

3
4
5 **ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

6
7 **I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ:**

8
9 **1. Датум и назив органа који је именовео комисију:**

10 Наставно-научно веће Факултета ветеринарске медицине у Београду, 184. седница
11 одржана 21.03. 2018. године

12
13 **2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива**
14 **уже научне области за коју је изабран у звање, годином избора у звање и назив**
15 **факултета, установе у којој је члан комисије запослен:**

- 16
17 1. Др Снежана Булајић, ванредни професор, Хигијена и технологија млека, 2014.
18 година, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду
19 2. Др Вера Катић, редовни професор у пензији, Хигијена и технологија млека, 1996.
20 година, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду
21 3. Др Дејан Крњаић, редовни професор, Микробиологија са имунологијом, 2016.
22 година, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду
23 4. Др Ирена Здовц, ванредни професор, Ветеринарска микробиологија, 2017.
24 година, Ветеринарски факултет Универзитета у Љубљани
25 5. Др Јелена Миочиновић, ванредни професор, Наука о млеку, 2015. година,
26 Пољопривредни факултет Универзитета у Београду

27
28
29 **II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:**

30
31 **1. Име, име једног родитеља, презиме:**

32 Тијана, Мишко, Ледина

33
34 **2. Датум рођења, општина, Република:**

35 05.01.1987. Сокобања, Република Србија

36
37
38 **3. Датум одбране, место и назив магистарске тезе*:**

39 **4. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука*:**

40
41 **III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

42 „Резистенција на тетрациклин бактерија млечне киселине изолованих из
43 традиционалних сирева Србије,„

44
45
46 **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (навести броја страна поглавља, слика,**

47 **шема, графика и сл.):** Докторска дисертација Тијане Ледине написана је на 141 страни
48 компјутерски обрађеног текста и садржи следећа поглавља: Увод (4 стране), Преглед
49 литературе (27 страна), Циљ и задаци истраживања (2 стране), Материјал и методе (12
50 страна), Резултати (31 страна), Дискусија (19 страна), Закључци (2 стране), Литература
51 (20 страна) и Прилог (24 стране). Насловна страна на српском и енглеском језику, подаци
52 о комисији, захвалница, кратак садржај на српском и енглеском језику, као и садржај
53 дисертације и списак скраћеница се налазе на почетку докторске дисертације.
54 Биографија и изјаве кандидата се налазе на крају докторске дисертације. Дисертација је
55 документована са 8 слика (3 у поглављу Преглед литературе и 5 у поглављу Резултати),
56 19 табела (3 у поглављу Преглед литературе, 4 у поглављу Материјал и методе и 12 у
57 поглављу Резултати) и 53 графика (7 у поглављу Резултати и 46 у поглављу Прилог).
58 Списак литературе чини 189 библиографских јединица, од којих је најстарија
59 публикована 1981. године, а најновија 2018. године.

1 **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (дати кратак**
2 **опис сваког поглавља дисертације: увода-до 250 речи, прегледа литературе-до 500**
3 **речи, циља и задатака истраживања-није ограничено, материјал и метода-** није
4 **ограничено, резултата није ограничено, дискусије-до 100 речи, списка референци-**
5 **навести број референци у докторској дисертацији):**
6

7 У поглављу **Увод**, кандидат, поред основних чињеница о еволуцији резистенције на
8 антибиотике и њеној еколошкој димензији, представља тзв. „резервоар“ теорију,
9 општеприхваћену у научној заједници. Према тој теорији, коменсалне бактерије, услед
10 њихове раширености у различитим екосистемима, и бројности популације, чине значајан
11 резервоар гена резистенције на антибиотике. Теорија има логично упориште у чињеници
12 да значајност појединачних еволуционих механизма, поред јачине селекције, зависи и
13 од ефективне величине популације.

