

3
4 IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

5
6 I PODACI O KOMISIJI:

7
8 1. Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju:

9
10 20.03.2019.godine, Nastavno-naučno Veće Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u
11 Beogradu, na 193 Sednici.

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, mentor, Mikrobiologija sa imunologijom, godina izbora u
18 zvanje 2014., Katedra za mikrobiologiju, Fakultet veterinarske medicine, Beograd.

19 2. Dr Lidija Šenerović, viši naučni saradnik, mentor, Prirodno-matematičke nauke – Biologija –
20 Molekularna biologija, godina izbora u zvanje 2016., Institut za molekularnu genetiku i genetičko
21 inženjerstvo, Beograd.

22 3. Dr Sonja Radojičić, redovni profesor, Zarazne bolesti životinja i bolesti pčela, godina izbora u
23 zvanje 2011., Katedra za zarazne bolesti i bolesti pčela, Fakultet veterinarske medicine
24 Beograd.

25 4. Dr Marina Radojičić, Vanredni profesor, Mikrobiologija sa imunologijom, godina izbora u
26 zvanje 2017, Katedra za mikrobiologiju, Fakultet veterinarske medicine Beograd.

27 5. Dr Dubravka Milanov, viši naučni saradnik, Biotehnologija- veterinarstvo, predklinička
28 veterina, godina izbora u zvanje 2014., Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad.

29
30 II PODACI O KANDIDATU:

31
32 1. Ime, ime jednog roditelja, prezime: Ferenc Ferenca Kiškarolj

33 2. Datum rođenja, opština, Republika: 5. septembar 1972. godine, Bačka Topola, Republika
34 Srbija

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

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

37 III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:

38 „Primena seroloških metoda, multipleks lančane reakcije polimeraze i sekvenciranja gena za
39 16S ribozomalnu RNK u identifikaciji serovarijeteta vrste *Salmonella enterica* podvrsta *enterica*”

40 IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broja strana poglavlja, slika, šema,
41 grafikona i sl.):

42 Doktorska disertacija Ferenca Kiškarolja napisana je na 142 strane kompjuterski obrađenog
43 teksta i sadrži sledeća poglavlja: Uvod (dve strane), Pregled literature (53 strane), Cilj i zadaci
44 istraživanja (dve strane), Materijal i metode (15 strana), Rezultati (23 strane), Diskusija (13
45 strana), Zaključci (dve strane), Spisak literature (31 strana). Naslovna strana na srpskom i
46 engleskom jeziku, podaci o komisiji, zahvalnica, rezime na srpskom i engleskom jeziku, sadržaj
47 disertacije i spisak skraćenica se nalaze na početku doktorske disertacije i nisu numerisani.
48 Biografija i izjave kandidata se nalaze na kraju doktorske disertacije i nisu numerisane.
49 Disertacija je dokumentovana sa 11 slika (u poglavlju materijal i metode 4 slike i u poglavlju
50 rezultati 7 slika) i 25 tabela (u poglavlju pregled literature 9 tabela, u poglavlju materijal i metode
51 9 tabela i u poglavlju rezultati 7 tabela).

52
53 V VREDNOVANJE POJEDINIH DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis
54 svakog poglavlja disertacije: uvoda, pregleda literature, cilja i zadataka istraživanja,
55 materijal i metoda, rezultata, diskusije, spiska referenci):

56
57 U Poglavlju **Uvod**, ukratko su prikazani opšti podaci o salmonelama kao i o njihovom
58 značaju i metodama identifikacije. Za razliku od ostalih pripadnika familije Enterobacteriaceae,

1 svi pripadnici roda *Salmonella* smatraju se striktnim patogenima, samim tim salmonele imaju
2 izuzetan značaj u veterinarskoj i humanoj medicini. Do danas je otkriveno više od 2600
3 serovarijeteta salmonela. Epizootiološki i epidemiološki značaj svih ovih serovarijeteta,
4 međutim, nije jednak. Postoje serovarijeteti koji su specifično adaptirani samo na jednu vrstu
5 domaćina i nisu sposobni da izazovu infekcije kod ostalih vrsta. Tipični primeri su tifus ljudi
6 (*S.Typhi*) ili beli proliv pilića (*S.Gallinarum*). Najveći broj serovarijeteta, ipak, ima sposobnost da
7 izazove oboljenja kod različitih vrsta životinja i ljudi, većinom u obliku akutnog enteritisa sa
8 profuznim prolivima. Postoji razlika u stepenu zoonotskog potencijala različitih serovarijeteta
9 salmonela. Ove razlike su iskazane i u zakonskim regulativama u našoj zemlji i u Evropskoj
10 Uniji, a na osnovu tih zakonskih klauzula preduzimaju se različite mere suzbijanja kod pojedinih
11 serovarijeteta *Salmonella*, zavisno od njihovog značaja po javno zdravlje. Samim tim, pored
12 utvrđivanja prisustva salmonela u ispitanim uzorcima poreklom od životinja, podjednako je bitna
13 i tačna identifikacija prisutnog serovarijeteta. Klasične metode za izolaciju i serotipizaciju
14 salmonela su dugotrajne: sama izolacija zahteva do pet dana dok za preciznu identifikaciju
15 nekada treba jos nekoliko dana više. Sa pojavom molekularno-bioloških metoda, postoji
16 mogućnost detekcije salmonela direktno u uzorcima bez prethodne izolacije, kao i precizno
17 razlikovanje pojedinih serovarijeteta. Trenutno, postoji malo podataka o iskustvima u korišćenju
18 PCR u cilju diferencijacije različitih serovarijeteta salmonele u Republici Srbiji.

