

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 177.
11 Sednici održanoj 31.05.2017.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, godina izbora u
18 zvanje 2014; Katedra za mikrobiologiju, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u
19 Beogradu;
- 20
21 2. Dr Dubravka Milanov, viši naučni saradnik, biotehnologija, veterinarstvo, predklinička
22 veterina, mikrobiologija i imunologija, godina izbora u zvanje 2014, Naučni institut za
23 veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad.
- 24
25 3. Dr Sonja Radojičić, redovni profesor, epizootiologija, zarazne bolesti životinja i bolesti
26 pčela, godina izbora u zvanje 2011., Katedra za zarazne bolesti i bolesti pčela,
27 Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu;
- 28
29 4. Dr Radmila Marković, vanredni profesor, ishrana, godina izbora u zvanje 2014,
30 Katedra za ishranu i botaniku, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u
31 Beogradu;
- 32
33 5. Dr Snežana Bulajić, vanredni profesor, Higijena i tehnologija mleka, godina izbora u
34 zvanje 2014, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, Fakultet
35 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

36
37
38 II PODACI O KANDIDATU:

39 1. Ime, ime jednog roditelja, prezime:

40
41 Bojana (Zoran) Prunić

42
43 2. Datum rođenja, opština, Republika:

44
45 12.02.1973. Savski Venac, Beograd, Srbija

46
47 3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze*:

48
49 -

50
51 4. Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka*:

52
53 -

54
55 III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:

56
57 „Ispitivanje mogućnosti formiranja biofilma u uslovima *in vitro* kod različitih
58 serovarijeta *Salmonella* vrsta izolovanih iz uzoraka hrane za životinje“

1 **IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broj strana, poglavlja, slika, šema,**
2 **grafikona i sl.):**

3 Doktorska disertacija kandidata –Bojane Prunić napisana je na 167 stranica kompjuterski
4 kucanog teksta jasnim i razumljivim stilom. Disertacija sadrži 8 poglavlja: Uvod (3 strane),
5 Pregled literature (49 strana), Cilj i zadaci istraživanja (2 strane), Materijal i metode (18
6 strana), Rezultati (50 strana), diskusija (16 strana), Zaključci (2 strane) i Spisak literature (27
7 strana). Poslednje 4 strane sadrže biografiju kandidata i izjave. Disertacija je dokumentovana
8 sa 19 slika, 20 tabela i 24 grafikona. Disertacija na početku sadrži kratak sadržaj na srpskom i
9 engleskom jeziku.

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

13
14
15 U poglavlju **Uvod**, prikazane su osnovne činjenice o biofilmovima koji predstavljaju
16 višecelijske zajednice bakterija i njihov dominantan oblik života u prirodnim ekosistemima.
17 Ukratko je prikazan značaj koji formiranje biofilma ima za opstanak mikroorganizama u
18 nepovoljnim uslovima životnog okruženja, kao i etiologiji hroničnih infekcija ljudi i životinja. U
19 uvodnom delu je istaknuto da se biofilmi koje formiraju bakterije iz roda *Salmonella*, u
20 novije vreme razmatraju kao jedan od faktora koji doprinosi perzistenciji ovoj vrsti bakterija u
21 životnom okruženju (na biljnoj materiji), kao i na veštačkim materijalima koji se uobičajeno
22 koriste u objektima za proizvodnju hrane i hrane za životinje. Svi materijali od kojih je
23 izrađena oprema i površine sa kojima hrana dolazi u kontakt tokom procesa prerade i
24 proizvodnje (plastika, nerđajući čelik, drvo, staklo) mogu biti supstrat na kojem bakterije iz
25 roda *Salmonella* formiraju biofilmove. Kada rastu organizovane u biofilm, salmonele pokazuju
26 povećanu otpornost na različite stresogene faktore, uobičajeno prisutne u objektima za
27 proizvodnju hrane i hrane za životinje, kao što su isušivanje, varijacije pH vrednosti i deficit
28 hranljivih materija. Takođe, pokazuju veću otpornost na visoke temperature koje se koriste za
29 redukciju broja bakterija tokom proizvodnje određenih proizvoda (peletirana hrana, na primer).
30 Koncentracije dezinfekcionih sredstava koje uništavaju bakterije u suspenziji, nisu efikasne
31 prema bakterijama organizovanim u biofilm, zbog čega protokoli sanitacije bazirani na
32 rezultatima ispitivanja osetljivosti bakterija u suspenziji, nisu primenljivi za kontrolu
33 bakterijskih biofilma u objektima za proizvodnju hrane. Kada se jednom formiraju,
34 bakterijski biofilmi postaju dugotrajan izvor kontaminacije hrane na mestima njene
35 proizvodnje, uprkos kontinuiranog sprovođenja mera čišćenja i sanitacije.

36 U Republici Srbiji je nedovoljno poznato ili sasvim nepoznato koji se serovarijeteti
37 *Salmonella* nalaze u hrani za životinje, jer laboratorije nemaju mogućnost da izvrše serološku
38 tipizaciju svih izolata, a i zakonski propisi u Republici Srbiji ih na to ne obavezuju. Zbog toga
39 nema ni podataka o mogućoj ulozi hrane za životinje kao izvora serovarijeteta *Salmonella* od
40 posebnog značaja u epizootologiji salmoneloza.

41 U poglavlju **Pregled literature**, kandidat daje detaljan prikaz svih relevantnih
42 podataka o tome šta su bakterijski biofilmi, koje su faze njihovog formiranja, koje su ključne
43 komponente biofilma i koji su genetski mehanizmi regulacije formiranja biofilma kod bakterija
44 iz roda *Salmonella*. U Pregledu literature prikazani su i podaci o taksonomiji i nomenklaturi
45 bakterija iz roda *Salmonella*, kao i procedurama za njihovu izolaciju i identifikaciju u
46 laboratoriji. Prikazani su aktuelni epidemiološki i epizootiološki podaci, osnovne karakteristike
47 bolesti koje salmonele izazivaju kod ljudi i domaćih životinja, faktori virulencije uzročnika i
48 mehanizmi patogeneze.