14 Као један од могућих путева преношења бактерија, резистентних на антибиотике, са
15 животиња на људе, наводи се ланац хране. У овом случају, људи на индиректан начин,
16 бивају изложени бактеријама резистентним на антибиотике, било путем контакта или
17 конзумацијом хране животињског порекла контаминираним бактеријама резистентним на
18 антибиотике.

19 У Србији постоји дуга традиција производње и потрошње белих сирева у саламури.
20 Бели сиреви у саламури на традиционалан начин се производе од сировог млека у
21 сеоским домаћинствима. Бактерије млечне киселине (БМК) чине значајан део
22 јединствене микробиоте ових сирева. Кандидат наглашава да у научној литератури
23 постоји велики број података о томе да бактерије млечне киселине имају улогу
24 посредника у размени гена резистенције на антибиотике између микробиома животиња
25 и људи. Поред тога, веома добро је документована чињеница да резистенција на
26 тетрациклин представља један од најчешћих профила резистенције међу бактеријама
27 млечне киселине.

28 У Републици Србији не постоји адекватна контрола употребе антибиотика у
29 ветеринарској медицини. Поред тога, како национални програм мониторинга
30 резистенције кроз ланац хране није успостављен, преваленција резистенције на
31 антибиотике код бактерија пореклом из хране животињског порекла, остаје непознаница.
32

33 У поглављу **Преглед литературе** кандидат, пажљиво одабраним наводима,
34 документује значај ланца хране и улогу коменсалних бактерија у ширењу резистенције
35 на антибиотике. Кандидат наглашава да постоји узрочно-последична веза између
36 примене антибиотика код животиња, које служе за производњу хране и развоја
37 резистенције код бактерија узрочника обољења људи. Постигнути научни конзенсус око
38 ове чињенице довео је до тога да се, 2006. године на подручју Европске уније, забрањује
39 примена антибиотика у сврху стимулације раста животиња. Ипак, и поред забране на
40 подручју Европске уније, многе земље широм света немају тако рестриктивну политику.
41 Поред тога, примена антибиотика у ветеринарској медицини у сврху профилаксе и
42 метафилактике, али и злоупотреба антибиотика у терапеутске сврхе, као и чињеница да
43 резистенција на антибиотике, услед могућности латералног трансфера гена, усваја
44 еколошку димензију по принципу: „Све је са свим осталим у вези“, јасно указују да
45 проблем резистенције на антибиотике не може бити решен на једноставан начин.

46 Када се ланац хране разматра као пут преноса резистенције, од посебног значаја су
47 ферментисани производи од сировог млека и меса. Код ових производа, услед примарне
48 и могућности секундарне контаминације из процесног окружења, као и услед изостанка
49 термичког третмана, те природног процеса ферментације, постоји и опстаје велики број
50 коменсалних бактерија, пореклом од животиња. Из овог разлога, научне студије су,
51 највећим делом, усмерене на процену микробиоте ових производа као могућег
52 резервоара гена за резистенцију на антибиотике.

53 У даљем прегледу литературе, наводи се да сјенички, хомољски и златарски сир, као
54 најважнији представници белих сирева у саламури, услед дугогодишње традиције и
55 специфичности условљене географијом поднебља где се производе, представљају
56 аутохтоне сиреве Србије. На националном нивоу, ови сиреви су заштићени ознаком
57 географског порекла. Производе се, на традиционалан начин, од сировог крављег,
58 овчијег и козјег млека. Значајну микробиоту традиционалних сирева представљају
59 бактерије млечне киселине. Таксономски биодиверзитет заједнице бактерија млечне
60 киселине у традиционалним сиревима, веома отежава могућност да се тако сложена

1 популација бактерија процени као могући резервоар гена резистенције на антибиотике.
2 Ипак, како кандидат истиче, позивајући се на податке из литературе, бактерије млечне
3 киселине представљају тзв. „*тихи*“ резервоар гена резистенције на антибиотике.