19 Poglavlje **Pregled literature**, kandidat je podelio u nekoliko konceptualno različitih
20 delova. U prvom delu, kratko su prikazane osnovne mikrobiološke karakteristike pripadnika
21 familije Enterobacteriaceae. U drugom delu, analizirana je taksonomija salmonela koja je
22 relativno kompleksna jer rod obuhvata 2600 serovarijeteta. U trećem delu razmatrane su
23 površinske strukture salmonela počevši najpre od građe LPS-a u čijem su sastavu je „O“ bočni
24 lanci čija je funkcija u preciznoj identifikaciji salmonela ogromna s obzirom da se serološka
25 identifikacija serovarijeteta salmonela na osnovu White–Kauffmann–Le Minor šeme zasniva na
26 grupisanju izolata na osnovu strukture “O” antigena. Detaljno su razmatrane i struktura i funkcija
27 flagela, jer protein flagelina predstavlja H antigen u okviru Kaufmann-White-Le Minor šeme za
28 serotipizaciju salmonela. Kod većine serovarijeteta koje eksprimiraju flagele postoji dve različite
29 grupe flagelarnih antigena označenih sa H1 i H2, koji su vezani za flagelarnu fazu 1 i 2.
30 Flagelarni antigeni bifaznih serovarijeteta *S. enterica* su fazno promenljivi. Predstavnici bifaznih
31 serovarijeteta su sposobni da menjaju ekspresiju gena između subjedinica flagelina *fliC* (faza 1)
32 i *fliB* (faza 2). Proces kodiraju *fljA*, *hin* i *fljB* geni koji omogućavaju naizmeničnu ekspresiju
33 flagelnog antigena faze 1 i faze 2, što znači da su na površini jedne bakterijske ćelije u
34 određenom trenutku prisutne samo flagele jedne faze. Sve to ima značajnog uticaja na
35 mogućnost precizne identifikacije serovarijeteta. S obzirom da se u doktorskoj disertaciji
36 kandidat bavio molekularnim metodama, u trećem delu ovog poglavlja analiziran je i genom
37 salmonela, ukoliko su prikazane karakteristike suštinskog (stalnog) i varijabilnog (akcesornog)
38 genoma. Varijabilni deo genoma koji sadrži genska ostrva patogenosti, elemente profaga,
39 plazmide i insercione sekvence otežava primenu molekularnih metoda u preciznoj identifikaciji
40 serovarijeteta, upravo zato što je nestalan. U četvrom delu ovog poglavlja ukoliko je analizirana
41 sposobnost salmonela da prežive u različitim uslovima sredine, a u nekoliko rečenica je
42 prikazana i epidemiologija salmoneloze. Najveći akcenat stavljen je na poslednji deo ovog
43 poglavlja, a to je laboratorijska detekcija salmonela. Kandidat je najpre analizirao postojeće
44 pristupe i metode za tipizaciju salmonela, a zatim je analizirao novije pristupe primenom
45 molekularnih metoda, a to su: Gel elektroforeza u pulsirajućem strujnom polju (PFGE),
46 ribotipizacija, PCR za nasumičnu amplifikaciju polimorfne DNK (eng.: *Random amplified*
47 *polymorphic DNA-PCR - RAPD-PCR*), PCR ponavljajućih elemenata (eng.: *Repetitive element*
48 *PCR - Rep-PCR*), PCR-polimorfizam različite dužine restrikcionih fragmenata (eng.: *PCR-*
49 *restriction fragment length polymorphism - PCR-RFLP*), Polimorfizam umnoženih fragmenata
50 (eng.: *Amplified Fragment Length Polymorphism - AFLP*), MLVA (*Multiple-Locus Variable*
51 *number tandem repeat Analysis*), Tipizacija sekvenciranjem više lokusa (eng.: *multilocus*
52 *sequence typing - MLST*).

53 U poglavlju **Cilj i zadaci istraživanja** navodi se da su istraživanja u okviru doktorske
54 disertacije imala za cilj preciznu identifikaciju serovarijeteta salmonela koje su prisutne u
55 uzorcima poreklom od domaćih životinja na području Severnobačkog i Severnobanatskog
56 okruga u Vojvodini primenom molekularno-bioloških metoda i upoređivanje ovih rezultata sa
57 rezultatima dobijenih klasičnim bakteriološkim i serološkim pristupom. Za ostvarivanje ovih
58 ciljeva postavljeni su sledeći zadaci:

- 1 1 Prikupljanje izolata *Salmonella enterica* ssp. *enterica* tokom rutinskog rada u
- 2 laboratoriji Veterinarskog specijalističkog instituta "Subotica" primenom
- 3 klasičnih bakterioloških metoda;
- 4 2 Identifikacija izolata na osnovu njihovih morfoloških i biohemijskih
- 5 karakteristika;
- 6 3 Klasična serotipizacija izolata salmonela;
- 7 4 Primena PCR metoda za identifikaciju određenih serovarijeteta;
- 8 5 Određivanje nivoa efikasnosti primene sekvenciranja gena za 16S rRNK u
- 9 identifikaciji izolata salmonela;
- 10 6 Upoređivanje rezultata klasične serotipizacije sa rezultatima molekularno-
- 11 bioloških metoda.
- 12

13 U poglavlju **Materijal i metode**, kandidat predstavlja detalje eksperimentalnog rada.
 14 Istraživanjem je obuhvaćeno 107 izolata *Salmonella enterica* subsp. *enterica* izolovanih iz
 15 uzoraka poreklom od domaćih životinja, hrane životinjskog porekla i hrane za životinje, koji su
 16 pristigli u mikrobiološku laboratoriju VSI „Subotica“ sa njegovog epizootiološkog područja u
 17 periodu od 2013-2016. godine.

18 *Izolacija i identifikacija salmonela primenom klasičnih mikrobioloških metoda*

19 Pri izolaciji *Salmonella enterica* subsp. *enterica* korišćene su različite metode u zavisnosti od
 20 vrste uzoraka. U slučaju uzoraka fecesa i briseva iz objekata upotrebljena je metoda SRPS EN
 21 ISO 6579:2008, Prilog D - Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Otkrivanje *Salmonella spp.*
 22 u fecesu životinja i u uzorcima iz životne sredine u primarnoj fazi proizvodnje. Predobogaćenje
 23 uzorka je vršeno u puferisanoj peptonskoj vodi (BPW, proizvođač Oxoid, Ujedinjeno
 24 Kraljevstvo) inkubacijom na 37±1 °C u periodu od 18±2 časa. Selektivno obogaćenje vršeno je
 25 na Rappaport-Vassiliadis polučvrstom agaru (MSRV, proizvođač Oxoid, Ujedinjeno Kraljevstvo).
 26 Ploče su inkubirane na temperaturi od 41,5±1 °C. Zatim je vršeno presejavanje na selektivne
 27 diferencijalne podloge-ksiloza lizin dezoksiholatni agara (XLD, proizvođač Oxoid, Ujedinjeno
 28 Kraljevstvo) i Rambach agar (proizvođač Merck Millipore, SAD).

29 Uzorci trupova zaklanih životinja i stočne hrane su ispitani metodom SRPS EN ISO 6579:2008 -
 30 Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella spp.*
 31 Predobogaćenje je vršeno na isti način kao kod prethodne metode.

32 Selektivno obogaćenje vršeno je u Rappaport-Vassiliadis bujonu sa sojom (RVS bujon,
 33 proizvođač Oxoid, Ujedinjeno Kraljevstvo), i Muller-Kauffmann tetrationsat/novobiocin bujonu
 34 (MKTT bujon, proizvođač Oxoid, Ujedinjeno Kraljevstvo). Zasejani RVS bujon se inkubirao na
 35 41,5±1 °C 24±3 tokom časa, a MKTT bujon na 37±1 °C tokom 24±3 časa. Kulture iz obe
 36 selektivne tečne podloge su presejavane XLD i Rambach ploče opisane u prethodnoj metodi.

37 Pri ispitivanju uzoraka unutrašnjih organa životinja primenjena je metoda opisana u poglavlju
 38 2.9.9 priručnika OIE a upotrebljene su podloge koje su već prethodno nabrojane.