49 Prva istraživanja biofilma koje formiraju bakterije, izvedena su u okviru ekološke
50 mikrobiologije početkom dvadesetog veka, kada je zapaženo da bakterije koje žive u
51 prirodnim vodenim ekosistemima (more, okeani) pokazuju tendenciju vezivanja za uronjene
52 čvrste površine. Međutim, detaljnija istraživanja otpočinju tek sa razvojem molekularnih
53 metoda istraživanja i tehnika mikroskopije visoke rezolucije (skening elektronske
54 mikroskopije) i tehnika za *in situ* vizualizaciju. Time je postalo jasno da je formiranje
55 biofilma genetski regulisan proces u životu bakterija, njihova integralna evoluciona
56 karakteristika i strategija preživljavanja u veoma raznovrsnim i često nepovoljnim uslovima
57 okruženja. Na kraju dvadesetog veka, postalo je jasno da se pogled na bakterije kao na
58 jednoćelijske mikroorganizme mora promeniti, jer one u prirodi žive u višecelijskim složenim
59 zajednicama, u kojima se značajno razlikuju od svojih planktonskih dvojnika koje izučavamo u
60 laboratorijskim uslovima. Najvažnije razlike odnose se na činjenice da se bakterije u biofilmu

1 slabo ili nikako ne dele, da imaju smanjene vrednosti rasta, usporen metabolizam, da
2 ekspresioniraju drugačije gene i da su za 10 do 1000 puta otpornije na efekat antimikrobnih
3 sredstava (uključujući i antibiotike i dezinficijense). Više faktora je odgovorno za povećanu
4 otpornost bakterija koje rastu u biofilmu. Važnu zaštitnu ulogu bakterijama obezbeđuje
5 matriks biofilma, koji opkoljava bakterije i čini barijeru između njih i antibiotika ili
6 dezinficijensa. Antimikrobnim agensima praktično su izložene samo bakterije u površinskim
7 slojevima biofilma, dok su bakterije u dubljim delovima zaštićene. Dodatno, na aktivnost
8 antimikrobnih agenasa u dubljim slojevima biofilma nepovoljno utiču faktori koji se odnose na
9 smanjenu raspoloživost kiseonika, delovanje bakterijskih enzima, niske pH vrednosti i sl.
10 Osim protektivne uloge matriksa, rezistenciji bakterija u biofilmu značajno doprinose
11 smanjene metaboličke aktivnosti bakterija i činjenica da se one u zreom biofilmu praktično ne
12 dele. Medicinska mikrobiologija se nadovezala na istraživanja bakterijskih biofilмова
13 osamdesetih godina prošlog veka, kada je ustanovljeno da je oko 60 do 80% hroničnih
14 infekcija ljudi u razvijenim zemljama izazvano bakterijama organizovanim u biofilm. Time je
15 prihvaćen koncept da bakterije imaju istu strategiju opstanka u svim ekosistemima uključujući
16 i organizme biljaka, životinja i ljudi.

17 Bakterije iz roda *Salmonella* su, uprkos kontinuiranim naporima u cilju njihove kontrole u
18 lancu ishrane, i dalje jedan od najznačajnijih i najučestalijih hranom prenosivih patogena.
19 Svake godine veliki broj ljudi u razvijenim zemljama sveta obole od salmoneloza. Veza
20 između salmonela u hrani za životinje i pojave salmoneloze kod ljudi ustanovljena je pre
21 mnogo godina. U hranu za životinje, kao i u namirnice, salmonele mogu dospeti
22 kontaminiranim sirovinama biljnog i animalnog porekla, ali i tokom njihove prerade ili
23 postprocesno. Uporedo sa razvojem molekularnih metoda istraživanja, sve je više dokaza da
24 određeni serotipovi *Salmonella* mogu perzistirati mesecima, pa čak i godinama u objektima za
25 proizvodnju hrane i hrane za životinje. Njihova perzistencija se objašnjava sposobnošću da
26 formiraju biofilm na abiotskim površinama (opremi i površinama u objektima za preradu i
27 proizvodnju hrane). Biofilmovi *Salmonella* vrsta postaju sve atraktivnija oblast izučavanja, čiji
28 je cilj rasvetljavanje genetske regulacije njegovog formiranja, faktora koji doprinose njihovom
29 nastanku i iznalaženje efikasnih mera za njegovu kontrolu i eradikaciju.

