

3  
4  
5 IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE  
6

7 I PODACI O KOMISIJI:

8 1. Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju:

9  
10 Nastavno-naučno Veće Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu na 168.  
11 Sednici održanoj 25.05.2016.godine.

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

- 16  
17 1. dr Dušan Mišić, vanredni profesor, Mikrobiologija sa imunologijom, 2014, Fakultet  
18 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu;  
19  
20 2. dr Maja Marković, vanredni profesor, Bolesti riba, rakova i školjki, 2012, Fakultet  
21 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu;  
22  
23 3. dr Jakov Nišavić, vanredni profesor, Mikrobiologija sa imunologijom, 2014, Fakultet  
24 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu;  
25  
26 4. dr Ružica Ašanin, redovni profesor u penziji, 1994, Mikrobiologija sa imunologijom,  
27 Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu;  
28  
29 5. dr Mirjana Lenhardt, naučni savetnik, Ihtiologija, 2008, Institut za biološka istraživanja  
30 „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu.

31  
32  
33 II PODACI O KANDIDATU:

34 1. Ime, ime jednog roditelja, prezime:

35  
36 Ksenija (Todor) Aksentijević

37  
38 2. Datum rođenja, opština, Republika:

39  
40 12.07.1978. Savski Venac, Beograd, Srbija

41  
42 3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze\*:

43  
44 Magistarsku tezu pod naslovom: „Uticaj stresa na kvalitativni i kvantitativni odnos  
45 polimorfonukleara u krvi babuške (*Carassius Gibelio*, Bloch 1782.)“ odbranila je 01.04.  
46 2010. godine u Beogradu.

47  
48 4. Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka\*:

49  
50 Bolesti riba, rakova i školjki

51  
52 III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:

53  
54 „Ispitivanje rezistencije na antibiotike kod sojeva bakterija izolovanih iz riba poreklom  
55 iz različitih sredina“

56  
57 IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broj strana, poglavlja, slika, šema,  
58 grafikona i sl.):

59 Doktorska disertacija kandidata mr Ksenije Aksentijević napisana je na 130 stranica  
60 kompjuterski kucanog teksta jasnim i razumljivim stilom. Disertacija sadrži 8 uobičajenih

1 poglavlja: Uvod (4 strane), Pregled literature (42 strane), Cilj i zadaci (1 strana), Materijal i  
2 metode (32 strane), Rezultati ispitivanja (20 strana), Diskusija (8 strana), Zaključci (1 strana) i  
3 Spisak literature (22 strane). Poslednje 4 strane sadrže biografiju kandidata i izjave.  
4 Disertacija je dokumentovana sa 4 slike, 15 tabela i 5 grafikona. Disertacija na početku sadrži  
5 kratak sadržaj na srpskom i engleskom jeziku.

6  
7 **V VREDNOVANJE POJEDINIH DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis**  
8 **svakog poglavlja disertacije: uvoda, pregleda literature, cilja i zadataka istraživanja,**  
9 **materijal i metoda, rezultata, diskusije, spiska referenci):**

10  
11 U poglavlju **Uvod**, kandidat sažeto prikazuje suštinu i posledice rezistencije bakterija  
12 na antibiotike koja se smatra jednim od najznačajnijih i najaktuelnijih problema savremene  
13 medicine. Takođe, kandidat se osvrnula i na problem rezistencije na antibiotike kod bakterija  
14 poreklom od riba. Za razliku od drugih vrsta životinja, u ribarstvu se antibiotici najčešće  
15 dodaju u vodu ribnjaka ili akvarijuma i neminovno sve prisutne jedinke dođu u kontakt sa  
16 primenjenim antibiotikom.

17 Za razliku od farmi na kojima se, u ekološkom smislu, nalazi samo materijal  
18 karakterističan za životinje koje borave na toj farmi, u ribnjačke vode (kao i u druge tipove  
19 prirodnih vodotokova) se putem zemljišnog sedimenta i nakon padavina slivaju i izlučevine,  
20 tačnije feces i urin poreklom od svih drugih vrsta životinja, kako sa farmi tako i iz prirode.  
21 Takođe, kruženjem vode u prirodi, do ribnjačkih voda dospevaju i otpadni materijal, kao i  
22 kanalizacioni sadržaj poreklom od ljudi. Sav navedeni materijal, posebno otpadne vode, u  
23 sebi sadrže, kako rezidue antibiotika, tako i bakterije koje su već stekle gene rezistencije na  
24 pojedine antibiotike. Na taj način se u prirodnim i ribnjačkim vodama događa akumulacija  
25 gena rezistencije, multirezistentnih bakterija, kao i rezidua antibiotika koji potiču iz svih drugih  
26 ekoloških niša (gradovi, bolnice, farme, klanice, itd). Dokazano je da se rezidue antibiotika  
27 kao i geni rezistencije na antibiotike akumuliraju čak i u slanoj morskoj, tj. okeanskoj vodi i da,  
28 bez obzira na visok salinitet, te rezidue antibiotika kao i geni rezistencije ostaju dugo aktivni.  
29 Sve nabrojano dovelo je do pojave zabrinjavajuće visoke prevalencije rezistencije na  
30 antibiotike kod bakterija izolovanih od riba i to na one antibiotike koji se koriste isključivo kod  
31 ljudi. Iako su podaci o ovoj tematici još uvek oskudni, ispitivanje rezistencije na antibiotike kod  
32 bakterija nađenih u vodama ribnjaka i u organizmu riba uvedeno je kao obavezan deo  
33 programa monitoringa rezistencije na antibiotike u nekim državama EU.

34 U poglavlju **Pregled literature**, kandidat daje detaljan prikaz svih relevantnih  
35 podataka o tome šta je rezistencija na antibiotike, koji su do sada otkriveni tipovi rezistencije  
36 (stečena i intrinzična) i mehanizmi rezistencije, koji su osnovni uslovi za nastanak rezistencije,  
37 kao i koji su načini njenog širenja između bakterija.

38 Rezistencija bakterija na antibiotike je izrazito kompleksan fenomen koji uključuje  
39 veliki broj faktora kao što su struktura i farmakokinetika antibiotika, karakteristike ekoloških  
40 niša u kojima bakterije dolaze u dodir sa antibioticima, fiziološke osobine raznih vrsta  
41 bakterija, mutacije genoma i pojava gena rezistencije, načini njihovog širenja u prirodi,  
42 biohemijske osnove mehanizama rezistencije, kao i klinički aspekti primene antibiotika. Zbog  
43 toga se rezistencija bakterija na antibiotike istovremeno i detaljno ispituje sa više različitih  
44 stanovišta i to: molekularne biologije, mikrobiologije, farmakologije, hemije, biohemije i  
45 epidemiologije. Naročito su poslednjih godina zastupljena matematička istraživanja problema  
46 rezistencije pomoću kojih se vrše modelovanja pojave multirezistencije kod bakterija na  
47 osnovu velikog broja različitih parametara, a sve u nameri da se predvidi stepen i pravac  
48 širenja ovog problema unutar određenih bioloških sistema.