39 Preliminarna biohemijska identifikacija je vršena zasejavanjem na trostruki šećer/gvožđe agar
 40 (Triple Sugar Iron Agar – TSI agar, Oxoid, Ujedinjeno Kraljevstvo). Za konačnu biohemijsku
 41 identifikaciju izolovanih sojeva salmonela korišćen je biohemijski niz opisan u metodi SRPS EN
 42 ISO 6579:2008 - Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za otkrivanje
 43 *Salmonella spp.*: proizvodnja indola iz triptofana, metil crveno reakcija, Voges-Proskauer
 44 reakcija, razlaganje uree, dekarboksilacija lizina i razlaganje orto nitrofenil β galaktozida.

45 Identifikacija odabranih sojeva salmonela potvrđena je i poluautomatskim identifikacionim
 46 sistemom API 20 E (bioMerieux, Francuska) prema uputstvu proizvođača. Kao kontrole ispitani
 47 su i referentne sojevi *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 i *S. Infantis* ATCC 51741.

48 U serološkoj tipizaciji salmonela bili su primenjeni specifični dijagnostički serumi za metodu brze
 49 aglutinacije na pločici (Statens Serum Institut, Danska i Bio-Rad, SAD), a određivanje
 50 serovarijeteta je izvršeno na osnovu White-Kauffmann-Le Minor šeme. Serotip određenih
 51 izolata je potvrđen i u Referentnoj laboratoriji za *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae* i *Yersinia*
 52 *enterocolitica* Instituta za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut".

53 *Kultivacija ispitivanih sojeva salmonela radi izolacije DNK*

54 Radi izolacije DNK odabrani izolati bakterija su gajeni u tečnom Luria –Bertani medijumu (LB
 55 bujon, Becton Dickinson, Ujedinjeno Kraljevstvo), uz aeraciju 12-18 h na 37 °C, na horizontalnoj
 56 rotacionoj mešalici pri 180 obrtaja po minuti.

1 Molekularne metode

2
3 Izolovanje genomske DNK

4 Za izolaciju genomske DNK iz ispitivanih bakterijskih kultura korišćen je *Quick-DNK Universal*

5 kit (Zymo Research Corp., SAD) prema protokolu proizvođača.

6
7 Umnožavanje odabranih gena u reakciji lančane polimeraze
8 (PCR metoda)

9 Korišćeno je sedam parova prajmera za identifikaciju serovarijeteta *Salmonella enterica* subsp.

10 *enterica*. Upotrebljeni oligonukleotidi preuzeti su iz publikacija koje su nabrojane u spisku

11 referenci ove disertacije. Podaci o sekvencama prajmera, segmentima DNK koje umnožavaju

12 (gena i lokusa), pozicijama ovih segmenata u okviru genoma, i veličini očekivanih PCR

13 produkata su prikazani u Tabeli 1. U radu su korišćeni prajmeri proizvođača Invitrogen iz SAD.

14 Sve PCR reakcije su izvođene u ukupnoj zapremini od 30 µl korišćenjem KAPA Taq PCR

15 sistema (KAPA Biosystems Kit, USA). Sastav reakcione smeše pojedinačnih PCR reakcija je

16 prikazan u Tabeli 2. Multipleks PCR reakcije su izvedene u smeši sastava opisanog u Tabeli 3.

17 Uslovi pod kojima su se odvijale PCR reakcije su bile identične i za pojedinačne i za multipleks

18 PCR reakcije, a korišćeni temperaturni režim je naveden u Tabeli 4.

19 Tokom optimizacije PCR reakcija, zatim kasnije kao pozitivne kontrole pri izvođenju

20 umnožavanja karakterističnih delova gena ili lokusa su korišćene su genomske DNK izolovane

21 iz sledećih referentnih sojeva: *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *S. Infantis* ATCC 51741,

22 *S. Typhimurium* ATCC 14028 i *S. Pullorum* ATCC 13036. Kao negativna kontrola PCR reakcije

23 korišćena je DNK *Escherichia coli* ATCC 25922. Sve PCR reakcije su izvedene u aparatu 2720

24 Thermal Cycler (Applied Biosystem, USA). Vizualizacija PCR produkata je izvršena

25 elektroforezom na gelu agaroze (1,2%).

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

1 Tabela 1: Lista upotrebljenih prajmera sa naznačenim ciljnim DNK sekvencama, veličinom PCR
 2 produkata, ciljnim serovarijetetima i pristupni broj i pozicija nukleotida

Prajmer	5'-3' sekvenca	Ciljani gen ili lokus	Veličina PCR produkta	Ciljana vrsta / Serovarijetet	Pristupni broj i pozicija nukleotida
bcfC-F	GGGTGGGCGGAAAA CTATTTC	<i>bcfC</i> ¹	993 bp	Sve <i>S. enterica</i>	AM933172 25655-26657
bcfC-R	CGGCACGGCGGAAT AGAGCAC				
heli-F	ACAGCCCGCTGTTTA ATGGTG	<i>heli</i> ²	782 bp	Heidelberg	CP005995 3226024-3226805
heli-R	CGCGTAATCGAGTAG TTGCC				
steB -F	TGTCGACTGGGACCC GCCC GCCCGC	<i>steB</i> ³	636 bp	Enteritidis, Heidelberg, Kentucky, Gallinarum biotip Gallinarum, pripadnici Grupe 1 po referenci.	AM933173 2976016-2976651
steB-R	CCATCTTGTAGCGCA CCAT				
rhs-F	TCGTTTACGGCATT CACAAGTA	rhs lokus	402 bp	Gallinarum oba biotipa	AM933173 334109-334510
rhs -R	CAAACCCAGAGCCAA TCTTATCT				
sdf-F	TGTGTTTTATCTGATG CAAGAG	sdf lokus	293 bp	Enteritidis	AF370716 4950-3242
sdf-R	CGTTCTTCTGGTACT TCAGATGAC				
gly-F	TTCCAATTGAAACGA GTGCCG	<i>gly</i> ⁴	170 bp	Kentucky	ABE10100007 116981-117150
gly-R	ACTAACCGCTTGGGT TGTTGCTGT				
558f	AACAACGACAGCTTA TGCCG	<i>fljB</i> ⁵	727 bp	Infantis	
1275r	CCACCTGCGCCAA CGCT				

3 ¹*bcfC* – gen proteina sa ulogom u biogenezi fimbrija; ²*heli* – otvoreni okvir čitanja predviđene, tj. hipotetičke
 4 helikaze; ³*steB* – gen fimbrijalnog proteina; ⁴*gly* – otvoreni okvir čitanja predviđenog, odnosno hipotetičkog
 5 membranskog proteina; ⁵ *fljB* – gen flagelina druge faze.