30 Biofilmovi se sastoje od mikrokolonija bakterija uklopljenih u ekstracelularnu
31 suspcancu (ili matriks biofilma) koja predstavlja vanćelijski produkt bakterija. Glavne
32 komponente matriksa biofilma *Salmonella* vrsta su: proteinska frakcija (tanke agregativne
33 fimbrije ili curli fimbrije) i ekstracelularni polisaharidi (celuloza, kapsularni antigeni, kolanska
34 kiselina i drugi). Sinteza dve glavne komponente matriksa (curli fimbrija i celuloze) je genetski
35 regulisan proces *Salmonella* i nalazi se pod kontrolom glavnog transkripcionog regulatora ili
36 csgD gena (*curli subunits gene D*) koji direktno pokreće sintezu curli fimbrija i posredno
37 sintezu celuloze preko dva operona *bcs* (*bacterial cellulose synthesis*), označenih sa
38 *bcsABZC* i *bcsEFG*. Aktivacija csgD nalazi se pod uticajem različitih faktora okruženja, kao
39 što su vrednosti temperature, pH vrednosti i raspoloživosti hraniva. Maksimalna ekspresija se
40 zapaža na temperaturama ispod 30°C, u uslovima niske osmolarnosti i niske koncentracije
41 hranljivih materija. Produkcija curli fimbrija i celuloze smatra se ključnom za preživljavanje
42 *Salmonella* u okruženju. U uslovima *in vitro* ustanovljava se ispitivanjem morfotipova kolonija
43 koje izolati formiraju kultivacijom na agaru uz dodatak diazo boje Congo Red i Coomassie
44 brilliant blue. Ukoliko soj *Salmonella* ima sposobnost sinteze obe kompenete matriksa
45 biofilma, na Congo red agaru formira kolonije RDAR morfotipa (red, dru and rough). RDAR
46 morfotip postao je sinonim za sojeve salmonel-a koje odlikuje dobra sposobnost produkcije
47 biofilma na abiotskim površinama. Izolati *Salmonella* koji imaju sposobnost sinteze curli
48 fimbrija, ali ne i celuloze, na Congo red agaru formiraju tzv. BDAR morfotip kolonija (br
49 own, dry and rough), dok su kolonije PDAR morfotipa (pink, dry and rough) svojstvene sojevima
50 koji produkuju celulozu, ali ne i curli fimbrije. SAW morfotip (smooth and white) formiraju
51 sojevi salmonela koje nemaju sposobnost produkcije biofilma, odnosno ne sintetišu ni jednu
52 od glavnih komponenti matriksa. Ispitivanje sposobnosti produkcije biofilma kod *Salmonella*
53 vrsta uobičajeno se u uslovima *in vitro* ispituje i pelikula testom, koji predstavlja formiranje
54 biofilma na granici dva agregatna stanja (tečnost/vazduh) i koji je specifičan za salmonele
55 koje preferiraju aerobne uslove rasta. U formiranju pelikule (biofilma) važna uloga se pripisuje
56 bapA proteinu (*biofilm associated protein A*).

57 U ovom delu disertacije razmotren je i problem rastuće rezistencije bakterija iz roda
58 *Salmonella* na antibiotike. Visoka prevalencija rezistentnih sojeva *Salmonella* ustanovljena je
59 u državama koje nemaju efikasan sistem kontrole salmonela u hrani za životinje i kod
60 domaćih životinja. Industrijalizacija proizvodnje hrane za životinje praćena je intenzivnim

1 uvozom/izvozom sirovina i gotovih proizvoda, čime hrana za životinje postaje potencijalni
2 izvor za širenje rezistentnih sojeva na globalnom nivou. Pri tome porastu ovog problema
3 doprinosi neracionalna i prekomerna upotreba antibiotika kao dodataka hrani za životinje.
4 Takva praksa se zadržala u mnogim državama (izuzev članica Evropske Unije), uključujući i
5 najveće proizvođače hrane za životinje u svetu, kao što su SAD i Kina. U Republici Srbiji se
6 ne sprovodi monitoring rezistencije sojeva *Salmonella* izolovanih iz hrane za životinje, ni kod
7 uvoza, ni u unutrašnjem prometu. Zbog toga nije poznata uloga hrane za životinje kao
8 mogućeg vektora sojeva *Salmonella* sa rezistencijom ili multiplom rezistencijom na
9 antibiotike.

10 Takođe je značajna pažnja u ovom poglavlju posvećena principima kontrole
11 salmonela u objektima za proizvodnju hrane za životinje i njihovoj efikasnosti u odnosu na
12 bakterije organizovane u biofilm.

13
14 U poglavlju **Cilj i zadaci istraživanja**, određeno je da se iz uzoraka hrane za životinje
15 koja se proizvodi u nekoliko objekata na teritoriji južnobačkog i sremskog okruga u Vojvodini
16 izvrši izolacija i identifikacija bakterija iz roda *Salmonella*, kao i da se izolati potvrde i
17 identifikuju do serovarijeteta u referentnoj laboratoriji. Za cilj je postavljeno da se odabere oko
18 100 izolata koji bi se dalje ispitali na sposobnost produkcije biofilma u uslovima *in vitro*.

19 Cilj je bio da se kod svih odabranih izolata ispita sposobnost produkcije biofilma na
20 površinama od plastike (polistirena), nerđajućeg čelika i tečnost/vazduh međufazi, primenom
21 testova za kvalitativno i kvantitativno ispitivanje produkcije biofilma, kultivacijom sojeva u
22 hranljivo bogatoj (Trypton soja bujon) i hranljivo siromašnoj podlozi (Luria Bertani bujon) i na
23 dve temperature inkubacije (20°C i 37°C). Kod svih izolata je takođe trebalo ispitati produkciju
24 ključnih komponenti matriksa biofilma *Salmonella* spp. (*curli* fimbrija i celuloze).

25 Planirano je i da se ispita osetljivost sojeva *Salmonella* spp. izolovanih iz hrane za
26 životinje na antibiotike primenom disk difuzione metode, da bi se procenila uloga hrane kao
27 izvora sojeva *Salmonella* sa rezistencijom ili multiplom rezistencijom na antibiotike.

28 Kod izolata *Salmonella* spp. za koje je utvrđeno da pripadaju istom serovarijetetu, a
29 koji su izolovani iz hrane za životinje poreklom iz istog proizvodnog objekta tokom perioda
30 ispitivanja (2 godine), cilj je bio utvrditi genetičku srodnost primenom *pulsed field gel*
31 elektroforeze (PFGE), što bi ukazalo na mogućnost njihove perzistencije u proizvodnim
32 objektima.