49 Ispitivanje osetljivosti na antibiotike kod bakterija izolovanih od riba značajno je  
50 kompleksnije u odnosu na ista ispitivanja kod bakterija izolovanih od ljudi i domaćih životinja.  
51 Ribe u svom organizmu nose bakterije koje su intrinzično rezistentne na veliki broj antibiotika  
52 (*Stenotrophomonas*) i stoga nemaju velikog značaja u ispitivanjima većine mehanizama  
53 rezistencije. Nije poznato kakav je i koliki je značaj u širenju gena rezistencije na antibiotike  
54 kod vrsta *Flavobacterium*, *Brevundimonas*, *Plesiomonas*, *Chryseobacterium*, *Psychrobacter*,  
55 *Shewanella*, *Rahnella*, *Raoultella*, i *Chromobacter* koje su sastavni deo mikrobioma kože i  
56 creva riba. Mnoge nabrojane vrste, genetski su srodne i nekada su pripadale istim rodovima,  
57 a to je razlog njihove otežane diferencijacije, naročito primenom klasičnih metoda. Većina  
58 vrsta bakterija iz organizma riba za svoj rast traži niže temperature (oko 22°C-25°C) u odnosu  
59 na preporučene temperature inkubacije u disk difuzionoj i mikrodilucionoj metodi ili u E testu  
60 (35°C-37°C, CLSI, EUCAST), zbog čega nije poznato da li su dobijeni rezultati validni ukoliko

1 se ispitivanja osetljivosti na antibiotike vrše na temperaturama nižim od preporučenih.  
2 EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) je 2011. godine izdao  
3 dokument pod nazivom „*EUCAST Expert rules in antimicrobial susceptibility testing*“ koji služi  
4 kao osnovni vodič za razlikovanje intrinzične rezistencije od stečene rezistencije kod raznih  
5 vrsta bakterija. U tom dokumentu nabrojan je samo mali broj vrsta bakterija koje se mogu naći  
6 kod riba, to su pripadnici rodova *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Yersinia* i *Enterobacter*.  
7 Za *Aeromonas* dati su podaci o intrinzičnoj rezistenciji u dokumentu koji su zajednički izdali  
8 EUCAST i francusko udruženje mikrobiologa. Za gotovo sve druge vrste bakterija koje žive u  
9 organizmu riba, uključujući *Vibrio*, nema podataka o tome na koje antibiotike su intrinzično  
10 rezistentne, a koja se rezistencija može smatrati stečenom, odnosno bitnom za problem  
11 širenja gena rezistencije u prirodi. Stoga je precizna identifikacija vrsta bakterija prisutnih kod  
12 riba od izuzetnog značaja za pravilno tumačenje i interpretaciju rezultata osetljivosti na  
13 antibiotike.

14 Kandidat je posebnu pažnju posvetila plazmidima - mobilnim genetičkim elementima  
15 putem kojih se geni rezistencije najčešće šire između bakterija u prirodnom okruženju. Osim  
16 definicije i kratkog istorijskog pregleda o otkriću plazmida, prikazana je klasifikacija plazmida  
17 po tipu inkompatibilnosti, tj. na osnovu tipa njihove replikacije (*replicon type*), kao i na osnovu  
18 njihove veličine.

19 Pored toga, prikazani su i najnoviji podaci iz naučne literature vezani za otkriće  
20 rezistencije na antibiotike kod sojeva *Pseudomonas*, *Aeromonas* i *Stenotrophomonas* vrsta  
21 izolovanih od riba, s obzirom da su ovo jedine bakterijske vrste prisutne kod riba za koje su u  
22 CLSI i EUCAST dokumentima date interpretativne kategorije osetljivosti na antibiotike.  
23 Posebna pažnja posvećena je podacima o nalazu rezistencije kod nabrojanih vrsta bakterija  
24 na beta-laktamske antibiotike koji su najviše korišćeni antibiotici u kliničkoj humanoj i  
25 veterinarskoj praksi. Prikazani su rezultati dosadašnjih istraživanja u svetu o prisustvu beta-  
26 laktamaza proširenog spektra delovanja (*Extended spectrum beta lactamases* - TEM, SHV,  
27 CTX-M), OXA beta-laktamaza, karbapenemaza (VIM, IMP, NDM, KPC, OXA  
28 karbapenemaza) i AmpC beta-laktamaza (CMY) kod riba, a to su mehanizmi rezistencije koji  
29 su najznačajniji (najopasniji) za zdravlje humane populacije.

30 Takođe je značajna pažnja u ovom poglavlju posvećena rezistenciji na  
31 aminoglikozide kod bakterija izolovanih kako od riba, tako i od drugih vrsta životinja i ljudi,  
32 naročito stečenoj rezistenciji kodiranoj od strane gena za 16S ribozomalne metiltransferaze  
33 (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtH*). Ovo je ekstremno redak oblik rezistencije, a  
34 nabrojani geni se u 100% slučajeva nalaze na konjugativnim plazmidima, pa se prenose  
35 između bakterija zbog čega se nalaz ovog oblika rezistencije smatra alarmantnim, s obzirom  
36 da su aminoglikozidi veoma zastupljeni antibiotici u lečenju ljudi i životinja.

37 U poslednjem delu ovog poglavlja, kandidat je prikazala podatke o akvakulturi kao  
38 relativno mladoj privrednoj grani koja u poslednjih 10 godina doživljava veoma intenzivan  
39 razvoj i koja je iznenada dobila veliki značaj u oblasti pojave i širenja rezistencije na  
40 antibiotike sa životinja na ljude. Dati su podaci i o karakteristikama programa praćenja pojave  
41 i širenja rezistencije na antibiotike kod bakterija u ribnjačkim vodama i u organizmu riba koji  
42 su zakonski obavezni u Danskoj, Švedskoj i Norveškoj-jedinim državama u Evropi koje su  
43 zakonski regulisale praćenje rezistencije na antibiotike kod bakterija izolovanih od riba.