6 Tabela 2: Sastav smeše pojedinačne PCR reakcije

Komponenta	Finalna koncentracija
10X KAPA Taq Pufer B	1X
10 mM dNTP Mix	0,2 mM svaki
10 µM Prajmer F	0,4 µM
10 µM Prajmer R	0,4 µM
5 U/µl KAPA Taq DNK Polimeraza	1 U
DNK matrica	do 250 ng

8 Tabela 3: Sastav smeše za optimizovanu multipleks PCR reakciju
 9

Komponenta	Finalna koncentracija
10X KAPA Taq Pufer B	1X
10 mM dNTP Mix	0,3 mM svaki
10 µM <i>bcfC</i> -F	0,4 µM
10 µM <i>bcfC</i> -R	0,4 µM
10 µM <i>steB</i> -F	0,4 µM
10 µM <i>steB</i> -R	0,4 µM
10 µM <i>sdf</i> -F	0,4 µM
10 µM <i>sdf</i> -R	0,4 µM
5 U/µl KAPA Taq DNK Polimeraza	2,5 U
DNK matrica	do 250 ng

1 Kako pojedinačne, tako i multipleks PCR reakcije su izvedene pod istim uslovima. Primenjeni
 2 temperaturni režim je bio sledeći: Inicijalna denaturacija na 95°C 10 minuta, 35 ciklusa
 3 denaturacija 95°C 30 sekundi, hiubridizacija 57°C 30 sekundi, elongacija 72°C 70 sekundi,
 4 finalna ekstenzija 72°C 3 minuta.

6 *Horizontalna elektroforeza u agarozu*

7 Kvalitet i uspešnost izolacije genomske DNK, kao i rezultati PCR reakcija su analizirani
 8 horizontalnom elektroforezom na agaroznim gelovima. Za pravljenje gela korišćen je 1,2 %
 9 rastvor agaroze (Serva, Nemačka) u 1× TBE puferu. Kao stok pufera korišćen je 10×TBE pufera
 10 sledećeg sastava: 109 g Tris, 55,6 g borne kiseline i 9,3 g EDTA u 1 l destilovane vode, pH 8. U
 11 gel je dodavan etidijum bromid u finalnoj koncentraciji od 0,5 µg/ml.

12 Veličina DNK fragmenata nakon PCR amplifikacije gena je procenjena poređenjem sa
 13 elektroforetskom pokretljivošću standarda O'Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder i GeneRuler
 14 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, SAD). Očekivane dužine DNK fragmenta nakon PCR
 15 amplifikacije gena su bile sledeće: ~1500 bp (16S rRNK), 993 bp (*bcrC*), 782 bp (heli ORF), 727
 16 bp (*fljB*), 636 bp (*steB*), 402 bp (*rhs* lokus), 293 bp (*sdf* lokus) i 170 bp (*gly* ORF) (Tabela
 17 20). Elektroforetsko razdvajanje vršeno je pri konstantnom naponu električnog polja od 9V po
 18 dužnom centimetru gela. Nakon završetka elektroforeze, detekcija fragmenata DNK je vršena
 19 pod UV svetlom talasne dužine 260 nm (BioDoc Analyze, Biometra, Nemačka).

21 *In silico analiza*

22 U cilju dobijanja *in silico* PCR profila serovarijeta S. Derby, S. Havana, S. Infantis,
 23 S. Mbandaka, S. Livingstone, S. Senftenberg, S. Tennessee, S. Lille i S. Virchow njihovi genomi
 24 su pretraženi na prisustvo DNK sekvenci koje se specifično umnožavaju primenom korišćenih
 25 prajmera. Poklapanje sekvenci je izvršeno koristeći BLAST algoritam. Podaci za sekvence svih
 26 genoma su obezbeđeni sa NCBI stranice (www.ncbi.nlm.nih.gov) i bili su sledeći: (GenBank:
 27 LAZB000000000.1) za S. Derby, (GenBank: JWQJ000000000.1) za S. Havana, (GenBank:
 28 LN649235.1) za S. Infantis, (GenBank: AMRS01000002) za S. Mbandaka, (GenBank:
 29 JZWK000000000.1) za S. Livingstone, (GenBank: CAGQ000000000.1) za S. Senftenberg,
 30 (GenBank: CP007505.1) za S. Tennessee, (GenBank JQWF000000000.1) za S. Lille i (GenBank:
 31 MP000000000.1) za S. Virchow.

33 *Sekvenciranje gena za 16S rRNK*

34 *Umnožavanje dela gena za 16S rRNK*

35 Umnožavanje dela gena za 16S rRNK rađeno je lančanom reakcijom polimerizacije korišćenjem
 36 univerzalnih bakterijskih prajmera objavljenih u radu Weisburga i saradnika. Njihova sekvenca,
 37 ciljani gen i veličina očekivanog PCR produkta su navedeni u Tabeli 5. Reakciona smeša je
 38 pripremljena prema uputstvu proizvođača korišćenog KAPA Taq PCR Kit sistema.

40 Tabela 4: Sekvence prajmera korišćenih za umnožavanje gena za 16S rRNK.

Prajmer	5'-3' sekvenca	Ciljna sekvenca	Veličina produkta (bp)	PCR Ref.
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	gen za 16S rRNK	~1500 bp	(Error! Reference source not found.)
1492r	CGGCTACCTTGTTACGACTT			

46 Tabela 5: Sastav smeše PCR reakcije za umnožavanje gena za 16S rRNK.

Komponenta	Finalna zaprema 50 µl	Finalna koncentracija
PCR voda	Do 50 µl	N/A
10X KAPA Taq Pufer sa 25 mM MgCl ₂	5,0 µl	1X

10 mM dNTP Mix	1 µl	0,2 mM svaki
10 µM 27f	2 µl	0,4 µM
10 µM 1492r	2 µl	0,4 µM
5 U/µl KAPA Taq DNK Polimeraza	0,2 µl	1 U
DNK matrica	X µl	~ 50-250 ng

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
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53

Primenjeni temperaturni režim za umnožavanje gena za 16S rRNK. je bio sledeći: Inicijalna denaturacija na 95°C 3 minuta, 35 ciklusa denaturacija 95°C 30 sekundi, hibridizacija 55°C 90 sekundi, elongacija 72°C 60 sekundi, finalna ekstenzija 72°C 3 minuta.

Prečišćavanje PCR proizvoda

Po završetku lančane reakcije polimerizacije, uzorci su analizirani horizontalnom gel elektroforezom na 1% agaroznom gelu. PCR proizvod je prečišćen primenom QIAquick® PCR Purification Kit sistema (Hilden, Nemačka) prema uputstvu proizvođača.

Određivanje koncentracije DNK

Koncentracija DNK je proverena spot testom, nanošenjem 1 µl izolovane DNK i DNK standardnih koncentracija (2, 5, 10 i 20 ng/µl λ DNK) na 1% agaroznu podlogu sa dodatkom 0,5 µg/ml etidijum-bromida. Nakon 20 minuta inkubacije, koncentracija je određena osvetljavanjem UV svetlošću talasne dužine 260 nm (BioDoc Analyze, Biometra, Nemačka).