33
34
35 Kako bi se ostvarili definisani ciljevi istraživanja, postavljeni su sledeći zadaci:

- 36 • Prikupljanje izolata *Salmonella* tokom rutinskog rada u laboratoriji za mikrobiološko
37 ispitivanje hrane za životinje u Naučnom institutu za veterinarstvo „Novi Sad“,
38 primenom klasičnih bakterioloških metoda, u periodu januar 2012-decembar 2014
39 godine;
- 40 • Identifikacija izolata *Salmonella* na osnovu morfoloških i biohemijskih karakteristika;
- 41 • Serološka tipizacija izolata *Salmonella* iz hrane za životinje, metodom klasične
42 aglutinacije, upotrebom polivalentnih, grupno specifičnih seruma i seruma za
43 flagelarne antigene faze 1 i 2 za serovarijetete: Enteritidis, Infantis, Hadar, Virchow i
44 Typhimurium;
- 45 • Dostavljanje svih izolata u Nacionalnu referentnu laboratoriju za *Salmonella*, *Shigella*
46 i *Yersinia enterocolitica*, Institutu za javno zdravlje Srbije „dr Milan Jovanović Batut“,
47 na potvrdu i identifikaciju ostalih serovarijeteta;
- 48 • Ispitivanje sposobnosti produkcije biofilma kod izolata *Salmonella* na površini od
49 plastike (polistirena), nerđajućeg čelika i tečnost/vazduh međufazi, primenom testa na
50 mikrotitracionim pločama, skening elektronske mikroskopije i pelikula testa, na dve
51 temperature inkubacije (20°C i 37°C) i u dve podloge za kultivaciju sa različitim
52 sadržajem hranljivih materija (Trypton soja bujon i Luria-Bertani bujon);
- 53 • ispitivanje produkcije ključnih komponenata matriksa biofilma *Salmonella* spp. (*curli*
54 fimbrija i celuloze) kultivacijom izolata *Salmonella* na Congo red agaru;
- 55 • ispitivanje osetljivosti izolata *Salmonella* poreklom iz hrane za životinje na antibiotike
56 primenom disk difuzione metode;
- 57 • Ispitivanje genetičke srodnosti izolata *Salmonella* spp. istog serovarijeteta koji su
58 tokom dve godine izolovani iz hrane za životinje poreklom iz istog proizvodnog
59 objekta, primenom elektroforeze u pulsirajućem polju struje (*pulsed field gel*
60 *elektrophoresis* -PFGE).

- Analiza dobijenih rezultata.

Poglavlje **Materijal i metode** kandidat je podelila na podnaslove prema postavljenim zadacima istraživanja.

Izolacija *Salmonella* vršena je iz uzoraka hrane za životinje dostavljenih u periodu od januara 2012 do decembra 2014 u laboratoriju za mikrobiološko ispitivanje hrane za životinje Naučnog instituta za veterinarstvo u Novom Sadu, a koji su poreklom iz 18 mešaona stočne hrane sa teritorije Autonomne pokrajine Vojvodine.

Izolacija *Salmonella* izvedena je primenom akreditovane metode, prema odredbama standarda SRPS EN ISO 6579:2008: Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella* spp. U tom cilju primenjene su hranljive podloge i uslovi kultivisanja koji su nabrojani u ISO standardu. Od kolonija koje su bile sumnjive da pripadaju *Salmonella* vrstama, u cilju identifikacije, ispitivane su biohemijske osobine izolata. Rađeni su testovi fermentacije ugljenih hidrata (TSI agar po Kligleru), produkcije ureaze (urea agar); dekarboksilacije L-lizina; produkcije β-galaktosidaze; Voges-Proskauer (VP) reakcija i ispitivanje produkcije indola.

U laboratoriji Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad“ u Novom Sadu, serološki je određena pripadnost vrsti *Salmonella* (grupni polivalentni serum za *Salmonella*, (grupe A,B,C,D,E) i pripadnost grupi, testom aglutinacije na mikroskopskoj pločici, upotrebom: grupnog polivalentnog seruma za *Salmonella* vrste (grupe A,B,C,D,E) i grupno specifičnih seruma za grupe: O:4 (grupa B); O:7 (grupa C₁); O:8 (grupe C₂,C₃); O:9 (grupa D); O:3,10,15,19 (grupe E₁,E₄), proizvođača Institut za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“, Beograd. Svi izolati su dostavljeni u Nacionalnu referentnu laboratoriju za *Salmonella*, *Shigella* i *Yersinia enterocolitica*, Institutu za javno zdravlje Srbije „dr Milan Jovanović Batut“, na potvrdu i identifikaciju ostalih serovarijeteta.

Ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma izvedeno je na 100 izolata *Salmonella* poreklom iz hrane za životinje, primenom sledećih metoda ispitivanja:

- Congo Red agar testa;
- Pelikula testa;
- Testa na mikrotitracionim pločama upotrebom boje kristal-violet;
- Skening elektronske mikroskopije.

Congo Red agar je pripremljen od 10g/L Bacto Tryptone (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA), 5g/L Bacto Yeast Extract (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA), 15g agara, uz dodatak 0,004g (40 mg/L) Congo Red boje (MP Biomedicals, LCC, France) i 0,002g (20 mg/L) Coomassie brilliant blue G 250 (Sigma, Sigma-Aldrich, United Kindom). Na pripremljen Congo Red agar pomoću eze je tehnikom pikiranja inokulisan svaki izolat *Salmonella* u duplikatu. Ploče su postavljene u inkubator bez okretanja Petri šolje i inkubirane 5 dana na temperaturama od 20°C i 37°C.

Ispitivanje sposobnosti produkcije biofilma na granici dva agregatna stanja (pelikula test) izveden je u plastičnim epruvetama kultivacijom sojeva u dve hranljive podloge (TSB i LB), za 6 dana inkubacije na temperaturama od 20°C i 37°C. Bojenje pelikule izvedeno je primenom 0,3% rastvora boje kristal-violet (Fluka, Sigma-Aldrich-Belgium).

