

3
4
5 IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

6
7 I PODACI O KOMISIJI:

8
9 1. Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju: 25.05.2016. godine
10 Nastavno – naučno veće Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

11
12 2. Sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, zvanja, naziva uže
13 naučne oblasti za koju je izabran u zvanje, godinom izbora u zvanje i naziv fakulteta,
14 ustanove u kojoj je član komisije zaposlen:

- 15 1. Dr Dejan Krnjaić, vanredni profesor, mikrobiologija sa imunologijom, 2010.godine,
16 Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
- 17 2. Dr Nikola Popović, redovni profesor, klinička dijagnostika, patologija i terapija
18 životinja, 2001.godine, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
- 19 3. Dr Zoran Stanimirović, redovni profesor, genetika, 2007.godine, Fakultet veterinarske
20 medicine Univerziteta u Beogradu
- 21 4. Dr Milanko Šekler, viši naučni saradnik, oblast biotehničkih nauka - veterinarstvo,
22 mikrobiologija, 2014. godine, Veterinarski specijalistički institut Kraljevo,
- 23 5. Dr Kazimir Matović, naučni saradnik, oblast biotehničkih nauka - veterinarstvo,
24 mikrobiologija, 2014. godine, Veterinarski specijalistički institut Kraljevo.

25
26 II PODACI O KANDIDATU:

27
28 1. Ime, ime jednog roditelja, prezime: Ivan, Veselin, Bošnjak

29
30 2. Datum rođenja, opština, Republika: 04.11.1974. godine, Zrenjanin, Zrenjanin, Republika
31 Srbija

32
33 3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze*: 19.03.2010. godine, Beograd,
34 „Usporedna ispitivanja hematoloških i biohemijskih parametara krvi konja inficiranih sa
35 askaridama i strongilidama“

36
37 4. Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka*: preventivna
38 veterinarska medicina, parazitologija

39
40 III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:

41 „Ispitivanje prisustva, serotipske pripadnosti i rezistencije prema antimikrobnim sredstvima
42 *Salmonella* spp. kod gmizavaca i vodozemaca“

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

46 Doktorska disertacija kandidata mr Ivana Bošnjaka, dr vet. med. „Ispitivanje prisustva,
47 serotipske pripadnosti i rezistencije prema antimikrobnim sredstvima *Salmonella* spp. kod
48 gmizavaca i vodozemaca“ napisana je na ukupno 90 strane A4 formata i sadrži 9 tabela, 25
49 slika i 5 grafikona. Disertacija sadrži sledeća poglavlja: Uvod (2 strane), Pregled literature (28
50 strana), Cilj i zadaci ispitivanja (1 strana), Materijal i metode ispitivanja (5 strana), Rezultati
51 (31 strana), Diskusija (9 strana), Zaključci (2 strane), i Literatura (106 referenci, 10 strana).
52 Disertacija na početku sadrži kratak sadržaj na srpskom i engleskom jeziku (2 strane).

53
54 V VREDNOVANJE POJEDINIH DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis
55 svakog poglavlja disertacije: uvoda, pregleda literature, cilja i zadataka istraživanja,
56 materijal i metoda, rezultata, diskusije, spiska referenci):

57
58 U Uvodu kandidat je opisao *Salmonella* vrste kao jedne od najznačajnijih infektivnih
59 agenasa sa zoonoznim potencijalom, istakavši da životinje u prirodi predstavljaju njihov
60 rezervoar i važan izvor zaraze ne samo za životinje nego i za ljude. Kako se salmonele često

1 nalaze u gastrointestinalnom traktu mnogih gmizavaca i vodozemaca, preko fecesa se
2 izlučuju u okolnu sredinu i mogu uzrokovati infekcije kod velikog broja različitih vrsta životinja i
3 ljudi. U Srbiji do sada nije ispitivano prisustvo i raširenost vrsta, podvrsta i serovarijeteta
4 *Salmonella* kod gmizavaca i vodozemaca (kornjača, zmija, guštera i žaba), kako slobodnih u
5 prirodi, tako i držanih u zoološkom vrtu ili gajenih kao kućni ljubimci, stoga bi dobijanje
6 relevantnih podataka ukazalo na prisustvo određenih serovarijeteta *Salmonella* spp. i
7 omogućilo procenu rizika po zdravlje ljudi i životinja.

8 Imajuću u vidu da u našoj zemlji nije proučavana raširenost rezistencije prema
9 antimikrobnim sredstvima kod sojeva *Salmonella* izolovanih od gmizavaca i vodozemaca,
10 dobijeni rezultati prevalencije rezistencije ukazali bi na prisustvo gena rezistencije i
11 potencijalni rizik po zdravlje ljudi od infekcija izazvanih rezistentnim sojevima ili usled
12 prenošenja gena rezistencije.