44 U poglavlju **Cilj i zadaci istraživanja**, određeno je da se iz organizma klinički zdravih  
45 riba koje potiču iz različitih sredina (ribnjaci, akvarijumi, riblje pijace) izvrši izolacija bakterija  
46 koje su sastavni deo mikrobioma kože, škrge i creva riba i da se zatim ispita osetljivost ovih  
47 bakterija na određeni broj antibiotika koji se koriste u veterinarskoj i humanoj medicinskoj  
48 praksi. Takođe, cilj je bio da se primenom određenih klasičnih i savremenih molekularnih  
49 metoda u mikrobiološkim istraživanjima utvrdi prisustvo gena rezistencije, njihova lokalizacija  
50 (na hromozomu ili na mobilnim genetičkim elementima). Za gene za koje se utvrdi da su  
51 lokalizovani na plazmidima, planirano je istraživanje konjugabilnosti (prenosivosti) tih  
52 plazmida.

53 Kako bi se ostvarili postavljeni ciljevi, određeni su i zadaci istraživanja koji su obuhvatili:

- 54 • Izolaciju sojeva bakterija koji su sastavni deo mikrobioma škrge, kože i creva  
55 akvarijumskih riba (gupi, *Poecilia reticulata*), ribnjačkih riba i riba sa ribljih pijaca  
56 (šaran, *Cyprinus carpio*).
- 57 • Tačnu identifikaciju izolovanih sojeva konvencionalnim mikrobiološkim metodama,  
58 poluautomatskim identifikacionim sistemima, molekularnim metodama (PCR,  
59 sekvenciranje gena za 16S rRNK) kao i fizičko-hemijskim savremenim metodama  
60 (MALDI-TOF).

- 1 • Ispitivanje osetljivosti izolovanih sojeva bakterija na određeni broj antibiotika.
- 2 • Ispitivanje prisustva različitih gena rezistencije primenom molekularnih metoda
- 3 (PCR).
- 4 • Izolacija plazmida iz sojeva bakterija kod kojih su nađeni geni rezistenije i određivanje
- 5 veličine plazmida.
- 6 • Konjugacija plazmida *in vitro* u cilju utvrđivanja prenosivosti detektovanih gena
- 7 rezistencije.
- 8 • Transformacija *in vitro* u kompetentne ćelije u cilju utvrđivanja prenosivosti
- 9 detektovanih gena rezistencije.
- 10 • Analiza dobijenih rezultata

11  
12 Poglavlje **Materijal i metode** kandidat je podelila na podnaslove prema oblastima  
13 koje je istraživala. Svi sojevi bakterija koji su ispitivani su izolovani iz uzoraka poreklom od  
14 šarana (*Cyprinus carpio*) sa više različitih šaranskih ribnjaka koji se vodom snabdevaju iz tri  
15 različita vodena toka (reke Tisa, Sava i Dunav) na teritoriji Vojvodine, kao i od šarana iz  
16 ribarnica na beogradskim pijacama. Sa svakog ribnjaka uzimani su uzorci riba različitih  
17 starosnih kategorija i iz različitih objekata. Uzorkovanje materijala za ispitivanje vršeno je od  
18 zdravih konzumnih, živih riba. RIBE nisu bile žrtvovane ni povređivane. Uzimani su brisevi  
19 kože, škrge i rektalni brisevi. Uzorkovanje je vršeno dvokratno u vremenskom periodu  
20 proleće/leto i jesen/zima 2011/2012. godine. Ukupno je uzorkovano 240 riba. Paralelno sa  
21 ovim uzorkovanjem, uzimani su i uzorci akvarijumskih ribica (samo vrsta gupi, *Poecilia*  
22 *reticulata*), ukupno 10 iz nekoliko različitih akvarističkih prodavnica koje su nasumično  
23 odabrane.

24 Za izolaciju sojeva bakterija primenjene su konvencionalne mikrobiološke metode.  
25 Zasejavanje briseva i organa vršeno je na UTI agaru (*Urogenital tract infections chromogenic*  
26 *agar*, HI Media, India) odakle su čiste kulture presejavane i održavane na Columbia blood  
27 agaru sa dodatkom 5% ovčije krvi (bioMerieux, France). Podloge su inkubirane na  
28 temperaturi od 27°C. Svi izolovani sojevi su ispitivani testom oksidaze primenom oksidaza  
29 reagensa (Becton Dickinson, USA). Preliminarna identifikacija izolovanih sojeva vršena je  
30 primenom API 20 NE stripa (bioMerieux, Francuska).

31 Precizna identifikacija sojeva *Pseudomonas* i *Stenotrophomonas* vrsta vršena je  
32 primenom metode lančane reakcije polimeraze (PCR). Ekstrakcija DNK iz ispitivanih sojeva  
33 obavljena je prema protokolu referentne laboratorije EU za ispitivanje osetljivosti bakterija na  
34 antibiotike (metoda kuvanja na 100°C). U cilju preciznog određivanja pripadnosti rodu  
35 *Pseudomonas* korišćena je metoda PCR koju je prethodno opisao Spilker i saradnici 2004.  
36 Za precizno određivanje pripadnosti ispitivanih sojeva rodu *Stenotrophomonas* korišćena je  
37 metoda koju su opisali Gallo i saradnici, 2013. godine. Sekvence primenjenih prajmera i  
38 veličine PCR produkata prikazane su detaljno u doktorskoj disertaciji. Kao kontrole su  
39 korišćeni sojevi *P.aeruginosa* ATCC 27853 i *S. maltophilia* ATCC 13637 (Microbiologics,  
40 USA). Sojevi koji nisu mogli biti precizno identifikovani, dalje su analizirani sekvenciranjem  
41 gena za 16S rRNK. Za potrebe ovog dela istraživanja, genomska DNK izolovanih sojeva je  
42 ekstrahovana primenom Kapa Express Extract Kit, Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA i  
43 16S ribozomalni RNK (16S rRNK) geni su amplifikovani pomoću lančane reakcije polimeraze  
44 (PCR) korišćenjem univerzalnih bakterijskih prajmera 27f i 1492r (Invitrogen) prema protokolu  
45 koji je opisao Lane DJ, 1991.

46 Određen broj izolovanih sojeva dodatno je analiziran primenom metode masene  
47 spektrometrije (MALDI-TOF), na aparatima Vitek MS (bioMérieux Industry, Francuska) i  
48 MALDI TOF/TOF 4800 Plus (AB SCIEX, USA). Za dalje ispitivanje su odabirane samo Gram-  
49 negativne vrste zbog ispitivanja njihove osetljivosti na antibiotike koji su značajni u humanoj, a  
50 delom i u veterinarskoj kliničkoj praksi, a to su penicilini sa inhibitorima beta-laktamaza  
51 (amoksicilin sa klavulanskom kiselinom), karbapenemi (imipenem, meropenem),  
52 aminoglikozidi (gentamicin, tobramicin, amikacin), ureidopenicilini bez i sa inhibitorima beta-  
53 laktamaza (piperacilin, piperacilin+tazobaktam) i cefalosporini III i IV generacije (ceftazidim,  
54 cefepim). Osim ovih, korišćeni su i tetraciklin, ciprofloksacin, hloramfenikol,  
55 sulfametoksazol+trimetoprim, fosfomicin i polimiksin B. Ispitivana je i osetljivost na kolistin ali  
56 samo primenom E testa. Ispitivanje osetljivosti na antibiotike vršeno je primenom disk-  
57 difuzione metode i E testa. U tom cilju primenjeni su antibiogram diskovi proizvođača Becton  
58 Dickinson, USA i E test trake istih antibiotika proizvođača bioMerieux, Francuska. Procedura  
59 izvođenja, priprema suspenzije ispitivanih sojeva, odabir podloga, načini inokulacije, režimi

1 inkubacije, očitavanje i interpretacija rezultata vršeni su na osnovu preporuka CLSI i EUCAST  
2 (2012, 2013, 2014).