Test na mikrotitracionim pločama je korišćen kao metoda za kvantitativno ispitivanje produkcije biofilma. Za tu namenu korišćene su polistirenske mikrotitracione ploče sa 96 udubljenja NUNC (Roskilde, Denmark), sa ravnim dnom za postavljanje kulture ćelija. Od svih izolata *Salmonella* spp. pripremljene su suspenzije gustine 1-5 x 10⁸ CFU/mL, koje su inokulisane u količini od 200μL u po četiri udubljenja, za svaki ispitivani soj. Test je izveden inkubacijom sojeva u TSB i LB, i na dve temperature inkubacije (20°C i 37°C). Bojenje biofilma u udubljenjima mikrotitracionih ploča izvedeno je primenom 0,3% rastvora boje kristal-violet (Fluka, Sigma-Aldrich-Belgium), a rezultati očitani merenjem optičke gustine prozračnosti spektrofotometrijski na čitaču: Labsystems Multiscan® MCC/340, upotrebom filtera talasne dužine od 595 nm.

Kao pozitivne kontrole u Congo red agar testu, pelikula testu i testu na mikrotitracionim pločama korišćene su referentne kulture *S. Typhimurium* ATCC 14028 i *S. Enteritidis* ATCC 13076. Svi testovi su ponovljeni tri puta za svaki izolat *Salmonella* spp.

Za pripremu biofilmova na površini nerđajućeg čelika korišćeni su kuponi dimenzija 1cm x 1cm x 0,1 cm. Kuponi su pre upotrebe prokuvani u rastvoru deterdženta tokom 10 minuta i isprani pet puta destilovanom vodom. Do početka ispitivanja, kuponi su čuvani u 95% etanolu, a neposredno pre upotrebe sterilisani opaljivanjem na plamenu. Kuponi su zatim postavljeni odvojeno u udubljenja sterilne polistirenske ploče *Nunc* sa 12 udubljenja.

1 Za pripremu biofilmova odabrana su dva izolata: *S. Montevideo* i *S. Enteritidis* i
2 referentna kultura *S. Typhimurium* ATCC 14028. Izolati su odabrani na osnovu rezultata
3 dobijenih u Congo Red agar- testu i testu na mikrotitracionim pločama, a na osnovu kojih su
4 procenjeni za jake biofilm producere. Biofilmovi odabranih izolata formirani su na površini od
5 nerđajućeg čelika inkubacijom u LB i TSB, na temperaturama od 20°C i 37°C, tokom 48 h.
6 Priprema kupona za pregled skening elektronskom mikroskopijom izvedena je fiksiranjem u
7 4% rastvoru formaldehida preko noći na temperaturi od 5°C, ispranjem sterilnom
8 destilovanom vodom i dehidracijom kupona potapanjem u vodene rastvore etanola rastućih
9 koncentracija od 30%, 50%, 60%, 70%, 90% i koncentrovani etanol (96%) po pet minuta.
10 Osušeni preparati napareni su zlatom na uređaju Sputter Coater SCD 005, BALTEC SCAN
11 (WD=50mm, za 90s, struja 30mA) i posmatrani skening elektronskim mikroskopom JMS SEM
12 6460 LV, (napon ubrzanja 25 KV, na WD od 20 do 8 mm).

13 Izolati *Salmonella* tri serovarijete: Tennessee (n=7), Montevideo (n=8) i Infantis
14 (n=4) ispitani su na genetički diverzitet primenom elektroforeze u pulsnom polju (PFGE).
15 Makrorestrikcija genomske DNK je izvršena primenom 20U *SpeI* ili *XbaI* restrikcioni enzima
16 (Termo Fisher Scientific, USA). Restrikcioni fragmenti DNK su razdvojeni elektroforezom u
17 pulsnom polju pomoću 2015 Pulsafor sistema (LKB Instruments, Broma, Sweden)
18 opremljenim heksagonalnom elektrodom, tokom 18 h u TBE puferu na 9°C, u polju napona
19 300V. Gelovi su obojeni etidijum-bromidom i fotografisani pod UV osvetljenjem, a zatim
20 analizirani vizuelnim poređenjem dobijenih profila. Statistička obrada podataka dobijenih u
21 PFGE vršena je korišćenjem Wardove metode koeficijenata. Korelacija između različitih
22 PFGE profila vršena je pomoću SPSS softvera verzija 21.0 (Ward linkage of correlation
23 coefficients between PFGE patterns of different genotypes by using SPSS cluster analysis
24 software -BM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk,
25 NY: IBM Corp.). Kao molekularni marker korišćena je *Salmonella* Braenderup H9812.

26 Osetljivost 100 izolata *Salmonella* na antibiotike ispitana je disk difuzionom metodom
27 prema preporukama CLSI za *Enterobacteriaceae* (*Clinical and Laboratory Standards Institute*,
28 document M100-S22, 2012) na sledeće antibiotike: Amoxicillin/clavulanic acid (AMC, 20/10
29 µg), Ampicillin (AMP, 10 µg); Cefpodoxime (CPD, 10 µg); Cefotaxime (CAZ, 30 µg);
30 Cefotaxime (CTX, 30 µg); Ciprofloxacin (CIP, 5 µg); Chloramphenicol (CHL, 30 µg);
31 Gentamycin (GM, 10 µg); Nalidixic acid (NA, 30 µg); Streptomycin (S, 10 µg); Sulphonamide
32 (SSS, 300 µg); Tetracycline (TET, 30 µg); Trimethoprim (TMP, 5 µg); Trimethoprim
33 +Sulfamethoxazole (SXT, 1.25/23.75 µg) (Bio-Rad, France). Kontrola kvaliteta disk difuzionog
34 testa izvedena je upotrebom referentnih sojeva: *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 i
35 *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

36 Analiza dobijenih rezultata sprovedena je u zavisnosti od prirode podataka;
37 upotrebene su parametarske i neparametarske metode. Od parametarskih tehnika
38 sprovedena je Pirsonova korelacija, T test uparenih uzoraka, dok su od neparametarskih
39 sprovedeni Sprirmanova korelacija, Chi square test i Chi square test nezavisnosti. Sva
40 testiranja sprovedena su na nivou statističke značajnosti 0.05. Veza između metričkih
41 promenljivih izražena je pomoću Pirsonovog koeficijenta korelacije, dok je Spirmanov
42 koeficijent korelacije upotrebljen za ispitivanje veze između kategorijalnih promenljivih.