4 Кандидат наглашава да тетрациклини представљају готово савршен модел за
5 праћење молекуларне екологије гена за резистенцију на антибиотике. Тетрациклини
6 представљају групу антибиотика која се често користи у хуманој и ветеринарској
7 медицини. Резистенција на тетрациклине је преносивог карактера, а генетска база ове
8 резистенције добро окарактерисана, са више од 40 до сада описаних гена за
9 резистенцију. Поред тога, према бројним подацима из литературе, које кандидат наводи,
10 резистенција на тетрациклине је најчешћи профил резистенције међу популацијом
11 бактерија млечне киселине,

12 Свеукупни увид у преглед података из литературе, које кандидат наводи, представља
13 добру основу за сагледавање проблема резистенције кроз ланац хране, где се посебно
14 истиче улога бактерија млечне киселине пореклом из традиционалних сирева.
15

16 У поглављу **Циљ и задаци истраживања** кандидат наводи да су истраживања
17 спроведена у оквиру докторске дисертације имала три специфична циља:

- 18 1. Утврђивање биодиверзитета аутохтоних сирева Србије у односу на популацију
19 бактерија млечне киселине са сврхом потпуније карактеризације специфичне
20 микробиоте традиционалних сирева Србије;
- 21 2. Утврђивање профила и преваленције фенотипа резистенције на антибиотике код
22 изолата бактерија млечне киселине, као део процене безбедности аутохтоних
23 сојева бактерија млечне киселине и традиционалних сирева из којих они воде
24 порекло;
- 25 3. Утврђивање присуства гена резистенције на тетрациклин код изолата бактерија
26 млечне киселине, ради увида у генетску базу резистенције и процена могућности
27 преноса гена резистенције у условима *in vitro* у сврху прелиминарне процене
28 ризика од ширења *tet* гена кроз ланац хране.

29 Сходно представљеним циљевима, постављени су следећи задаци:

- 30 1. Утврдити заступљеност бактерија млечне киселине и субпопулације бактерија
31 млечне киселине резистентне на тетрациклин у узорцима традиционалних
32 сирева Србије;
- 33 2. Извршити генотипизацију изолата бактерије млечне киселине и одабрати
34 репрезентативне изолате за даља испитивања;
- 35 3. Идентификовати изолате бактерија млечне киселине;
- 36 4. Испитати осетљивост на антибиотике код изолата бактерија млечне киселине;
- 37 5. Испитати присуство гена за резистенцију на тетрациклин код изолата бактерија
38 млечне киселине;
- 39 6. Испитати могућност преноса гена за резистенцију на тетрациклин на одабране
40 рецепијенте у условима *in vitro*.

41
42 У поглављу **Материјал и методе**, кандидат представља детаље експерименталног
43 рада. Истраживање је спроведено на 48 узорака традиционалних сирева Србије,
44 произведених од сировог млека. Узорковање сирева је извршено на подручјима која,
45 према постојећим елаборатима за ознаке географског порекла регистрованим у Заводу
46 за интелектуалну својину, представљају дефинисана географска подручја
47 традиционалне производње ових сирева. Хомољски сир (n=13) узоркован је на подручју
48 општине Жагубица, златарски сир (n=20) на подручју општине Нова Варош, и сјенички
49 сир (n=15) на подручју општине Сјеница. Узорци сирева су узимани асептично,
50 обележени и транспортовани у ручном фрижидеру до лабораторије Катедре за хигијену
51 и технологију намирница анималног порекла Факултета ветеринарске медицине, где су
52 анализирани у року 24-48 часова.

53 Изолација и одређивање броја бактерија млечне киселине у узорцима
54 традиционалних сирева извршено је преливањем одговарајућих серијских децималних
55 разблажења сирева, припремљених у пуферисаној пептонској води (*HiMedia, India*) са 10-
56 15 ml отопљеног и на 45 °C охлађеног de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) агара (*Merck,*
57 *Germany*), са додаком 0,14% сорбинске киселине (MRS-S). У циљу утврђивања
58 заступљености субпопулације бактерија млечне киселине резистентне на тетрациклин,

1 одговарајућа децимална разблажења сирева су преливана са MRS-S агаром са додатком
2 тетрациклина (tetracycline hydrochloride; *HiMedia, India*), у двоструко растућим
3 концентрацијама (1-256 µg/ml).