13
14 **Pregled literature** predstavlja sintezu radova koji se odnose na najvažnije
15 karakteristike roda, vrsta, podvrsta i serovarijeta *Salmonella*, njihovu klasifikaciju i
16 nomenklaturu, morfološke, tinktorijalne, kulturelne i metaboličke osobine, dijagnostičke
17 metode ispitivanja, prisustvo i raširenost *Salmonella* spp. kod gmizavaca i vodozemaca, kao i
18 njihov zoonozni aspekt.

19 U dve tabele navedene su najvažnije biohemijske karakteristike koje se primenjuju
20 tokom postupka identifikacije roda, vrste i podvrste *Salmonella*, a kandidat se osvrnuo i na
21 antigene karakteristike na osnovu kojih se vrši serotipizacija. Kandidat je izvršio veoma
22 detaljnu analizu dijagnostičkih metoda koje se primenjuju kod ispitivanja prisustva *Salmonella*
23 spp. kod gmizavaca i vodozemaca. Pored konvencionalnog klasičnog mikrobiološkog
24 postupka izolacije, identifikacije i serotipizacije, opisani su i enzimski imuni test, ELISA test, i
25 metoda molekularne genetičke detekcije PCR (lančana reakcija polimeraza). Posebno je
26 istakao primenu masene spektrometrije kao analitičke metode koja je prethodnih godina našla
27 mesto u identifikaciji mikroorganizama. Opisao je automatizovanu mikrobiološku identifikaciju
28 koji koristi inovativnu masenu spektrometrijsku tehnologiju MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser
29 Desorption / Ionisation - Time of Flight), i omogućava otkrivanje proteina direktno iz intaktnih
30 mikroorganizama a time i identifikaciju u roku od nekoliko minuta.

31 Kandidat je obradio veliki broj radova koji se odnose na prisustvo *Salmonella* spp.
32 kod gmizavaca i vodozemaca, analizirajući kliničku manifestaciju salmoneloze, inaparentnost
33 infekcija i kliconoštvo, kao i prevalenciju podvrsta i serovarijeteta *Salmonella enterica*.

34 Veoma detaljno je izvršen pregled literature koji se odnosi na zoonozni aspekt
35 *Salmonella* spp. prisutnih kod gmizavaca i vodozemaca. Ukazano je da je najviši rizik prisutan
36 kod beba i dece mlađih od 5 godine, starih ljudi kao i osoba sa imunokompromitovanim
37 stanjem, i da je od 1972. godine od strane Agencije za hranu i lekove SAD uvedeno
38 obavezno ispitivanje kornjača na odsustvo salmonela pre njihove prodaje, odnosno zabrana
39 prodaje jaja i kornjača manjih od 10 centimetara. Procenjuje se da je donetim propisima u
40 SAD smanjen broj slučajeva salmoneloze kod dece odnosno ljudi za 100.000 slučajeva
41 godišnje. Širom sveta pored kornjača i druge vrste životinja, zmije, gušteri i žabe,
42 predstavljaju popularne kućne ljubimce. Kandidat je istakao da je teško precizno odrediti
43 tačan broj slučajeva salmoneloze ljudi koji su posledica kontakta sa gmizavcima, ali je izneo
44 podatak o proceni da je 70.000 ovakvih slučajeva godišnje u Sjedinjenim Američkim
45 Državama, što predstavlja 6% svih slučajeva salmoneloze ljudi, odnosno 11% slučajeva kod
46 osoba mlađih od 21. godine. Imajući u vidu veliki broj slučajeva indirektnog prenošenja
47 salmonela Centar za kontrolu zaraznih bolesti SAD preporučio je da se ne drže gmizavci kao
48 kućni ljubimci u domaćinstvima sa decom mlađom od 5 godina, kao i da se gmizavci ne drže
49 u školama. I u zemljama članicama Evropske unije sistematski se prikupljaju epidemiološki
50 podaci o pojavi i raširenosti slučajeva salmoneloze ljudi za koje se smatra da su izvor
51 infekcije bili gmizavci. Tako je na primer u Švedskoj u periodu od 1990. do 2000. godine
52 utvrđeno 339 datih slučajeva, što predstavlja 5% svih slučajeva salmoneloze ljudi, dok je u
53 Ujedinjenom Kraljevstvu i u Holandiji 1% slučajeva salmoneloze ljudi direktno ili indirektno
54 povezano sa gmizavcima.

55 Kandidat je u pregledu literature obradio radove koji upućuju na zaključak da je do
56 pre kratkog vremena retko otkrivana rezistencija *Salmonella* spp. prema antimikrobnim
57 sredstvima. Prethodnih godina povećao se broj izolata *Salmonella* koji su ispoljili rezistenciju
58 na više antibiotika, pa i antibiotike prvog izbora u terapiji salmoneloze kod ljudi. Kandidat je
59 istakao da su u Nemačkoj izolovani sojevi *Salmonella* spp. poreklom od gmizavaca otporni

1 prema nalidiksinskoj kiselini i ciprofloksacinu, a da su širom sveta ustanovljeni i
2 multirezistentni izolati.