43 U poglavlju **Rezultati** kandidat je prvo prikazala rezultate izolacije i identifikacije
44 ispitivanih sojeva *Salmonella*. Ukupno je u periodu 2012-2014, pregledano 2898 uzoraka
45 hrane za životinje, a *Salmonella* spp. izolovane iz 152 uzorka (5,25%). Za dalja istraživanja
46 odabrano je 100 izolata salmonela koje su potvrđene i serološki tipizirane. U Nacionalnoj
47 referentnoj laboratoriji za *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio Cholerae* i *Yersinia enterocolitica*,
48 Institutu za javno zdravlje Srbije „Dr Milan Jovanović Batut“ u Beogradu, identifikovano je 16
49 različitih serovarijete *Salmonella*: *S. Tennessee* (n=18), *S. Montevideo* (n=15), *S. Enteritidis*
50 (n=12), *S. Infantis* (n=12), *S. Agona* (n=9), *S. Senftenberg* (n=7), *S. Stanleyville* (n=6), *S.*
51 *Mbandaka* (n=6), *S. Typhimurium* (n=3), *S. Jerusalem* (n=2), *S. Typhimurium monofazni*
52 (n=1), *S. Thompson* (n=1), *S. Amsterdam* (n=1), *S. Colindale* (n=1), *S. Dahra* (n=1), *S.*
53 *Livingstone* (n=1). Kod četiri izolata nije bilo moguće utvriti serovarijetet. Kod njih su
54 identifikovani somatski antigeni: 1, 3, 19 i flagelarni antigen i - faze 1.

55 Kultivacijom na Congo red agaru, za 5 dana inkubacije na temperaturi od 20°C, izolati
56 *Salmonella* spp. formirali su kolonije sledećih morfotipova:

- 57 - RDAR (*red, dry and rough* - crvena, suva i naborana) morfotip - 73 izolata i
58 referentna kultura *S. Typhimurium* ATCC 14028;
- 59 - BDAR (*brown, dry and rough* - braon, suva i naborana) morfotip - 16 izolata i
60 referentna kultura *S. Enteritidis* ATCC 13076;

- 1 - PDAR (*pink, dry and rough* - roze, suva i naborana) morfotip - 9 izolata,
- 2 - SAW (*smooth and white* – glatka i bela) morfotip - 1 izolat,
- 3 - SBAM (*smooth, brown and mucoid* - glatka, braon i sluzava) morfotip - 1 izolat.

4 Ukupno je 98% izolata *Salmonella* iz hrane za životinje proizvelo jednu ili obe komponente
5 ključne za formiranje matriksa biofilma, kultivacijom na Congo red agaru za 5 dana inkubacije
6 na temperaturi od 20°C.

7 Na Congo red agaru, tokom 5 dana inkubacije na temperaturi od 37°C, svi izolati
8 *Salmonella* i korišćene referentne kulture su formirali kolonije SAW morfotipa, čime je
9 dokazano da je viša temperatura ima nepovoljan efekat na produkciju biofilma *Salmonella*
10 vrsta.

11 U pelikula testu, inkubacijom u Luria Bertani bujonu tokom 6 dana na temperaturi od
12 20°C, 46% izolata *Salmonella* je formiralo čvrstu, stabilnu pelikulu deblju od 1mm; 37%
13 izolata je formiralo stabilnu pelikulu debljine 1mm i više od 1 mm, dok je 13% izolata formiralo
14 veoma tanku pelikulu debljine ispod 1mm. Formiranje pelikule nije ustanovljeno kod 4%
15 ispitanih izolata. Inkubacijom na temperaturi od 37°C, 12% izolata je formiralo čvrstu, stabilnu
16 pelikulu deblju od 1mm, 11% stabilnu pelikulu, 47% izolata veoma tanku pelikulu, a 30%
17 izolata nije formiralo pelikulu.

18 Kultivacijom u Trypton soja bujonu tokom 6 dana na temperaturi od 20°C, 3% izolata
19 *Salmonella* je formiralo čvrstu, stabilnu pelikulu, 16% izolata formiralo je stabilnu pelikulu,
20 51% izolata formiralo je tanku pelikulu, a 30% izolata nije formiralo pelikulu. Inkubacijom na
21 37°C, samo 3% izolata je formiralo čvrstu pelikulu, 17% izolata formiralo je stabilnu pelikulu,
22 53% izolata formiralo je tanku pelikulu, a 27% izolata nije proizvelo vidljivu pelikulu.

23 U ovom istraživanju 46% izolata *Salmonella* iz hrane za životinje je formiralo čvrstu,
24 stabilnu pelikulu deblju od 1mm, kultivacijom u hranljivo siromašnoj podlozi (LB) tokom 6
25 dana na temperaturi od 20°C. Viša temperatura inkubacije (37°C) je nepovoljno uticala na
26 sposobnost formiranja pelikule kod svih ispitanih serovarijeta *Salmonella* u obe hranjive
27 podloge. Izuzetak predstavljaju izolati serovarijeta Enteritidis (n=12) koji su formirali čvrstu,
28 stabilnu pelikulu kultivacijom u Luria Bertani bujonu i na temperaturi od 37°C.