Sekvenciranje umnoženog gena za 16S rRNK

Sekvenciranje umnoženih 16S rRNK gena rađeno je na aparatu Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Foster City, SAD), uz upotrebu komercijalnog kita za sekvenciranje BigDye Terminator v3.2 Cycle Sequencing kompanije Applied Biosystems (Foster City, SAD). Reakciona smeša za sekvenciranje sadržala je 3 µl Ready Reaction Mix-a iz komercijalnog kita za sekvenciranje (BigDye Terminator v3.2 Cycle Sequencing kompanije Applied Biosystems, Foster Siti, SAD), 3,2 pmol prajmera (27f ili 1492r), 10 ng DNK matrice, i destilovane vode do finalne zapremine od 8 µl.

Umnožavanje je rađeno u PCR aparatu Applied Biosystems 2720 Thermocycler (Foster City, SAD).

Primenjeni temperaturni režim za sekvenciranje. je bio sledeći: Inicijalna denaturacija na 96°C 1 minut, 25 ciklusa denaturacija 96°C 10 sekundi, hibridizacija 50°C 5 sekundi, elongacija 60°C 4 minuta.

Dobijeni produkti su prečišćavani dodavanjem 40 µl rastvora A (1,2 ml 3M CH₃COONa, 25 ml etanola, 5,8 ml destilovane vode) i centrifugiranjem u trajanju od 10 min na 13000 obrtaja/min. Nakon odlivanja supernatanta talog je ispiran sa 200 µl 70% etanola uz centrifugiranje pod istim uslovima. Ovaj korak je dva puta ponovljen. Talog je potom osušen i rastvoren u 25 µl visoko dejonizovanom (Highly Deionised - HiDi) formamidu. Analiza sekvenci rađena je na aparatu Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer korišćenjem softverskog paketa SeqAnalyzer.

Dobijene sekvence 16S rRNK gena preklapljenе su SeqMan alatom iz DNASTar softvera (Lasergene). Preklapljenе sekvence 16S rRNK gena su poređene sa deponovanim sekvencama u GenBank bazi podataka upotrebom BLASTx 2.3.1 alatke.

Poglavlje **Rezultati** je, shodno postavljenim zadacima istraživanja, kao i kompleksnoj metodologiji rada, podeljeno u nekoliko potpoglavlja.

U **prvom** potpoglavlju kandidat je prikazao rezultate izolacije, identifikacije i klasične serotipizacije ispitivanih *Salmonella*. Klasičnom serotipizacijom od ispitanih 107 *Salmonella* izolata njih 52 su identifikovana kao *S. Infantis*, 33 kao *S. Enteritidis*, 5 kao *S. Tennessee*, 4 kao *S. Mbandaka*, 3 kao *S. Montevideo*, 2 kao *S. Havana*, 2 kao *S. Lille*, 2 kao *S. Senftenberg*, i po jedan od sledećih serovarijeteta: *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Derby*, i *S. Livingstone*. U **drugom** potpoglavlju prikazani su rezultati optimizacije pojedinačnih (simplex) PCR reakcija za umnožavanje odabranih ciljnih sekvenci. Naime, polazna osnova ovog istraživanja bila je prethodno publikovana šema koja je napravljena na bazi komparacije 3161 genomskih sekvenci 108 različitih *Salmonella enterica* serovarijeteta. Ovih šest parova prajmera su u originalnom radu stvorili jedinstvene profile traka omogućujući identifikaciju *S. Enteritidis* (pozitivan na *bcfC*, *steB*, *sdf*), *S. Heidelberg* (pozitivan na *bcfC*, *heli*, *steB*), *S. Kentucky* (pozitivan na *bcfC*, *steB*, *gly*), dva biotipa *S. Gallinarum* – *Gallinarum* (pozitivan na *bcfC*, *steB*, *rhs*) i *Pullorum* (pozitivan na *bcfC*, *rhs*). Pored toga preostala 104 serovarijeteta *S. enterica*, čiji genomi su uzeti u obzir