3
4 **Cilj i zadaci istraživanja** su bili da se ispita prisustvo serotipova *Salmonella* spp. kod
5 gmizavaca i vodozemaca u Republici Srbiji, da se ustanovi postojanje rezistencije prema
6 antimikrobnim sredstvima kod izolata *Salmonella* spp. i da se proceni rizik od infekcija ljudi
7 *Salmonella* spp. poreklom od gmizavaca i vodozemaca.

8 Radi ostvarivanja cilja istraživanja postavljeni su sledeći zadaci:

- 9 1. Uzimanje kloakalnih i orofaringealnih briseva kao i fecesa od gmizavaca i
10 vodozemaca slobodnih u prirodi, iz zoološkog vrta i kućnih ljubimaca.
- 11 2. Izolacija, identifikacija i serotipizacija sojeva *Salmonella* spp. izolovanih od
12 gmizavaca i vodozemaca.
- 13 3. Ispitivanje osetljivosti izolata *Salmonella* spp. prema antimikrobnim
14 sredstvima.
- 15 4. Detekcija gena rezistencije odnosno mutacija kod sojeva *Salmonella* spp.
16 izolovanih iz vodozemaca i gmizavaca.

17
18 U poglavlju **Materijal i metode** naveden je materijal koji je tokom istraživanja
19 uzorkovan od kornjača, guštera, zmija i žaba, uključujući kloakalne, orofaringealne i briseve
20 kože, kao i feces. Uzorci su bili prikupljeni od gmizavaca i vodozemaca slobodnih u prirodi, iz
21 zoološkog vrta i držanih kao kućni ljubimci.

22
23 Kandidat je primenio sledeće metode:

- 24 • Mikrobiološku metodu izolaciju i identifikaciju *Salmonella* spp. koja je izvođena prema
25 standardu SRPS EN ISO 6579:2008 Horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella*
26 spp. uz upotrebu propisanih hranljivih podloga puferizovane peptonske vode,
27 Rapapport Vasiliadis bujona, modifikovanog polutečnog Rapapport Vasiliadis agara i
28 ksiloza lizin dezoksiholat (XLD) agara. Pored standardom propisane podloge XLD
29 agara korišćene su još tri diferencijalne podloge: MacConkey agar, Hektoen enteric
30 agar i hromogena podloga chromID™ *Salmonella* Agar (SM2) proizvođača Biomerieux.
- 31 • Mikrobiološke metode identifikacije vrste i podvrste *Salmonella* ispitivanjem kulturelnih i
32 metaboličkih osobina uključujući ispitivanje biohemijskih osobina upotrebom podloge sa
33 ureom po Christensenu, podloge sa citratom po Simonsu, podloge za Voges Proskauer
34 i metil crvenu reakciju, podloge sa fenilalaninom, podloge za indol kao i ONPG diskova.
35 Tokom identifikacije ispitivane su i oksidaza reakcija, katalaza reakcija, sposobnost
36 produkcije H₂S, razgradnja lizina kao i fermentacija laktoze, dulcitol, sorbitol i
37 tartarata. Po potrebi korišćen je i komercijalni identifikacioni test BBL™ Crystal™
38 Enteric/Nonfermenter ID Kit proizvođača Becton Dickinson iz SAD.
- 39 • MALDI-TOF masenu spektrometrija uz upotrebu Vitek MS aparata proizvođača
40 bioMérieux iz Francuske i identifikaciju bakterija analizom utvrđenih masenih spektara
41 primenom programa MYLA® software2 proizvođača bioMérieux iz Francuske.
- 42 • Serološku tipizaciju izolata *Salmonella* spp. izvođenu prema standardu CEN ISO/TR
43 6579-3:2014, Horizontalna metoda za otkrivanje, određivanje broja i tipizaciju
44 *Salmonella* — Deo 3: Uputstvo za tipizaciju *Salmonella* spp. Tokom serotipizacije
45 korišćeni su polivalentni i monovalentni antiserumi salmonela kako grupni tako i
46 specifični za O, H i Vi antigene, proizvođača Bio-Rad i Becton Dickinson, SAD, Statens
47 Serum Instituta iz Danske i Instituta za javno zdravlje Srbije Dr Milan Jovanović Batut,
48 Beograd.
- 49 • Disk difuzionu metodu ispitivanja osetljivosti na antimikrobne supstance prema CLSI
50 M02-A11 standardu (Clinical and Laboratory Standards Institute) uz upotrebu
51 antibiogram diskova (Becton, Dickinson and company, SAD): ampicilin (10 µg) ,
52 cefotaksim (30µg), hloramfenikol (30µg), ciprofloksacin (5µg), gentamicin (10µg),
53 nalidiksinska kiselina (30µg), tetraciklini (30µg) i trimetoprim sa sulfametoksazolom
54 (1.25+23.75µg), a interpretacija kategorija vršena je prema standardu CLSI M100-S24.
- 55 • Mikrodilucioni test u bujonu, metodu određivanja minimalnih inhibitornih koncentracija
56 antimikrobnih supstanci prema standardu CLSI (CLSI, 2014), za sledeća antimikrobna
57 sredstva ampicilin, cefotaksim, hloramfenikol, ciprofloksacin, gentamicin, nalidiksinsku
58 kiselina, tetraciklin i trimetoprim sa sulfametoksazolom, u koncentracijama antibiotika u
59 rasponu od 32 µg/ml do 0,0312 µg/ml, sa izuzetkom za trimetoprim sa