29 U testu na mikrotitracionim pločama, ustanovljeno je da najpovoljniji uticaj na
30 formiranje biofilma ima kultivacija u LB podlozi na temperaturi od 20°C. Pod ovim uslovima je
31 80% izolata *S. Montevideo* (12/15) , 66,7% izolata *S. Enteritidis* (8/12), 55,6% izolata *S.*
32 *Agona* (5/9), 44,4% izolata *S. Tennessee* (8/18) i 25% izolata *S. Infantis* (3/12) procenjeno
33 za jake proizvođače biofilma. Izmerene vrednosti ekstinkcija (OD₅₉₅) bile su u rasponu od
34 0,688 do 1,202. Pod istim uslovima kultivacije, 85,7% izolata *S. Senftenberg* (6/7), 55,6%
35 izolata *S. Tennessee* (10/18) i 58,3% izolata *S. Infantis* (7/12) je procenjeno umereno-jakim
36 proizvođačima biofilma. Izmerene vrednosti ekstinkcije (OD₅₉₅) bile su u rasponu od 0,335 do
37 0,480. Ukupno 7 izolata je procenjeno za slabe proizvođače biofilma. Kultivacija u istoj
38 podlozi (LB), ali na višoj temperaturi inkubacije (na 37°C), imala je nepovoljan uticaj na
39 formiranje biofilma. Pod ovim uslovima 38,9% izolata *S. Tennessee* (7/18) i 28,6 % izolata *S.*
40 *Senftenberg* (2/7) su procenjeni kao umereno-jaki biofilm produceri, dok je 55,6% izolata *S.*
41 *Tennessee* (10/18), 66,7% *S. Agona* (6/9), 53,3% *S. Montevideo* (8/15), 66,7% *S. Infantis*
42 (8/12) i 42,9% *S. Senftenberg* (3/7) je procenjenao slabim proizvođačima biofilma, a 17
43 izolata nije formiralo merljiv biofilm. Samo dvanaest ispitanih izolata serovarijeta *S.*
44 *Enteritidis* je i pod ovim uslovima procenjeno jakim proizvođačima biofilma (OD₅₉₅ je iznosila
45 1,338 (±0,724)). Na osnovu dobijenih rezultata testa na mikrotitracionim pločama, utvrđeno je
46 da temperatura inkubacije od 20°C ima statistički značajan uticaj na produkciju biofilma
47 (p<0,01) u odnosu na višu temperaturu inkubacije od 37°C. Kultivacijom izolata u LB podlozi
48 na temperaturi od 20°C, uočava se statistički značajno povećanje broja (p<0,01) jakih i
49 umerenih biofilm producera u odnosu na broj ustanovljen inkubacijom na 37°C.

50 Odlična sposobnost kolonizacije površine nerđajućeg čelika i formiranje zrelih
51 biofilмова odabranih sojeva *Salmonella* Montevideo i *S. Enteritidis*, kao i referentne kulture *S.*
52 *Typhimurium* ATCC 14028, dokazana je primenom skening elektronske mikroskopije. I ovom
53 metodom je potvrđen stimulativni uticaj deficita hranljivih materija (kultivacija u LB) i niže
54 temperature inkubacije (20°C) na sposobnost formiranja biofilma *Salmonella* vrsta.

55 Retrospektivnom analizom porekla uzoraka hrane (po proizvodnim objektima) i
56 izolovanih serovarijeta, u tri objekta je uočena ponavljana izolacija serovarijeta Tennessee
57 (objekat A), Montevideo (objekat B) i Infantis (objekat C). Na osnovu *SpeI* i *XbaI*
58 makrorestripcionog profila ustanovljena je klonska pripadnost izolata *S. Montevideo* i izolata
59 *S. Infantis*, dok su izolati *S. Tennessee* pokazali genetičke razlike manje od 10%.
60 Identifikacija istih klonova serovarijeta *S. Montevideo* i *S. Infantis*, kao i mali genetički

1 diverzitet serovarijeteta *S. Tennessee*, koji su tokom dve godine ponavljano detektovani
2 u3,cima hrane za životinje iz tri proizvodna objekta, posredno ukazuju na mogućnost njihove
3 perzistencije na površinama u objektima za proizvodnju. Ekspresija RDAR morfotipa kolonija
4 ovih izolata, dodatno potvrđuje perzistenciju istih sojeva u objektima. Zbog toga se programi
5 za kontrolu *Salmonella* u hrani za životinje, moraju bazirati ne samo na kontroli gotovih
6 proizvoda, već i objekata za proizvodnju.

7 Na osnovu rezultata ispitivanja osetljivosti izolata *Salmonella* na antibiotike,
8 primenom disk difuzione metode, samo je kod jednog izolata *S. Infantis* (n=12) utvrđena
9 rezistencija na nalidiksinsku kiselinu (30 µg) i tetraciklin (30 µg). Ostali izolati *Salmonella* su
10 pokazali osetljivost na sve korišćene antibiotike.

11 U ovom poglavlju kandidat je dala kritički osvrt na dobijene rezultate poredeći ih sa
12 rezultatima ispitivanja autora čije je reference koristila tokom izrade doktorske disertacije.