1 tokom dizajniranja prajmera, na osnovu svojih profila traka mogli su se razvrstati u dve grupe.
2 Ova dva klastera su se označili kao Grupa 1 i Grupa 2 prema njihovim PCR profilima, koji se
3 karakterišu sa amplifikacijom dva gena (*bcfC*, *steB*) ili samo *bcfC* gena. Optimizacija uslova za
4 izvođenje ovih reakcija i verifikacija dužina PCR produkata vršene su na genomskoj DNK
5 komercijalno pribavljenih ATCC sojeva *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis,
6 Typhimurium i Gallinarum biotip Pullorum. U svim reakcijama je korišćena DNK ATCC soja
7 *Escherichia coli* u svojstvu negativne kontrole. Preostala dva para prajmera preuzeta iz
8 literature, za umnožavanje ciljnih sekvenci unutar otvorenih okvira čitanja heli i gly su takođe
9 testirana sa sva četiri referentna soja salmonele i *E. coli*. U ovim reakcijama, shodno
10 očekivanom, nije bilo umnožavanja. Iako među izolatima sakupljenih za potrebe ovog
11 istraživanja serovarijeteti *S. Heidelberg* i *S. Kentucky* nisu bili prisutni, pojedinačne PCR
12 reakcije sa ovim parovima prajmera su ipak urađene za sve izolate u okviru ove preliminarne
13 faze. Ovi testovi su takođe dali očekivani negativan rezultat (rezultati nisu prikazani), pa su,
14 shodno tome, ta dva para prajmera isključena iz daljih ispitivanja, odnosno nisu korišćeni u
15 optimizaciji multipleks PCR protokola. U **trećem** potpoglavlju prikazani su rezultati *in silico*
16 analiza. *S. Infantis*, jedan od najčešće izolovanih salmonela serovarijeteta u Srbiji i najbrojniji
17 među sojevima ispitanim u ovom radu, ali taj serovarijetet nije korišćen u prethodno
18 publikovanim korišćenim u ovoj disertaciji. Zato, da bi se utvrdio očekivani PCR profil *S. Infantis*,
19 sekvenca genoma ovog serovarijeteta je ispitana *in silico* na prisustvo šest odabranih DNK
20 sekvenci. Prema bioinformatičkoj analizi kod *S. Infantis* je utvrđeno postojanje samo *bcfC* gena,
21 koji gen je specifičan za rod *Salmonella*. Shodno ovim rezultatima jasno je bilo da ovih šest
22 parova prajmera ne formiraju jedinstveni PCR profil za *S. Infantis*, već da ovaj serovarijetet
23 pripada Grupi 2. I ostali serovarijeteti, koji su identifikovani klasičnom serotipizacijom među
24 ispitanim izolatima ove disertacije (*S. Derby*, *S. Havana*, *S. Livingstone*, *S. Mbandaka*, i
25 *S. Senftenberg*), podvrgnuti su *in silico* analizi. Dobijeni rezultati su pokazali da, izuzev
26 *S. Livingstone*, svi ovi serovarijeteti spadaju u Grupu 1 (*bcfC* i *steB* pozitivni).
27 *In silico* analiza genoma *S. Livingstone* dala je neočekivan rezultat: kombinacija predviđenih
28 PCR produkata dobijena ispitivanjem genoma ovog serovarijeteta se poklopila sa profilom traka
29 koji smatrani jedinstvenim za *S. Gallinarum* biotip *Gallinarum*, uzročnika tifa kokoši (*bcfC*, *steB* i
30 *rhs* pozitivni). Zbog ovog zapažanja izvedene su pojedinačne PCR reakcije za specifično
31 umnožavanje ciljne sekvence *rhs* lokusa sa DNK svih ispitanih izolata da se isključi
32 neočekivano prisustvo ovog PCR produkta kod nekog izolata osim *S. Livingstone*. Rezultati ovih
33 pretraga su bili u skladu sa predviđanjem *in silico*: PCR produkt karakteristične dužine se
34 pojavio samo kod soja *S. Livingstone*, dok svi ostali izolati bili PCR negativni na *rhs* lokus. Mada
35 serovarijeteta *S. Virchow* nije bilo među ispitanim izolatima, njegov PCR profil je proveren zbog
36 velike antigenske srodnosti ovog serovarijeteta sa *S. Infantis*, zatim zbog činjenice, da prema
37 Pravilniku takođe spada u salmonele druge kategorije. *In silico* analizom je utvrđeno da se
38 *S. Virchow* svrstava u Grupu 1 za razliku od *S. Infantis*, koja pripada Grupi 2, samim tim
39 izabrani način analize genoma ih jasno razlikuje uprkos njihovoj antigenskoj sličnosti.
40 U **četvrtom** potpoglavlju prikazani su rezultati optimizacije simpleks PCR reakcije za
41 identifikaciju *S. Infantis*. U **petom** potpoglavlju su na osnovu rezultata optimizacije PCR reakcija
42 i *in silico* analiza prikazani očekivani PCR profili ispitivanih serovarijeteta. U **šestom**
43 potpoglavlju prikazani su rezultati optimizacije multipleks PCR reakcije. U toku optimizacije
44 multipleks PCR reakcije testirano je više parova prajmera (dva do pet parova) u različitim
45 kombinacijama, u različitom sastavu reakcione smeše (različite koncentracije dNTP-a, enzima i
46 različite kombinacije prajmera), kao i različite protokole PCR ciklusa (različite temperature
47 hibridizacije) koristeći KAPA Taq PCR sistem (KAPA Biosystems, USA).
48 Optimizacija uslova za PCR reakciju sa korišćenim sistemom sa svih pet parova prajmera na
49 način da rezultati budu pouzdano ponovljivi – nije bila uspešna. Maksimalan broj parova
50 prajmera, sa kojim su rezultati multipleks PCR reakcije bili jasni, predstavljao je tri. Uzevši u
51 obzir ovo ograničenje, zatim uopšteno značaj pojedinih serovarijeteta, kao i njihovu zastupljenost
52 među ispitanim izolatima, odlučeno je da se optimizuje tripleks PCR protokol koji bi obuhvatao
53 parove prajmera za umnožavanje *bcfC* i *steB* gena i *sdf* lokusa. Ova kombinacija omogućava
54 identifikaciju *S. Enteritidis*, kao najvažnijeg i najzastupljenijeg serovarijeteta, u jednom koraku.
55 Definisani su i serovarijeteti predstavnici Grupe 1: *Livingstone*, *Senftenberg*, *Havana*,
56 *Mbandaka*, *Derby*, *Tennessee*, *Lille*, *Agona*, *Wirchow*, *Hadar*, *Paratyphi A*, *Paratyphi B* var. *Java*,
57 *Abortusequi*, *Abortusovis*, *Saintpaul*, *Stanleyville*, *Typhisuis*, *Braenderup*, *Choleaesuis*, *Ohio*,
58 *Thompson*, *Muenchen*, *Newport*, *Berta*, *Dublin*, *Panama*, *Typhi*, *Agoueve* i *Cerro*. Serovarijeteti

1 predstavnicima Grupe 2: Infantis, Typhimurium, Montevideo, Schwarzengrund, Bareilly, Hartford,
2 Oranienburg, Javiana, Mississippi i Pomona. Elektroforeza u agaroznom gelu pokazivala je da
3 su parovi prajmera bili u stanju da umnožavaju očekivane specifične ciljne sekvence DNK i da
4 se PCR produkti razdvajaju u jasne trake i u uslovima multipleks sredine. Ova PCR reakcija
5 omogućava nedvosmisleno identifikaciju *S. Enteritidis* čiji genom sadrži sve tri ciljne sekvence.
6 Ostali serovarijeteti se ovom metodom svrstaju na osnovu svojih PCR profila u dve grupe:
7 odsustvo produkta od 293-bp (*sdf* lokus) ukazalo na to da izolat pripada Grupi 1 u kojoj se sada
8 nalazi i serovarijetet Livingstone, kao i Gallinarum biotip Gallinarum. Ako se samo umnožio *bcfC*
9 gen izolat je mogao biti član Grupe 2 koja uključuje i Gallinarum biotip Pullorum, kao i
10 *S. Infantis*. Na ovaj način dva biotipa serovarijeteta Gallinarum su razdvojena u različite grupe.