1 sulfametoksazolom kod koga je koncentracija bila u rasponu od 120 µg/ml + 32 µg/ml
2 do 0,58 µg/ml + 0,0312 µg/ml.

- 3 • Deskriptivne i analitičke statističke metode. Od deskriptivnih statističkih metoda
4 korišćeni su apsolutni i relativni brojevi (%). Testiranje na normalnost izvedeno je
5 pomoću Kolmogorov-Smirnov testa, a zatim su primenjivani χ^2 test i *Kappa* statistička
6 analiza. Signifikantnost razlika ustanovljivana je na nivou značajnosti od 5%.
7 Statistička obrada podataka izvođena je primenom softverskog paketa Statistica verzija
8 8.0 i GraphPad Prism verzija 5.0.

9
10 Originalni podaci koji su dobijeni u ovoj disertaciji izneti su u poglavlju **Rezultati**, a
11 prikazani su tekstualno, tabelarno, u slikama i grafikonima.

12 U uzorcima od 317 gmizavaca i vodozemaca, poreklom od 42 različite vrste životinja,
13 ustanovljeno je prisustvo *Salmonella* spp. kod 16 različitih vrsta i ukupno 57 jedinki, odnosno
14 kod 17,98% ispitanih životinja. U okviru istraživanja ni kod jednog vodozemaca nije utvrđena
15 *Salmonella* spp., a od 301 ispitanih gmizavaca od 57 su izolovani sojevi *Salmonella* spp.,
16 odnosno od 18,93% jedinki. Izolovana je vrsta *Salmonella enterica* i to 41 soj podvrste
17 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (I) i 16 sojeva *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*
18 (IIIb).

19 Prilikom prikupljanja uzoraka kod većeg broja gmizavaca i vodozemaca uzimani su
20 istovremeno kloakalni i orofaringealni brisevi odnosno kloakalni bris i feces, koji su zatim u
21 laboratoriji ispitivani kao posebni uzorci. Iz 38 paralelno ispitanih kloakalnih i orofaringealnih
22 briseva gmizavaca i vodozemaca izolovano je 13 sojeva *Salmonella enterica* i to 2 soja iz oba
23 brisa, 10 samo iz kloakalnog i 1 iz orofaringealnog. Tokom paralelnog ispitivanja 20 kloakalnih
24 briseva i fecesa od gmizavaca ukupno je izolovano 5 sojeva *Salmonella enterica*, i to 2 soja i
25 iz kloakalnih briseva i fecesa, a 3 soja samo iz fecesa.

26 MALDI-TOF masenom spektrometrijom upotrebom Vitek MS aparata ispitano je 25
27 prethodno biohemijski identifikovanih izolata *Salmonella enterica* i determinisano :

- 28 - 17 izolata kao *Salmonella* group sa verovatnoćom od 99%,
29 - 5 izolata kao *Salmonella enterica* ssp *diarizonae* ili *Salmonella enterica* ssp *arizonae*
30 sa verovatnoćom od 50%,
31 - 1 izolat kao *Salmonella* group, *Salmonella enterica* ssp *diarizonae* ili *Salmonella*
32 *enterica* ssp *arizonae* sa verovatnoćom od 33,3%,
33 - 1 izolat kao *Salmonella* group, *Salmonella enterica* ssp *diarizonae*, *Salmonella*
34 *enterica* ssp *arizonae* ili *Citrobacter koseri* sa verovatnoćom od 25%,
35 - 1 izolat kao *Salmonella enterica* ssp *diarizonae*, *Salmonella enterica* ssp *arizonae*,
36 *Lactococcus raffinolactis* ili *Serratia fonticola* sa verovatnoćom od 20,3%.

37 Serološkom tipizacijom i dodatnim biohemijskih reakcijama determinisano je kao
38 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* 16 izolata od 17 izolata *Salmonella* group prema MALDI-
39 TOF MS analizi, i kao *Salmonella enterica* ssp *diarizonae* 8 izolata koji su prema MALDI-TOF
40 MS rezultatima bili najverovatnije *Salmonella enterica* ssp *diarizonae* ili *Salmonella enterica*
41 ssp *arizonae*. Jedan izolat koji je prema rezultatima konvencionalnih biohemijskih reakcija,
42 BBL™ Crystal™ Enteric/Nonfermenter ID kita i MALDI-TOF MS analize potvrđivan kao
43 *Salmonella* spp. upotrebom komercijalnog API® 20E bioMérieux kita kao i polivalentih
44 antiseruma identifikovan je kao *Citrobacter youngae* sa 99,6% verovatnoće.

45 Primenom *Kappa* statističke analize utvrđena je izuzetno visoka podudarnost
46 dobijenih rezultata identifikacije *Salmonella* spp. primenom MALDI-TOF MS sa rezultatima
47 biohemijske identifikacije *Salmonella*, a *Kappa* vrednost je iznosila $k = 0,947$, odnosno sa
48 95% intervalom pouzdanosti između 0.846-1.000.

49 *Salmonella enterica* je izolovana od 24 od 152 ispitane kornjače, 14 od 76 ispitanih
50 guštera i 19 od 73 ispitane zmijske, a time je prevalencija u odnosu na broj jedinki obuhvaćenih
51 ispitivanjem iznosila 15,79%, 18,42% i 26,03%.

52 Od ukupno 42 ispitane vrste životinja izolati *Salmonella enterica* su poticali od 16
53 različitih vrsta gmizavaca i to: šumske kornjače (*Testudo hermanni*), barske kornjače (*Emys*
54 *orbicularis*), crvenouhe kornjače (*Trachemys scripta elegans*), zelembača (*Lacerta viridis*),
55 iguane (*Iguana iguana*), bradate agame (*Pogona vitticeps*), leopard gekona (*Eublepharis*
56 *macularius*), gecka (*Hemithelyconyx caudicinctus*), sudanskog oklopnog guštera (*Gerrhosaurus*
57 *major*), ribarice (*Natrix tessellata*), smuka (*Zamenis longissimus*), poskoka (*Vipera*
58 *ammodytes*), boe (*Boa constrictor*), kalifornijske kraljevske zmijske (*Lampropeltis getula*
59 *californiae*), pitona (*Python regius*) i mlečna zmijska (*Lampropeltis triangulum*). Prevalencija
60 nalaza salmonela bila je najviša kod kalifornijske kraljevske zmijske, sudanskog oklopnog

1 guštera, poskoka, ribarice, boe i mlečne zmije, kod kojih se kretala u rasponu od 40% pa čak i
2 do 100%.

3 Od 24 soja *Salmonella* izolovanih od 152 kornjače, 8 je poticalo od jedinki slobodnih
4 u prirodi, 12 iz zoološkog vrta i 4 od kućnih ljubimaca. Od 14 sojeva *Salmonella* izolovanih od
5 76 guštera, 1 je poticao od jedinke slobodne u prirodi, 3 iz zoološkog vrta i 10 od kućnih
6 ljubimaca. Od 19 sojeva *Salmonella* izolovanih od 73 zmije, 10 je poticalo od jedinki slobodnih
7 u prirodi, 4 iz zoološkog vrta i 5 od kućnih ljubimaca. Statističkom analizom utvrđena je
8 statistički značajna razlika u raširenosti *Salmonella* kod kornjača i zmija u zavisnosti od
9 prirode njihovog staništa i držanja. Kod kornjača gajenih kao kućni ljubimci prisustvo
10 *Salmonella* je statistički značajno više nego kod kornjača slobodnih u prirodi ili zoološkog vrta
11 $p=0.0002$. Kod zmija u prirodi prisustvo *Salmonella* je statistički značajno više nego kod zmija
12 držanih u zoološkom vrtu ili gajenih kao kućni ljubimci $p=0.023708$.