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

- 15 1. Iz hrane za životinje sa područja južnobačkog i sremskog okruga Vojvodine, najčešće
16 su izolovani serovarijeteti *Salmonella Tennessee* (18%) i *Montevideo* (15%).
- 17 2. Serovarijeteti od posebnog značaja u epizootologiji i epidemiologiji salmoneloza,
18 Enteritidis i *Infantis* izolovani su u značajnom procentu (po 12%), zbog čega hrana za
19 životinje predstavlja njihov značajan izvor.
- 20 3. Kultivacijom na Congo red agaru tokom 5 dana inkubacije na temperaturi od 20°C
21 98% izolata *Salmonella* iz hrane za životinje produkovalo je jednu ili obe komponente
22 ključne za formiranje matriksa biofilma (*curli* fimbrije i celuloza).
- 23 4. Temperatura inkubacije od 20°C i deficit hranljivih materija u podlozi za kultivisanje
24 povoljno deluju na formiranje biofilma i u ovim uslovima na mikrotitracionim pločama
25 su svi ispitivani izolati *Salmonella* formirali biofilm.
- 26 5. Temperatura inkubacije od 37°C, imala je nepovoljan uticaj na formiranje biofilma bez
27 obzira na vrstu hranljive podloge. Ukupno 35 izolata *Salmonella* se u ovim uslovima
28 na mikrotitracionim pločama pokazala slabim proizvođačima biofilma, a 17 izolata
29 uopšte nije formiralo merljiv biofilm.
- 30 6. Uprkos tome što je temperatura inkubacije od 37°C imala nepovoljan uticaj na
31 formiranje biofilma, svi izolati serovarijeteta Enteritidis su bili izuzetak i u ovim
32 uslovima su produkovali dobre biofilme na mikrotitracionim pločama.
- 33 7. Sve izolate *Salmonella* (bez obzira na serovarijetet) odlikovala je izražena
34 sposobnost formiranja biofilma na granici dva agregatna stanja (tečnost-vazduh).
- 35 8. Izolati *Salmonella* poreklom iz hrane za životinje, ispoljili su karakterističnu osobinu
36 da biofilm ne formiraju na hidrofobnoj površini (polistirenu) koja je potopljena u
37 tečnosti. Pod takvim uslovima biofilm su formirali samo u graničnoj zoni između
38 tečnosti i vazduha. Ova osobina se ne zapaža u odnosu na hidrofilni supstrat
39 (nerđajući čelik), na kojem su ispitivani izolati *Salmonella* formirali biofilm
- 40 9. Primenom metode PFGE potvrđeno je da svi izolati serovarijeteta *Montevideo*,
41 *Tennessee* i *Infantis*, pripadaju istim klonovima. Ovi klonovi su ponavljano izolovani
42 tokom više meseci ispitivanja, iz uzoraka hrane za životinje poreklom iz istog
43 proizvodnog objekta. To ukazuje na moguće perzistiranje ovih klonova u objektima za
44 proizvodnju hrane za životinje i da ovi klonovi *Salmonella* u finalne proizvode
45 dospevaju procesnom kontaminacijom, a ne preko kontaminiranih sirovina.
- 46 10. Na osnovu rezultata ispitivanja osetljivosti izolata *Salmonella* spp. na antibiotike,
47 hrana za životinje nije bila značajan izvor sojeva *Salmonella* sa rezistencijom i
48 multiplom rezistencijom na antibiotike jer su svi ispitani izolati bili osetljivi na sve ili na
49 većinu primenjenih antibiotika.

50 U poglavlju **Spisak literature** kandidat je navela 274 reference koje je koristila tokom izrade
51 svoje doktorske disertacije.

52 **VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li** 53 **su dobijeni rezultati u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li** 54 **zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):**

55 Rezultati istraživanja do kojih je kandidatkinja došla tokom izrade doktorske disertacije u
56 potpunosti su u skladu sa postavljenim ciljevima i zadacima istraživanja. Dobijeni rezultati su
57
58
59
60

1 prikazani tabelarno, grafički i uz pomoć slika, a njihov opis je dat logičnim redosledom,
2 pregledno, jasnim i razumljivim stilom. Izvedeni zaključci su jasno formulisani i u skladu su sa
3 postavljenim ciljevima i dobijenim rezultatima istraživanja.

4 5 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**

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

7
8 Doktorska disertacija kandidata dvm Bojane Prunić pod naslovom „**Ispitivanje mogućnosti**
9 **formiranja biofilma u uslovima *in vitro* kod različitih serovarijeteta *Salmonella* vrsta**
10 **izolovanih iz uzoraka hrane za životinje**“ napisana je u skladu sa obrazloženjem
11 navedenim u prijavi teme.

12 13 **2. Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?**

14
15 Doktorska disertacija kandidata dvm Bojane Prunić pod naslovom „**Ispitivanje mogućnosti**
16 **formiranja biofilma u uslovima *in vitro* kod različitih serovarijeteta *Salmonella* vrsta**
17 **izolovanih iz uzoraka hrane za životinje**“ sadrži sve bitne elemente u skladu sa zahtevima
18 za završenu doktorsku disertaciju.

19 20 **3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?**

21
22 U Republici Srbiji se sprovodi kontinuirani monitoring mikrobiološke bezbednosti hrane za
23 životinje, koji obuhvata i pregled na prisustvo bakterija iz roda *Salmonella*. Međutim,
24 laboratorije u rutinskom radu ne rade identifikaciju izolata salmonela vrsta do nivoa
25 serovarijeteta. Zbog toga nije poznato koji se serovarijeteti *Salmonella* nalaze u hrani za
26 životinje i da li je hrana za životinje značajna kao izvor sojeva od posebne važnosti u
27 epizootologiji i epidemiologiji salmoneloza. Takođe, u rutinskom radu se ne vrši ispitivanje
28 osetljivosti na antibiotike sojeva *Salmonella* izolovanih iz uzoraka hrane za životinje. Ovo je
29 od naročitog značaja prilikom uvoza, ali i u unutrašnjem prometu sirovina i proizvoda
30 namenjenih ishrani životinja. Rezultati ovih istraživanja daju odgovor na ova važna pitanja.

31 Istraživanja biofilмова koje formiraju salmonele, od značaja su za razumevanje
32 mehanizama koje ove bakterije koriste za preživljavanje u životnom okruženju, kao i na
33 veštačkim materijalima koji se uobičajeno koriste u objektima za proizvodnju hrane i hrane za
34 životinje i prva su takva istraživanja sprovedena u oblasti mikrobiologije hrane za životinje u
35 našoj zemlji.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

IX PREDLOG:

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

- da se doktorska disertacija prihvati, a kandidatu dvm Bojani Prunić odobri odbrana.

DATUM

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

14.07. 2017.

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

Dr Dubravka Milanov, viši naučni saradnik
Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad

Dr Sonja Radojičić, redovni profesor,
Fakultet Veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Dr dr Radmila Marković, vanredni profesor
Fakultet Veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Dr Snežana Bulajić, vanredni profesor
Fakultet Veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu
