе, Комисија са највећим задовољством предлаже Наставно-научном већу Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду да овај рад прихвати као завршену докторску тезу и омогући њену јавну одбрану.

У Београду, 15.12.2015. године

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

1. ВС проф. др Соња Радаковић



2. ВС проф. др Елизабета Ристановић



3. Проф. др Биљана Миљковић Селимовић



4. ВС научни саветник др сц. Зорица Лепшановић



5. Пк проф. др Зоран Тамбур