3 Za postavljanje sumnje na prisustvo KPC karbapenemaza, metalo beta-laktamaza  
4 (M $\beta$ SL), AmpC i OXA-48 beta-laktamaza kod ispitivanih sojeva bakterija, korišćeni su  
5 specijalno dizajnirana 3 testa proizvođača Rosco Diagnostica, Danska, za fenotipsko  
6 ispoljavanje rezistencije na karbapeneme i određivanje jednog od mogućih mehanizama. U tu  
7 svrhu primenjeni su KPC/M $\beta$ SL i OXA-48 potvrdni fenotipski test za otkrivanje karbapenemaza  
8 KPC/ M $\beta$ SL i OXA-48 kod pripadnika familije *Enterobacteriaceae* koji se sastoji od 5 tableta:  
9 meropenem 10  $\mu$ g, meropenem 10  $\mu$ g + fenilborna kiselina (KPC i AmpC inhibitor),  
10 meropenem 10  $\mu$ g + kloksacilin (AmpC inhibitor), meropenem 10  $\mu$ g + dipikolinska kiselina  
11 (M $\beta$ SL inhibitor) i temocilin 30  $\mu$ g (OXA-48 inhibitor). Upotrebljen je i KPC/ M $\beta$ SL potvrdni  
12 fenotipski test za otkrivanje karbapenemaza KPC/ M $\beta$ SL kod *P.aeruginosa*/*Acinetobacter* koji  
13 se sastoji se od 5 tableta: imipenem 10  $\mu$ g, imipenem 10  $\mu$ g + fenilborna kiselina (KPC i AmpC  
14 inhibitor), imipenem 10  $\mu$ g + kloksacilin (AmpC inhibitor), imipenem 10  $\mu$ g + dipikolinska  
15 kiselina (M $\beta$ SL inhibitor) i imipenem 10  $\mu$ g sa EDTA. potvrdni Takođe je korišćen i fenotipski  
16 test za otkrivanje AmpC laktamaza koji se sastoji od 4 tablete: cefotaksim 30  $\mu$ g, cefotaksim  
17 sa kloksacilinom 30  $\mu$ g, ceftazidim 30  $\mu$ g, ceftazidim sa kloksacilinom 30  $\mu$ g.

18 Svi sojevi koji su u disk difuzionoj metodi bili rezistentni na gentamicin i amikacin, bili  
19 su zasejavani na podlogu sa 200 mg/l gentamicina i 200 mg/l amikacina (Sigma Aldrich, USA)  
20 radi provere nivoa rezistencije (tražena je takozvana „rezistencija visokog nivoa“). Smatra se  
21 da su sojevi koji porastu na navedenoj podlozi visoko rezistentni na aminoglikozide sa  
22 vrednostima MIK (minimalna inhibitorna koncentracija) > 200  $\mu$ g/mL, što ukazuje na  
23 mogućnost da u genomu nose gene za 16S rRNK metiltransferaze (veoma redak i značajan  
24 oblik rezistencije).

25 Primenom metode lančane reakcije polimeraze (PCR) kod sojeva koji su u prethodno  
26 navedenim metodama pokazali rezistenciju na antibiotike, ispitivano je prisustvo gena  
27 rezistencije na ukupnoj genomskoj DNK, a kod sojeva kod kojih su nađeni i plazmidi  
28 naknadno je ponovljeno isto ispitivanje i na plazmidskoj DNK. U zavisnosti od oblika ispoljene  
29 fenotipske rezistencije, traženi su geni za 16S rRNK metiltransferaze (*armA*, *rmtA*, *rmtB*,  
30 *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*), ESBL (TEM, SHV CTX-M-1, CTX-M-9), OXA-1 i OXA-9 beta-laktamaze,  
31 karbapenemaze (KPC, OXA-23, OXA-24, OXA-40, OXA-58), u koje spadaju i metalo-beta-  
32 laktamaze (NDM, VIM, IMP, SPM, GIM), AmpC beta-laktamaze (AmpC grupni kao i  
33 pojedinačni među kojima su MOXM, CITM, ACCM, EBCM, FOXM, DHAM). Primenjeni su  
34 različiti protokoli prema citiranim referencama koje su sve detaljno nabrojane u odgovarajućim  
35 poglavljima doktorske disertacije kandidata. Ukupno su za sva ispitivanja u ovom delu  
36 disertacije primenom reakcije PCR korišćena 58 prajmera, a svi su bili poručeni od  
37 proizvođača Invitrogen (Termo Fisher Scientific, USA) i Metabion (Nemačka). Kao pozitivne  
38 kontrole za TEM, SHV, OXA i CTX-M beta laktamaze pozitivne DNK kontrole su dobijene  
39 ljubaznošću kolega sa Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad“ iz Novog Sada. Za sve  
40 nabrojane tipove AmpC beta-laktamaza korišćene su pozitivne DNK kontrole dobijene  
41 ljubaznošću kolega sa Zavoda za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskog fakulteta  
42 Sveučilišta u Zagrebu, osim za KPC i NDM gene za koje su kao pozitivne kontrole  
43 upotrebljene *Klebsiella pneumoniae* BAA 2146 ( $bla_{NDM}^+/bla_{KPC}^-$ ), *Escherichia coli* BAA 2469  
44 ( $bla_{NDM}^+/bla_{KPC}^-$ ) i *Klebsiella pneumoniae* BAA 2344 ( $bla_{KPC}^+/bla_{NDM}^-$ ) (Microbiologics, USA).  
45 Ispitivanje prisustva 16S rRNK metiltransferaza vršeno je kod onih sojeva bakterija koji su u  
46 preliminarnim ispitivanjima izrasli na selektivnoj podlozi (Miler Hinton agar, Becton Dickinson,  
47 USA) sa dodatkom 200 mg/l gentamicina (Sigma Aldrich USA) i 200 mg/L amikacina (Sigma  
48 Aldrich, USA). Jedan određen broj sojeva poreklom od gupi akvarijumskih ribica kod kojih je  
49 zabeležena rezistencija na aminoglikozide, poslat je na kompletnu molekularnu analizu u  
50 Laboratoriju za bakteriologiju pri Departmanu za mikrobiologiju Veterinarskog fakulteta u  
51 Madridu (*Universidad Complutense de Madrid*, Španija). Za ispitivanje preostalih sojeva  
52 rezistentnih na aminoglikozide, korišćene su pozitivne DNK kontrole sa genima *rmtA*, *rmtB*,  
53 *rmtC*, *rmtD* i *rmtE* dobijene ljubaznošću kolega sa Veterinarskog Fakulteta u Madridu,  
54 Departmana za mikrobiologiju. Pozitivna DNK kontrola sa genom *armA* dobijena je  
55 ljubaznošću kolega iz Laboratorije za infektivne bolesti pri Departmanu za internu medicinu  
56 Medicinskog fakulteta Univerziteta u Atini, Grčka. Detalji o procedurama izvođenja svih PCR  
57 reakcija, režimi rada termalnog sajklera, procedure vizuelizacija PCR produkata i izvođenja  
58 horizontalne elektroforeze u agaroznom gelu uz primenu specifičnih DNK markera sa  
59 naznakom proizvođača od kojih su nabavljeni svi dijagnostikumi, detaljno su opisani u  
60 doktorskoj disertaciji.