11 **U sedmom** potpoglavlju prikazani su rezultati PCR identifikacije *S. Infantis*. Kao što je to
12 navedeno, *In silico* analiza je pokazala da *S. Infantis* poseduje PCR profil karakterističan za
13 Grupu 2, a to je potvrđeno i pojedinačnim PCR reakcijama. Zbog toga, za identifikaciju
14 *S. Infantis* među izolatima iz Grupe 2, sojevi koji su dali multipleks PCR profil karakterističan za
15 ovu grupu umnožavani su u pojedinačnoj PCR reakciji specifičnoj za *S. Infantis*. Štaviše, zbog
16 validacije PCR protokola svih 107 izolata su testirani u ovoj reakciji. Ni jedan od izolata koji su
17 na osnovu rezultata ispitivanja multipleks PCR tehnikom identifikovani kao *S. Enteritidis*, ili su
18 spadali u Grupu 1 nisu pokazali prisustvo segmenta *fljB* gena specifičnog za *S. Infantis*. **U**
19 **osmom** potpoglavlju prikazani su rezultati identifikacije ispitanih izolata multipleks PCR
20 reakcijom. Među 107 izolata ispitanih multipleks PCR-om njih 31 je u svom PCR profilu dao
21 pozitivnu reakciju na ciljne sekvence *bcfC* i *steB* gena, kao i *sdf* lokusa. Upoređujući dobijene
22 rezultate sa očekivanim PCR profilima ovi sojevi su identifikovani kao *S. Enteritidis*. U slučaju
23 20 izolata umnožavale su se samo sekvence dužine karakteristične za *bcfC* i *steB* gene. Po
24 ovom profilu traka oni spadaju u Grupu 1. Dalje, kod 50 ispitanih sojeva umnožen je samo *bcfC*
25 gen. Među očekivanim PCR profilima ovaj scenario odgovara Grupi 1. Preostalih šest izolata je
26 pokazalo neobične multipleks PCR profile, to jest kombinaciju traka koja se nije očekivala niti na
27 osnovu podataka preuzetih iz izvornog rada (Zhu i saradnika), niti na osnovu naših
28 preliminarnih ispitivanja i *in silico* analiza. Kod njih su pozitivne bile PCR reakcije na *bcfC* gen i
29 na *sdf* lokus, ali traka karakteristična za *steB* gen nije se pojavila. Prema tome identifikacija ovih
30 poslednjih izolata nije bila moguća na osnovu rezultata multipleks PCR reakcije. Osamnaest
31 izolata koji spadaju u manje učestale serovarijetete (*S. Tennessee* (5), *S. Mbandaka* (4)
32 *S. Havana* (2), *S. Lille* (2), *S. Senftenberg*(2), *S. Agona*, *S. Derby*, *S. Livingstone*) multipleks
33 PCR je svrstao u Grupu 1, kako je to i bilo predviđeno *in silico* analizom, odnosno na osnovu
34 podataka iz literature. U **devetom** potpoglavlju prikazani su rezultati pojedinačne PCR reakcije
35 specifične na identifikaciju *S. Infantis*. U slučaju 39 od 50 izolata predstavnika Grupe 2 dobijen
36 je karakterističan PCR produkt *fljB* gena. Ovi sojevi su imali, nakon izvršene multipleks i
37 pojedinačne PCR reakcije, zbirni PCR profil pozitivan na *bcfC* i *fljB* gene. Prema utvrđenim
38 kriterijumima su, dakle, identifikovani kao *S. Infantis*. Ostalih 11 izolata je bilo negativno u
39 pojedinačnom PCR-u usmerenim na identifikaciju *S. Infantis*. Ovi sojevi su i nakon ove dodatne
40 reakcije ostali samo sa trakom karakterističnom na *bcfC* gen u svom PCR profilu, prema tome
41 konačno su ostali u Grupi 2.

42 U **desetom** potpoglavlju izvršeno je poređenje rezultata klasične serotipizacije i PCR reakcija.
43 PCR metodom su identifikovana dva izolata manje kao *S. Enteritidis* u odnosu na klasičnu
44 serotipizaciju (33 izolata). Ta dva izolata prema rezultatima multipleks PCR-a pripadali su Grupi
45 1 pošto im nedostaje PCR produkt *sdf* lokusa, koji je karakterističan za *S. Enteritidis*. U slučaju
46 *S. Infantis* rezultati su se razlikovali u većoj meri. Dok je klasičnom serotipizacijom 52 izolata
47 identifikovano kao *S. Infantis*, dobijeni PCR profili su odgovarali ovom serovarijetetu samo u 39
48 slučajeva. Broj sojeva koji su identifikovani serološki kao *S. Infantis* je bio veći od ukupnog broja
49 sojeva u okviru grupe 2, kojoj po svom multipleks PCR profilu *S. Infantis* pripada. Preostalih
50 trinaest izolata klasičnom serotipizacijom identifikovanih kao *S. Infantis* mogu se podeliti na
51 osnovu svojih PCR profila u dve grupe. Sedam njih je svrstano u Grupu 2 zbog nedostatka
52 amplifikacije dela *fljB* gena. Ostalih šest sojeva nije bilo moguće identifikovati na osnovu
53 dobijenog profila traka. Interesantno je, da su svih šest sojeva iz ove grupe pokazali istovetni
54 neočekivani multipleks PCR profil – pozitivni su bili na *bcfC* i *sdf*, negativni na *steB*, a kada su
55 testirani na *fljB* dali su produkt dužine 727 bp. Četiri izolata od 11 iz Grupe 2, koji su bili
56 negativni u *fljB* PCR-u, pokazali su se karakterističnim pripadnicima svoje grupe: njih tri su bili
57 *S. Montevideo*, a četvrti *S. Typhimurium* prema klasičnoj serotipizaciji

1 . U poglavlju **Diskusija** kandidat je detaljno analizirao dobijene rezultate i dao kritički
2 osvrt upoređujući ih sa rezultatima drugih istraživanja prikazanim u navedenoj literaturi.

3 U poglavlju **Spisak literature** kandidat je naveo 258 referenci koje je koristio tokom
4 izrade svoje doktorske disertacije.

5 6 7 **VI ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA (navesti zaključke koji su prikazani u doktorskoj** 8 **disertaciji):**