13 Nakon sprovedene identifikacija i serotipizacija od ukupno 57 izolovanih sojeva
14 utvrđeno je prisustvo 41 soja *Salmonella enterica* subspecies *enterica* i 16 sojeva *Salmonella*
15 *enterica* subspecies *diarizonae*, što predstavlja 71,93 % odnosno 28,07% od ukupnog broja
16 izolata, i to:

17 *Salmonella enterica* subspecies *enterica*

18 <i>Salmonella</i> Ago 30 : z38 . -	- 5 izolata
19 <i>Salmonella</i> Ahuza 43:k:1,5	- 2 izolata
20 <i>Salmonella</i> Apapa 45 : m,t : -	- 3 izolata
21 <i>Salmonella</i> Benin 9,46 : y : 1,7	- 4 izolata
22 <i>Salmonella</i> Bispebjerg 4,5,12:a:e,n,x	- 3 izolata
23 <i>Salmonella</i> Eastbourne 9,12:e,h:1,5	- 1 izolat
24 <i>Salmonella</i> Enteritidis 9,12 : g,m : -	- 1 izolat
25 <i>Salmonella</i> Finkenwerder 6,14:d:1,5	- 1 izolat
26 <i>Salmonella</i> Glostrup 6,8:z10:e,n,z15	- 2 izolata
27 <i>Salmonella</i> Hadar 6,8 : z10 : e,n,x	- 1 izolat
28 <i>Salmonella</i> Potsdam 6,7:l,v:e,n,z15	- 2 izolata
29 <i>Salmonella</i> Thompson 6,7 . k : 1,5	- 9 izolata
30 <i>Salmonella</i> Umbilo 28 : z10 : e,n,x	- 6 izolata
31 <i>Salmonella</i> Wagenia 4,12:b:e,n,z15	- 1 izolat

32 *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae*

33 IIIb (6),14 : z10 : z	- 2 izolata
34 IIIb 14:l, v:z53	- 2 izolat
35 IIIb 17 : z10 : e,n,z15	- 2 izolata
36 IIIb 17 : l,v : z	- 2 izolat
37 IIIb 18 : l,v : z	- 1 izolat
38 IIIb 35 : i : z35	- 2 izolata
39 IIIb 47 : - : z35	- 1 izolat
40 IIIb 50 : i : z	- 1 izolat
41 IIIb 50 : r : z	- 3 izolat
42 IIIb 61 : c : z35	- 1 izolat

43

44 Utvrđivanjem antigenske građe izolata *Salmonella enterica* utvrđeno je da su spadali
45 u 14 različitih serovarijeta *S.enterica* subsp. *enterica* i 10 različitih serovarijeteta *S.enterica*
46 subsp. *diarizonae*.

47 Prema podacima kojima raspolažemo od ukupno utvrđenih 24 serovarijeteta, po prvi
48 put je identifikovano u Srbiji 13 serovarijeteta to: S. Ago, S. Apapa, S. Benin, S.
49 Finkenwerder, S. Wagenia, IIIb 17 : l,v : z, IIIb 17: z10 : e,n,z15, IIIb 18 : l,v : z, IIIb 47 : - :
50 z35, IIIb 50 : r : z, IIIb 35 : i : z35, IIIb 50 : i : z i IIIb 61 : c : z35.

51 Za identifikovani serovarijetet IIIb 17 : l,v : z je potrebna potvrda u supranacionalnoj
52 referentnoj laboratoriji, WHO *Salmonella* Reference Centre Pasteur Institute Paris, jer nije
53 naveden u postojećoj White – Kauffmann - Le minor šemi.

54 Od serovarijeteta *Salmonella enterica* subsp. *enterica* koji su izolovani od gmizavaca
55 u okviru doktorske disertacije, u Srbiji kod ljudi se mogu ustanoviti često S. Enteritidis, S.
56 Thompson i S. Hadar, odnosno sporadično S. Glostrup, S. Bispebjerg i S. Potsdam.

57 Od serovarijeteta koji spadaju u REPAS serovarijetete (Reptile-Exotic-Pet-
58 Associated-Salmonellosis), serovarijetete gmizavaca kućnih ljubimaca koji se dovode u vezu
59 sa infekcijama ljudi, u okviru istraživanja izolovani su S. Apapa, S. Eastbourne, S. Potsdam i

1 veći broj serovarijeteta *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* uključujući i IIIb (6),14 :
2 z10 : z.

3 Primenom disk difuzione i mikrodilucione metode utvrđena je kod svih 57 izolata
4 *Salmonella* spp. osetljivost prema svim ispitivanim antimikrobnim sredstvima, ampicilinu,
5 cefotaksim, hloramfenikolu, ciprofloksacinu, gentamicinu, nalidiksinskoj kiselini,
6 tetraciklinima i trimetoprimu sa sulfametoksazolom. Kako nije kod izolata utvrđena rezistencija
7 prema antibioticima i hemoterapeuticima nije ni sprovedeno ispitivanje prisustva određenih
8 gena rezistencije odnosno pojave mutacija u genomu bakterija.

9
10 U poglavlju **Diskusija** kandidat kritički analizira rezultate dobijene u istraživanju i poredi
11 ih sa rezultatima domaćih i stranih autora.

12
13 Poglavlje **Literatura** sadrži 106 bibliografskih jedinica uglavnom iz strane literature.