1 Za izolaciju plazmida iz sojeva *Pseudomonas* i *Stenotrophomonas* vrsta korišćena je  
2 metoda po Weatcroft-u i Williams-u koja je dizajnirana za izolaciju džinovskih plazmida  
3 (plazmida veći od 100 kB) koji su prisutni u nabrojanim vrstama bakterija. Kao pozitivna  
4 kontrola za određivanje veličine izolovanih plazmida korišćen je plazmid veličine 255 kb  
5 izolovan iz soja *Agrobacterium rhizogenes* A4M70 GUS. Navedeni soj je primenom  
6 genetičkog inženjeringa specifično dizajniran tako da, ako se kultiviše na optimalnoj  
7 temperaturi uvek proizvodi plazmid navedene veličine. Soj *Agrobacterium rhizogenes* A4M70  
8 GUS je dobijen ljubaznošću kolega sa odseka za fiziologiju i patologiju biljaka u okviru  
9 Instituta za Biološka Istraživanja „Siniša Stanković“, Beograd.

10 Za ispitivanje lokalizacije gena rezistencije na mobilnim genetičkim elementima,  
11 korišćene su metode transformacije i konjugacije *in vitro*. Za transformaciju *in vitro* upotrebljen  
12 je TransformAid Bacterial Transformation Kit (Fermentas). Korišćene su kompetentne ćelije  
13 *E.coli* DH5  $\alpha$  (Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd). Za  
14 ispitivanje konjugabilnosti izolovanih plazmida primenjena je standardna procedura  
15 konjugacije *in vitro*, a kao recipijentni soj korišćena je *E. coli* NCTC 10538 (Microbiologics,  
16 USA). Za proveru uspešnosti *in vitro* konjugacije i transformacije i transfera gena rezistencije  
17 na transkonjugante i transformante upotrebljen je UTI agar sa dodatkom čistih, aktivnih  
18 supstancija piperacilina 16  $\mu$ g/ml; imipenema 8  $\mu$ g/ml; ceftazidima 32  $\mu$ g/ml, gentamicina 256  
19  $\mu$ g/ml i ciprofloksacina 32  $\mu$ g/ml (Sigma Aldrich, USA).

20 U poglavlju **Rezultati** kandidat je prvo prikazala rezultate izolacije i identifikacije  
21 ispitivanih sojeva bakterija. Od svih uzoraka riba, izolovano je više od 250 sojeva Gram  
22 negativnih bakterija od kojih je za dalja ispitivanje izabrano 140 sojeva koji pripadaju vrstama  
23 značajnim za ljude i životinje u kliničkoj praksi i za koje su u dokumentima CLSI i EUCAST  
24 date precizne granične vrednosti zona inhibicije i vrednosti MIK, kao i interpretativne  
25 kategorije. Takođe, data je i lista antibiotika na koje su ove vrste intrinzično rezistentne, tako  
26 da je bilo moguće jasno protumačiti i interpretirati dobijene rezultate ispitivanja osetljivosti  
27 ovih sojeva na antibiotike.

28 Među izolovanim sojevima bakterija bilo je onih koji nisu mogli biti identifikovani ni  
29 jednom od primenjenih metoda, uključujući molekularnu genotipizaciju i MALDI-TOF, ti sojevi  
30 takođe nisu ušli u dalja ispitivanja.

31 Kod ispitivanja identifikacije sojeva izolovanih od riba, prikazani su rezultati koji su  
32 dobijeni svim primenjenim metodama: klasični testovi, API 20 NE, standardni PCR,  
33 sekvenciranje gena za 16S rRNK i MALDI-TOF. Od 140 sojeva, 48 (28.4%) sojeva je  
34 pripadalo rodu *Pseudomonas* uključujući sledeće vrste: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P.*  
35 *putida*, *P. veroni*, *P. geniculata*, *P. oleovorans*, *P. stutzeri*, *P. mandeli*, *P. libanensis*, *P.*  
36 *hibiscicola* i *Pseudomonas* sp. Ukupno 18 (10,7%) sojeva je identifikovano kao  
37 *Stenotrophomonas maltophilia*. Rodu *Aeromonas* pripadala su 22 soja (13%), uključujući  
38 vrste: *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. cavia* i *A. salmonicida* spp. *salmonicida*. Rodu *Acinetobacter*  
39 pripadalo je 6 (3,6%) sojeva uključujući vrste *A. lwoffii* i *A. baumannii* complex. Ukupno 40  
40 (23,7%) sojeva pripadalo je familiji *Enterobacteriaceae*. Od toga 25 (62,5%) sojeva pripadalo  
41 je rodu *Enterobacter* sa vrstama *E. amnigenus*, *E. cloacae*, *E. asburiae* i *E. gergoviae*. Rodu  
42 *Citrobacter* pripadalo je 7 (17,5%) sojeva sa vrstama *C. youngae*, *C. freundii*, *C. braakii* i *C.*  
43 *koseri*. Po 2 (5%) soja pripadalo je vrstama *Hafnia alvei* i *Leclercia adecarboxylata*, a po  
44 jedan soj (2,5%) vrstama *Serratia fonticola*, *Erwinia rhapontici*, *Rahnella aquatilis* i *Raoutella*  
45 *amnigenus*.

46 U dalja ispitivanja ušlo je još 6 sojeva bakterija koji nijednom od primenjenih metoda  
47 identifikacije uključujući PCR, sekvenciranje gena za 16S ribozomalne RNK, kao i MALDI-  
48 TOF nisu mogli biti jasno diferencirani da li pripadaju rodu *Pseudomonas* ili  
49 *Stenotrophomonas*. Tačnije, rezultati svih primenjenih metoda pokazivali su da sporni sojevi  
50 istovremeno jesu pripadnici oba roda. Kako je kod ovih sojeva nađena zabrinjavajuća  
51 rezistencija na veliki broj antibiotika, a posedovali su i plazmide, oni su uključeni u rezultate  
52 istraživanja.

53 Na osnovu rezultata ispitivanja osetljivosti disk difuzionom metodom, od svih  
54 ispitivanih sojeva iz roda *Pseudomonas*, 11 (22,9%) sojeva je bilo osetljivo na sve ispitivane  
55 antipseudomonasne antibiotike. Ostali sojevi bili su rezistentni na najmanje 1, a najviše na 9  
56 antibiotika. Multirezistentnih sojeva iz roda *Pseudomonas* (rezistentnih na 3 ili više antibiotika)  
57 bilo je ukupno 19 (39.6%). Kod tri soja (6,25 %) *Pseudomonas aeruginosa* utvrđena je  
58 rezistencija na 9 antibiotika. Najveće prisustvo rezistencije od 16.7 % otkriveno je na  
59 ceftazidim i fosfomicin – antibiotike koji se isključivo koriste u humanoj medicinskoj praksi, a  
60 najmanja rezistencija od 2,1% utvrđena je na meropenem. Nije nađena rezistencija kod

1 ispitivanih sojeva iz roda *Pseudomonas* na polimiksin B što je sa stanovišta veterinarske  
2 medicine značajan nalaz. Ali je zato kod sojeva iz roda *Pseudomonas* izolovanih od riba  
3 nađena rezistencija na karbapeneme koji se uopšte i ne upotrebljavaju u veterinarskoj  
4 medicini već isključivo služe za lečenje ljudi od najtežih bakterijskih infekcija. Relativno  
5 zabrinjavajuća rezistencija na aminoglikozide i fluorohinolone nađena je kod 6,25% i 16,7%  
6 sojeva iz roda *Pseudomonas*.

7 Osetljivost od 100% svih 18 ispitivanih sojeva *Stenotrophomonas maltophilia* na  
8 sulfametoksazol+trimetoprim predstavlja najvažniji nalaz osetljivosti, jer se radi o leku prvog i  
9 jedinog izbora u lečenju infekcija ljudi i životinja izazvanih ovom bakterijom.

10 Od 22 soja *Aeromonas* vrsta izolovanih od šarana, 19 sojeva (86,4%) je bilo osetljivo  
11 na sve antibiotike. Kod jednog ispitanog soja poreklom od šarana nađena je rezistencija na  
12 karbapeneme i piperacilin, antibiotike koji su registrovani samo za upotrebu kod ljudi. Kod  
13 jednog soja *Aeromonas hydrophila* koji je izolovan iz akvarijumske ribice gupi, utvrđena je  
14 rezistencija na sve ispitivane antibiotike (ukupno na 16 antibiotika), uključujući fluorohinolone,  
15 karbapeneme, ureidopeniciline, cefalosporine III i IV generacije, hloramfenikol, tetraciklin,  
16 sulfametoksazol+trimetoprim i aminoglikozide.

17 Od riba je ukupno izolovano i ispitano 6 sojeva koji su pripadali rodu *Acinetobacter*.  
18 Od tog broja 5 sojeva bilo je osetljivo na sve antibiotike, a jedan soj bio je rezistentan na  
19 piperacilin.

20 Ispitano je ukupno 40 sojeva koji pripadaju familiji *Enterobacteriaceae*. Metodom disk  
21 difuzije ustanovljeno je da je 38 sojeva (95%) bilo osetljivo na sve ispitane antibiotike. Kod  
22 jednog soja *Enterobacter amnigenus* utvrđena je rezistencija na nitrofurantoin, piperacilin i  
23 aztreonam.

24 Za poslednjih 6 sojeva nije bilo moguće postaviti sumnju o njihovoj pripadnosti vrsti/  
25 rodu ni posle primene visoko specifičnih metoda kao što je već navedeno. Tačnije, ovi sojevi  
26 su pripadali ili rodu *Pseudomonas* ili rodu *Stenotrophomonas*, ali jasna diferencijacija nije bila  
27 moguća. Kategoriji multirezistentnih sojeva sa otpornošću na 5, 8 i 9 antibiotika pripadalo je 5  
28 od ovih 6 sojeva. Multirezistentnih sojeva (rezistentnih na 3 ili više antibiotika) bilo je ukupno  
29 83,3 %. Najveća prevalencija rezistencije otkrivena je na ceftazidim, piperacilin, imipenem,  
30 gentamicin i amikacin i iznosila je 83,3%, a najmanja od 16,7% na tobramicin i polimiksin B.

31 Posmatrano na ukupan broj ispitanih sojeva u ovom istraživanju, bez obzira na rod i  
32 vrstu bakterija, ukupno je nađeno 55% sojeva koji su bili osetljivi na sve antibiotike, kod  
33 22,8% sojeva nađena je rezistencija na 3 do 16 antibiotika uključujući i antibiotike koji se  
34 koriste isključivo kod ljudi (karbapenemi, ureidopenicilini, cefalosporini III i IV generacije).  
35 Ukupno 22,2% sojeva bilo je rezistentno na 1 do 2 antibiotika, mada je i među tim sojevima  
36 bilo onih koji su bili rezistentni na antibiotike registrovane samo za upotrebu kod ljudi  
37 (ceftazidim, piperacilin).

38 Rezultati ispitivanja rezistencije bakterija izolovanih od riba na određene antibiotike  
39 koji su od velikog značaja za humanu medicinsku praksu na koje je već utvrđena rezistencija  
40 disk-difuzionim testom, potvrđivani su primenom E testa. Kod svih sojeva kod kojih je  
41 primenom disk difuzione metode nađena rezistencija na imipenem, ceftazidim, piperacilin,  
42 piperacilin sa tazobaktamom, ciprofloksacin, hloramfenikol i fosfomicin, primenom E testa je  
43 potvrđena rezistencija tih sojeva na navedene antibiotike sa vrednostima MIK za: imipenem  
44 12 do 32 µg/mL, ceftazidim 24 do > 256 µg/mL, piperacilin 16 do >256 µg/mL, piperacilin sa  
45 tazobaktamom 48 do >256 µg/mL, ciprofloksacin 4 do >32 µg/mL, kolistin 4 µg/mL, fosfomicin  
46 >1024 µg/mL i hloramfenikol od 6 do >32 µg/mL.