9 Na osnovu rezultata istraživanja u okviru ove disertacije izvedeni su sledeći zaključci:

- 10 1. Od ispitanih 107 izolata *Salmonella*, klasičnom serotipizacijom je identifikovano
11 njih 52 kao S. Infantis, 33 kao S. Enteritidis, 5 kao S. Tennessee, 4 kao S.
12 Mbandaka, 3 kao S. Montevideo, 2 kao S. Havana, 2 kao S. Lille, 2 kao S.
13 Senftenberg, i po jedan od sledećih serovarijeteta: S. Typhimurium, S. Agona, S.
14 Derby, i S. Livingstone.
- 15 2. Na osnovu zastupljenosti serovarijeteta, a korišćenjem prajmera koji su već opisani
16 u literaturi, razvijen je tripleks PCR za identifikaciju S. Enteritidis odnosno za
17 identifikaciju izolata kandidata za simpleks PCR za identifikaciju S. Infantis.
- 18 3. Primenom tripleks PCR protokola identifikovan je 31 izolat kao S. Enteritidis dok je
19 klasičnom serotipizacijom 33 izolata identifikovano kao S. Enteritidis, što pokazuje
20 94% preklapanja između ove dve metode.
- 21 4. Dva izolata koja su u klasičnoj serotipizaciji identifikovana kao S. Enteritidis,
22 molekularnom tehnikom nisu identifikovana kao S. Enteritidis zbog odsustva
23 umnožavanja sdf lokusa tipičnog za ovaj serovarijetet. Razlog nepoklapanja
24 rezultata PCR i klasične serotipizacije može biti posledica toga što se marker geni,
25 u ovom slučaju sdf lokus, koji se koriste za identifikaciju serovarijeteta PCR
26 metodom, često nalaze na mobilnim genetskim elementima.
- 27 5. Rezultati dvostepene identifikacije S. Infantis PCR metodom, upotrebom literaturno
28 opisanih prajmera koji detektuju varijabilni region fljB gena, značajno su odstupali
29 od rezultata dobijenih klasičnom serotipizacijom. Od ukupno 52 izolata koji su
30 klasičnom serotipizacijom bili identifikovani kao S. Infantis, njih 39 je potvrđeno
31 primenom PCR metode, dok kod 13 izolata PCR profil nije odgovarao
32 serovarijetetu S. Infantis. Poklapanje rezultata ove dve metode prilikom
33 identifikacije S. Infantis bilo je 75%.
- 34 6. Za identifikaciju S. Infantis PCR metodom korišćeni su prajmeri koji umnožavaju
35 deo fljB gena koji kodira flagelin druge faze, a koji je karakterističan za S. Infantis i
36 čije se prisustvo detektuje i klasičnom serotipizacijom. Odstupanja u rezultatima
37 identifikacije serovarijeteta S. Infantis mogle bi biti posledica promena na nivou
38 gena koje se ne manifestuju na proteinskom nivou, ali onemogućavaju dobijanje
39 PCR produkta pri datim uslovima.
- 40 7. Pokazano je da je ciljna sekvenca koja je u literaturi smatrana jedinstvenom za S.
41 Gallinarum (oba biotipa) takođe prisutna i kod S. Livingstone.
- 42 8. Optimizovani protokol za tripleks PCR može olakšati kasniju serotipizaciju
43 *Salmonella* jer se primenom ovog protokola može precizno identifikovati S.
44 Enteritidis dok se drugi serovarijeteti *Salmonella* vrsta prisutni na teritoriji R. Srbije
45 mogu svrstati u Grupu 1 ili Grupu 2. Ovakvo grupisanje olakšava dalju ciljanu
46 identifikaciju serovarijeteta salmonela.
- 47 9. Klasična serotipizacija se još uvek može smatrati zlatnim standardom za preciznu
48 identifikaciju serovarijeteta *Salmonella* vrsta.

49 50 **VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li su** 51 **dobijeni rezultati u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li** 52 **zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):**

53
54 Predstavljanje i tumačenje dobijenih rezultata je u skladu sa postavljenim ciljevima i zadacima
55 istraživanja. Dobijeni rezultati su prikazani tabelarno i uz pomoć slika, a njihov opis je dat
56 logičnim redosledom, pregledno, jasnim i razumljivim stilom. Jasno formulisani zaključci
57 proizilaze iz dobijenih rezultata.
58

1 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**

2
3 **1. Da li je disertacija napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme?**

4
5 Doktorska disertacija kandidata Ferenca F.Kiškarolja pod naslovom „Primena seroloških
6 metoda, multipleks lančane reakcije polimeraze i sekvenciranja gena za 16S ribozomalnu RNK
7 u identifikaciji serovarijeteta vrste *Salmonella enterica* podvrste *enterica*” je napisana u skladu
8 sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme.

9
10 **2. Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?**

11
12 Doktorska disertacija kandidata Ferenca F.Kiškarolja pod naslovom „Primena seroloških
13 metoda, multipleks lančane reakcije polimeraze i sekvenciranja gena za 16S ribozomalnu RNK
14 u identifikaciji serovarijeteta vrste *Salmonella enterica* podvrsta *enterica*” sadrži sve elemente
15 propisane za završenu doktorsku disertaciju.

16
17 **3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci**

18
19 Samo precizna identifikacija serovarijeteta salmonela može biti osnova za adekvatan uvid u
20 njihovu regionalnu rasprostranjenost. Nijedan program za kontrolu širenja i suzbijanja
21 salmonela na teritoriji države, ne može biti realno i adekvatno planiran, a posebno ne
22 sproveden, ukoliko nedostaju egzaktni podaci o prevalenciji različitih serovarijeteta, jer su i
23 mehanizmi širenja i opstanka salmonela u organizmu životinja i životnom okruženju, u velikoj
24 meri svojstvo povezano za serovarijetet. Precizna serotipizacija salmonela, koje su uprkos svim
25 nastojanjima i dalje vodeći hranom prenosivi patogeni, polazna je osnova za svaki dalji napor u
26 iznalaženju mera kontrole i profilakse salmoneloza. Broj opisanih serovarijeteta danas već
27 prelazi 2600. Da bi jedna laboratorija bila u mogućnosti za njihovu samostalnu klasičnu
28 serotipizaciju potrebno je da ima preko 250 antiseruma za tipizaciju, zatim da održava mnoštvo
29 referentnih izolata koji bi obezbedili tih više od 350 antigena koji su potrebni za proizvodnju,
30 purifikaciju i kontrolu kvaliteta tih antiseruma. Nažalost ovo opterećenje čak ni sve nacionalne
31 referentne laboratorije ne mogu da podnesu. Samim tim, poznavanje učestalosti pojedinih
32 serovarijeteta salmonela na određenom području u datom vremenu je takođe od značaja za
33 pravilno planiranja zaliha dijagnostikuma za njihovu identifikaciju. Primena molekularnih metoda
34 u identifikaciji salmonela značajno bi uštedela vreme i ekonomska sredstva, ipak, zbog velike
35 antigenske varijabilnosti tj.genske nestabilnosti, primena molekularnih metoda još uvek nije
36 sasvim moguća. Ova doktorska disertacija je dala doprinos razumevanju poteškoća koje se
37 javljaju prilikom identifikacije salmonela primenom PCR i svakako je dobra osnova za nastavak
38 ovakvih istraživanja.

39
40 **4. Da li je mentor tokom provere originalnosti disertacije utvrdio neopravdano**
41 **preklapanje teksta sa drugim publikacijama (odgovoriti sa da ili ne): NE**

42
43 **IX SPISAK NAUČNIH RADOVA SADRŽINSKI POVEZANIH SA DOKTORSKOM**
44 **DISERTACIJOM U KOJIMA JE DOKTORAND PRVI AUTOR ODNOSNO AUTOR SA**
45 **NAJVEĆIM DOPRINOSOM (napisati imena svih autora, godinu objavljivanja, naslov**
46 **rada, naziv časopisa, imapkt faktor i klasifikaciju prema Pravilniku o postupku, načinu**
47 **vrednovanja i kvantitativnom iskazivanju naučnoistraživačkih rezultata istraživača):**

48
49
50 **Kiskaroly F., Morić I., Dokić L., Vasiljević B., Šenerović L., Mišić D., Development of PCR-**
51 **based identification of Salmonella enteric srovars, *Acta veterinaria*, 2017, 67(2),271-284 (IF**
52 **0,604; 2017), M22**

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

X PREDLOG:

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

- da se doktorska disertacija prihvati a kandidatu odobri odbrana

DATUM

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

20.03. 2019.

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

Dr Lidija Šenerović, viši naučni saradnik
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Beograd

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

Dr Marina Radojičić, vanredni profesor
Fakultet Veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

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