14 VI ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA (navesti zaključke koji su prikazani u doktorskoj 15 disertaciji):

- 16
17
18 1. U uzorcima od 317 gmizavaca i vodozemaca, poreklom od 42 različite vrste životinja,
19 ustanovljeno je prisustvo *Salmonella* spp. kod 16 različitih vrsta gmizavaca i ukupno
20 kod 57 jedinki, odnosno kod 17,98% ispitanih životinja.
- 21 2. Primena MALDI-TOF masene spektrometrije (matrix-assisted laser desorption
22 ionization – time of flight mass spectrometry) u determinaciji roda i vrste *Salmonella*
23 može uspešno zameniti identifikaciju koja se zasniva na ispitivanju fiziološko-
24 biohemijskih osobina bakterija. Primenom *Kappa* statističke analize i izračunate
25 *Kappa* vrednosti $k=0,947$ utvrđena je izuzetno visoka podudarnost dobijenih rezultata
26 identifikacije *Salmonella* spp. primenom MALDI-TOF MS i konvencionalne
27 mikrobiološke metode biohemijske identifikacije.
- 28 3. Kod vodozemaca obuhvaćenih ispitivanjem velike zelene žabe (*Pelophylax*
29 *ridibundus*), šumske krastave žabe (*Bufo bufo*), žutotrbe ognjene žabe (*Bambina*
30 *variegata*), zelene krastače (*Bufo viridis*), šarenog daždevnjaka (*Salamandra*
31 *salamandra*) nije ustanovljeno prisustvo *Salmonella* spp.
- 32 4. *Salmonella enterica* je izolovana iz uzoraka poreklom od 16 različitih vrsta gmizavaca
33 i to: šumske kornjače (*Testudo hermannii*), barske kornjače (*Emys orbicularis*),
34 crvenouhe kornjače (*Trachemys scripta elegans*), zelembača (*Lacerta viridis*), iguane
35 (*Iguana iguana*), bradate agame (*Pogona vitticeps*), leopard gekona (*Eublepharis*
36 *macularius*), gecka (*Hemithelyconyx caudicinctus*), sudanskog oklopnog guštera
37 (*Gerrhosaurus major*), ribarice (*Natrix tessellata*), smuka (*Zamenis longissimus*),
38 poskoka (*Vipera ammodytes*), boe (*Boa constrictor*), kalifornijske kraljevske zmiije
39 (*Lampropeltis getula californiae*), pitona (*Python regius*) i mlečne zmiije (*Lampropeltis*
40 *triangulum*).
- 41 5. *Salmonella enterica* je izolovana od 57 od 301 ispitanih gmizavaca, odnosno od
42 18,93% jedinki, i to 41 soj *Salmonella enterica* subspecies *enterica* i 16 sojeva
43 *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae*.
- 44 6. *Salmonella enterica* je izolovana od 24 od 152 ispitane kornjače, 14 od 76 ispitanih
45 guštera i 19 od 73 ispitane zmiije, a time je prevalencija u odnosu na broj jedinki
46 obuhvaćenih ispitivanjem iznosila 15,79%, 18,42% i 26,03%.
- 47 7. Prevalencija *Salmonella enterica* kod kornjača gajenih kao kućni ljubimci je statistički
48 značajno viša nego kod kornjača slobodnih u prirodi ili čuvanih u zoološkom vrtu,
49 $p=0.0002$.
- 50 8. Prevalencija *Salmonella enterica* kod zmiija slobodnih u prirodi je statistički značajno
51 viša nego kod zmiija čuvanih u zoološkom vrtu ili gajenih kao kućni ljubimci, $p=0.0237$.
- 52 9. Izolati salmonela su spadali u 24 serovarijeteta *Salmonella enterica* subsp. *enterica* i
53 *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*, od kojih je po prvi put identifikovano u Srbiji
54 13 serovarijeteta: S. Ago, S. Apapa, S. Benin, S. Finkenwerder, S. Wagenia, IIIb 17 :
55 I,v : z, IIIb 17: z10 : e,n,z15, IIIb 18 : I,v : z, IIIb 47 : - : z35, IIIb 50 : r : z, IIIb 35 : i :
56 z35, IIIb 50 : i : z i IIIb 61 : c : z35.
- 57 10. Kod gmizavaca obuhvaćenim ispitivanjem utvrđeni su serovarijeteti S. Enteritidis, S.
58 Thompson i S. Hadar koji su u Srbiji često ustanovljeni kod ljudi, odnosno S.
59 Glostrup, S. Bispebjerg i S. Potsdam čije je prisustvo potvrđeno kod ljudi u Srbiji.