47 Sojevi kod kojih je E testom potvrđena rezistencija na beta-laktamske antibiotike  
48 kategorisani su kao sumnjivi na prisustvo beta-laktamaza proširenog spektra,  
49 karbapenemaza, metalo-beta laktamaza i AmpC beta-laktamaza, odnosno na gene  
50 rezistencije koji su u najvećem procentu prisutni kod superbakterija izolovanih od ljudi.  
51 Osetljivost na kolistin nije ispitivana u disk difuzionom testu zbog nepouzdanosti metode, već  
52 samo primenom E testa, što je u saglasnostima sa preporukama EUCAST-a. Na osnovu  
53 dobijenih rezultata primenom E testa, kod 3 soja iz roda *Pseudomonas* izolovanih od šarana  
54 nađena je rezistencija na kolistin sa dobijenim vrednostima MIK 4 µg/mL. Kod svih ostalih  
55 ispitivanih sojeva vrednosti MIK kolistina iznosile su <1 µg/mL.

56 Na osnovu rezultata dobijenih primenom KPC/MBL,OXA-48 i AmpC fenotipskih  
57 sistema, 3 soja *Pseudomonas* vrsta bila su sumnjiva prisustvo MBL mehanzima, 9 sojeva  
58 *Pseudomonas* vrsta na AmpC, 10 sojeva *Pseudomonas* na prisustvo OXA-48, dok nijedan soj  
59 nije pokazao fenotipsku sumnju na KPC. Ostale ispitivane bakterije na osnovu rezultata  
60 dobijenih primenom ovog sistema nisu bile sumnjive ni na jedan od nabrojanih mehanizama.

1 Tri soja *Pseudomonas aeruginosa* izolovana od šarana i jedan soj *Aeromonas hydrophila*  
2 izolovan od akvarijumske ribice (gupi) rasla su na selektivnoj podlozi sa 200 mg/l gentamicina  
3 i 200 mg/l amikacina. To znači da je vrednost MIK ovih antibiotika za nabrojane sojeve  
4 iznosila >200 µg/mL i ti sojevi su bili sumnjivi na prisustvo 16S rRNK metiltransferaza.

5 U delu ispitivanja iz oblasti detekcije gena rezistencije primenom metode PCR,  
6 dobijeni su sledeći rezultati: Kod tri soja *P.aeruginosa* koji su bili sumnjivi na prisustvo  
7 mehanizma 16S rRNK metiltransferaza, primenom metode PCR nisu nađeni geni *armA*, *rmtA*,  
8 *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE* koji kodiraju taj mehanizam. Kod soja *A. hydrophila* izolovanom iz  
9 akvarijumske ribice gupi potvrđen je navedeni mehanizam rezistencije nalazom gena *rmtB*  
10 koji je bio lokalizovan na transpozonu Tn1548 smeštenom na konjugabilnom plazmidu koji je  
11 po tipu replikona bio kategorisan u grupu IncL/M. Nalaz ovog izrazito retkog i u humanoj  
12 medicini veoma značajnog i prenosivog mehanizma rezistencije kod bakterije izolovane od  
13 ribe nije do sada prijavljen nigde u svetu. Prenosivost detektovanog (stečenog) gena  
14 rezistencije dokazana je konjugacijom *in vitro* jer su transkonjuganti *E. coli* NCTC 10538 bili  
15 rezistentni na gentamicin i amikacin. Isti mehanizam je dokazan i transformacijom *in vitro* jer su  
16 transformanti DH5α bili rezistentni na gentamicin i amikacin.

17 Kod sojeva *Pseudomonas* koji su bili rezistentni na karbapeneme, ureidopeniciline sa  
18 i bez inhibitora beta-laktamaza, kao i na cefalosporine III i IV generacije, nisu nađeni geni za,  
19 karbapenemaze, MBL, ESBL, OXA i AmpC beta-laktamaze (KPC, OXA-23, OXA-24, OXA-40,  
20 OXA-58, VIM, IMP, SPM, GIM, NDM, TEM, SHV, CTX-M-1, CTX-M-9, OXA-1, OXA-9, AmpC  
21 grupni kao i pojedinačni-MOXM, CITM, ACCM, EBCM, FOXM, DHAM).

22 U delu ispitivanja vezanom za prisustvo plazmida kod ispitivanih sojeva iz roda  
23 *Pseudomonas* koji su ispoljili značajnu rezistenciju, džinovski plazmidi veličine >255 kbp  
24 detektovani su kod 16 sojeva roda *Pseudomonas*, dok kod 10 multirezistentnih sojeva nije  
25 detektovano prisustvo plazmida.

26 Ni kod jednog od ispitivanih sojeva *Stenotrophomonas maltophilia* nisu nađeni  
27 plazmidi. Kod 6 spornih, nediferenciranih sojeva, nađeni su plazmidi veličine >256 kbp.

28 S obzirom na to da kod sojeva iz roda *Pseudomonas* koji su bili rezistentni na  
29 karbapeneme, ureidopeniciline sa i bez inhibitora beta laktamaza, kao i na cefalosporine III i  
30 IV generacije nisu utvrđeni geni rezistencije, primenom transformacije i konjugacije *in vitro*  
31 pokušano je dokazivanje moguće lokalizacije gena na mobilnim genetičkim elementima za  
32 nepoznate mehanizme rezistencije na ispitivane klase antibiotika. Stoga je obavljena  
33 transformacija *in vitro* sa ekstrahovanim plazmidima, ali nakon transformacije, transformanti  
34 DH5α nisu postali rezistentni na ispitivane karbapeneme, ureidopeniciline i cefalosporine.  
35 Slično tome, nakon konjugacije *in vitro* sojeva roda *Pseudomonas* kod kojih su nađeni  
36 plazmidi sa sojem *E. coli* NCTC 10538, transkonjuganti nisu postali rezistentni na ispitivane  
37 antibiotike.

38 U poglavlju **Diskusija** kandidat je dala kritički osvrt na dobijene rezultate poredeći ih  
39 sa rezultatima ispitivanja autora čije je reference koristila tokom izrade doktorske disertacije.