- 1 11. Kod gmizavaca obuhvaćenim ispitivanjem utvrđeni su serovarijeteti *Salmonella*
2 *enterica* subspecies *enterica* S. Apapa, S. Eastbourne, S. Potsdam i veći broj
3 serovarijeteta *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* uključujući i IIIb (6),14 : z10
4 :z, a koji spadaju u REPAS serovarijetete *Salmonella enterica*, serovarijeteti prisutne
5 kod gmizavaca gajenih kao kućni ljubimci i koji se dovode u vezu sa infekcijama ljudi.
6 12. Primenom disk difuzione i mikrodilucione metode utvrđena je kod svih 57 izolata
7 osetljivost prema svim ispitivanih antibioticima.
8 13. Dobijeni rezultati jasno potvrđuju da zmije, gušteri i kornjače, slobodni u prirodi,
9 držani u zoološkom vrtu i gajeni kao kućni ljubimci, mogu biti rezervoar različitih
10 podvrsta i serovarijeteta *Salmonella enterica* i da predstavljaju rizik po zdravlje ljudi,
11 što nameće potrebu za sistematskim pristupom, opsežnijim ispitivanjima prisustva i
12 moguće epidemiološke povezanosti salmoneloze gmizavaca i ljudi.
13

14
15 **VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li**
16 **su dobijeni rezultati u skladu sa postavnjenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li**
17 **zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):**
18

19 Rezultati istraživanja su prikazani tekstualno i dokumentovani su sa 25 slika, 7 tabela
20 i 5 grafikona. Rezultati su pravilno i kritički tumačeni.

21 Tekst je napisan koncizno, jasnim i razumljivim stilom. Komisija smatra da su dobijeni
22 rezultati ispitivanja u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja i da zaključci ove
23 doktorske disertacije proizilaze iz dobijenih rezultata.
24

25 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**
26

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

28 Disertacija je napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi. Primenjene
29 metode ispitivanja su standardizovane i prilagođene cilju i zadacima disertacije, navedenim u
30 prijavi teme.
31

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

33 Doktorska disertacija kandidata mr Ivana Bošnjaka, dr vet. med. sadrži sve elemente
34 propisane za završenu doktorsku disertaciju.
35

36 **3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?**

37 Originalan doprinos nauci ove disertacije ogleda se u tome što je po prvi put u Srbiji
38 ispitivano i ustanovljeno prisustvo i raširenost *Salmonella* vrsta kod gmizavaca i vodozemaca.
39 Po prvi put u Srbiji je izvršena mikrobiološka identifikacija *Salmonella* upotrebom MALDI-TOF
40 masene spektrometrije, sprovedena analiza i poređenje masenih spektara sa rezultatima
41 serotipizacije. Po prvi put u Srbiji je identifikovano 13 serovarijeteta *Salmonella enterica*
42 subsp. *enterica* i *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*: S. Ago, S. Apapa, S. Benin, S.
43 Finkenwerder, S. Wagenia, IIIb 17: l,v : z, IIIb 17: z10 : e,n,z15, IIIb 18 : l,v : z, IIIb 47 : - : z35,
44 IIIb 50: r : z, IIIb 35 : i : z35, IIIb 50 : i : z i IIIb 61 : c : z35. Kako je utvrđeno prisustvo kod
45 kornjača, guštera i zmija serovarijeteta *Salmonella enterica subsp. enterica*, prethodno
46 dokazanih i kao uzročnika salmoneloze ljudi u Srbiji, S. Enteritidis, S. Thompson, S. Hadar, S.
47 Glostrup, S. Bispbjerg i S. Potsdam, dobijeni rezultati potvrđuju postojanje rizika po zdravlje
48 ljudi i ukazuju na neophodnost sprovođenja daljih istraživanja i usmeravanja posebne pažnje
49 na otkrivanje i sprečavanje prenošenja salmonela sa gmizavaca i vodozemaca na ljude i
50 domaće životinje.
51
52
53

1 **IX PREDLOG:**

2
3 **Na osnovu ukupne ocene disertacije, komisija predlaže (odabrati jednu od tri**
4 **ponuđenih mogućnosti):**

5
6 Na osnovu ukupne ocene doktorske disertacije kandidata mr Ivana Bošnjaka dr vet.
7 med. Komisija predlaže da se doktorska disertacija prihvati, a kandidatu odobri odbrana.

8
9 DATUM

10
11 13.06.2016.godine

12 POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

- 13
14
15
16 1. dr Dejan Krnjaić, van.prof.
17 Fakultet veterinarske medicine
18
19
20
21
22
23
24 2. dr Nikola Popović, red. prof.
25 Fakultet veterinarske medicine
26
27
28
29
30
31
32 3. dr Zoran Stanimirović, red. prof.
33 Fakultet veterinarske medicine
34
35
36
37
38
39
40 4. dr Milanko Šekler, viši naučni
41 saradnik VSI Kraljevo
42
43
44
45
46
47
48 5. dr Kazimir Matović, naučni saradnik
49 VSI Kraljevo
50
51
52
53
54
55
56
57
58