## 40 **VI ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA (navesti zaključke koji su prikazani u doktorskoj** 41 **disertaciji):**

- 42 1. Zbog izražene intrinzične rezistencije na veliki broj različitih antibiotika kod bakterija iz  
43 rodova *Pseudomonas* i *Stenotrophomonas*, u cilju pravilnog izbora antibiotika i  
44 adekvatne interpretacije rezultata ispitivanja njihove osetljivosti, neophodna je  
45 precizna identifikacija ovih vrsta koja nije uvek moguća primenom konvencionalnih  
46 metoda.
- 47 2. Za identifikaciju određenih vrsta bakterija izolovanih od riba ni kombinovana primena  
48 savremenih molekularnih metoda kao i MALDI-TOF MS nije dala jasne rezultate s  
49 obzirom da u bazama podataka još nema deponovanih svih genskih i proteinskih  
50 sekvenci poreklom od svih vrsta bakterija koje su sastavni deo mikrobioma riba.
- 51 3. Zbog nedostatka podataka o stečenoj i intrinzičnoj rezistenciji, kao i o graničnim  
52 vrednostima zona inhibicije, vrednostima MIK i interpretativnim kategorijama,  
53 ispitivanje osetljivosti na antibiotike još uvek nije moguće kod većine vrsta bakterija  
54 izolovanih od riba.
- 55 4. Ispitivanje fenotipske rezistencije na beta-laktamske antibiotike (ureidopeniciline,  
56 cefalosporine III i IV generacije i karbapeneme) nije dovoljno pouzdano za primenu  
57 kod bakterija izolovanih od riba, jer kod sojeva koji su ispoljili ovu rezistenciju nije  
58  
59



- 1 utvrđeno prisustvo nijednog gena koji kodira rezistenciju, odnosno gena koji bi  
2 potvrdio mehanizam rezistencije.
- 3 5. Na izolovanim plazmidima nije utvrđeno prisustvo gena koji kodiraju rezistenciju na  
4 beta-laktamske antibiotike, pa nije dokazana prenosivost ove rezistencije.
- 5 6. Kod soja *A. hydrophila* izolovanog iz gupi akvarijumske ribice primenom metode PCR  
6 potvrđen je mehanizam rezistencije na aminoglikozide - 16S rRNK metiltransferaza  
7 detekcijom gena *rmtB* lokalizovanog na transpozonu Tn1548 koji je smešten na  
8 konjugabilnom plazmidu koji je po tipu replikona bio kategorisan u grupu IncL/M. Ovo  
9 je u oblasti akvakulture prvi nalaz kod nas i u svetu ovog izrazito retkog i u humanoj  
10 medicini veoma značajnog i prenosivog mehanizma rezistencije.
- 11 7. Iako nije dokazano prisustvo gena rezistencije na beta laktamske antibiotike, nalaz  
12 rezistencije na 3 do 16 antibiotika uključujući i antibiotike koji se koriste isključivo kod  
13 ljudi (karbapenemi, ureidopenicilini, cefalosporini III i IV generacije) kod 22,8% sojeva  
14 iz roda *Pseudomonas*, značajan je sa aspekta javnog zdravlja, jer je *Pseudomonas*  
15 oportunistički patogen i potencijalno je opasan za ljude i životinje.
- 16 8. Izuzetno je značajan nalaz rezistencije kod 3 soja iz roda *Pseudomonas* na kolistin  
17 koji je kategorisan kao antibiotik poslednje linije odbrane u lečenju ljudi od infekcija  
18 izazvanih multirezistentnim i panrezistentnim superbakterijama.

19  
20 U poglavlju **Spisak literature** kandidat je navela 227 referenci koje je koristila tokom izrade  
21 svoje doktorske disertacije.

22  
23 **VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li**  
24 **su dobijeni rezultati u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li**  
25 **zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):**

26  
27 Rezultati istraživanja do kojih je kandidat došla tokom izrade doktorske disertacije u  
28 potpunosti su u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja. Dobijeni rezultati su  
29 prikazani tabelarno, grafički i uz pomoć slika, a njihov opis je dat logičnim redosledom,  
30 pregledno, jasnim i razumljivim stilom. Izvedeni zaključci su jasno formulisani i u skladu su sa  
31 postavljenim ciljem i dobijenim rezultatima istraživanja.

32  
33 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**

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

35  
36 Doktorska disertacija kandidata mr Ksenije Aksentijević pod naslovom „**Ispitivanje**  
37 **rezistencije na antibiotike kod sojeva bakterija izolovanih iz riba poreklom iz različitih**  
38 **sredina**“ napisana je u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme.

39  
40 **2. Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?**

41  
42 Doktorska disertacija kandidata mr Ksenije Aksentijević pod naslovom, „ **Ispitivanje**  
43 **rezistencije na antibiotike kod sojeva bakterija izolovanih iz riba poreklom iz različitih**  
44 **sredina**“ sadrži sve bitne elemente u skladu sa zahtevima za završenu doktorsku disertaciju.

45  
46 **3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?**

47  
48 Zbog nedostatka zvaničnih standarda, preporuka, procedura, uputstava o načinu očitavanja i  
49 interpretaciji rezultata za bakterije izolovane od riba, ispitivanje ove problematike je izrazito  
50 kompleksno, a podaci o osetljivosti na antibiotike kod bakterija poreklom od riba, koji su izneti  
51 u naučnim publikacijama, često su se pokazali nerelevantnim. Pored toga, broj publikacija o  
52 ovoj problematici je relativno mali s obzirom na to da je ova oblast, osim što je u razvoju, u  
53 svakom pogledu veoma zahtevna. Stoga, doktorska disertacija kandidata mr Ksenije  
54 Aksentijević predstavlja prvo sveobuhvatno istraživanje ove problematike u Republici Srbiji, u  
55 kome su razmotreni apsolutno svi aspekti i problemi koji se mogu javiti u radu na ovom  
56 subjektu. U ovom istraživanju istovremeno su primenjene gotovo sve raspoložive klasične i  
57 savremene metode koje služe za identifikaciju bakterija i ispitivanje njihove osetljivosti na  
58 antibiotike. Mnoge od primenjenih metoda još uvek nisu implementirane u rutinska ispitivanja,  
59 već su zastupljene isključivo u naučnim istraživanjima. Iskustva stečena tokom ove disertacije

1 mogu stoga poslužiti kao neprocenjivo vredan vodič za sva naredna ispitivanja u ovoj oblasti,  
2 ne samo u Srbiji već i šire.

3 **IX PREDLOG:**

4  
5 **Na osnovu ukupne ocene disertacije, komisija predlaže (odabрати jednu od tri**  
6 **ponuđene mogućnosti):**

7 - **da se doktorska disertacija prihvati, a kandidatu mr Kseniji Aksentijević**  
8 **odobri odbrana**

9

10 DATUM

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

11 13.06.2016.

12

13

14

15

Dr Dušan Mišić, vanredni profesor,  
Fakultet Veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

16

17

18

Dr Maja Marković, vanredni profesor,  
Fakultet Veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

19

20

21

Dr Jakov Nišavić, vanredni profesor,  
Fakultet Veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

22

23

24

Dr Ružica Ašanin, redovni profesor u penziji,  
Fakultet Veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

25

26

27

Dr Mirjana Lenhardt, naučni savetnik  
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

28

29

Univerzitet u Beogradu

30

31

32