4 Засејане плоче су инкубиране у анаеробним условима, применом GenBox паковања
5 (GenBox anaer; *BioMérieux, France*), у времену од 72 часа при температури од 30 °C. По
6 завршеној инкубацији, на плочама одабраним за бројање (30 до 300 колонија), колоније
7 су избројане и број приказан као log CFU/g. Методом случајног одабира, са плоча без
8 тетрациклина и плоча у које је додат тетрациклин у различитим концентрацијама,
9 одабрано је 395 колонија. Од укупног броја примоиолата, на основу фенотипских
10 тестова (бојење по *Gramm*-у, каталаза тест), за даља испитивања одабрано је 223
11 изолата. Код свих изолата, извршена је изолација ДНК.

12 Пре изолације ДНК, изолати бактерија млечне киселине су засејани у MRS бујон
13 (*Merck, Germany*) и инкубирани у аеробним условима у времену од 16 часова при
14 температури од 30 °C. Бујонска култура (1 ml) је затим центрифугована при 12 000 rpm у
15 току 2 минута. Ћелијски седимент је ресуспендован у 600 µl раствора лизозима (1 mg/ml)
16 и мутанолизина (25 U/ml) (*Sigma-Aldrich, Germany*) у 0,5M етилен-диамин-тетрасирћетној
17 киселини (ethylenediaminetetraacetic acid-EDTA; *Sigma-Aldrich, Germany*) (pH=8), у циљу
18 постизања комплетне лизе зинова бактеријских ћелија. Укупна DNK је изолована уз
19 помоћ комерцијалног кита (*Wizard Genomic DNA Purification Kit*), према упутству
20 произвођача (*Promega, WI, USA*).

21 У сврху одабира репрезентативних изолата бактерија млечне киселине, примењена
22 је метода ланчане реакције полимеразе (енг. Polymerase Chain Reaction - PCR) са
23 репетитивним екстрагенским палиндромским секвенцама (енг. repetitive element
24 palindromic PCR - rep-PCR) са (GTG)₅ прајмером (5'-GTGGTGGTGGTGGT-3'), према
25 *Versalovic* и сарадницима (1994). Реакциона смеша (20 µl) садржала је 2 µM прајмера
26 (*Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, USA*), 1 x PCR обојеног пуфера, 3 mM x MgCl₂,
27 dNTP у концентрацији 1 mM и 1U Taq полимеразе (*Kappa Biosystems, MA, USA*). Програм
28 за амплификацију састојао се од иницијалне денатурације при температури 95 °C у току
29 3 минуте и 35 циклуса амплификације: денатурација при 95 °C у току 1 минуте, везивање
30 прајмера при 40 °C у току једне минуте и елонгација при 72 °C у току 2 минуте; као и
31 завршне елонгације при температури 72 °C у току 5 минута. Реакција је спроведена у
32 PCR уређајима (*Mastercycler gradient 5331, Eppendorf AG, Hamburg, Germany; Surecycler*
33 *G8800, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA*). Добијени rep-PCR производи су
34 раздвојени применом хоризонталне електрофорезе у 1,8 % агарозном гелу (*Sigma-*
35 *Aldrich, Germany*) у TAE (Tris-Acetate-EDTA) пуферу (*Thermo Fisher Scientific, Waltham,*
36 *MA, United States*), у трајању од 3 часа, обојени бојом Midori Green Advance (*Nippon*
37 *Genetics, Germany*) и посматрани под UV трансилуминатором (*Uvitec, Cambridge, UK*).
38 Добијени обрасци су упоређени у односу на покретљивост стандарда познате
39 молекулске масе (1 kbp DNA Ladder; *Nippon Genetics, Germany*). Генерисани „fingerprint“
40 ови су анализирани у програму BioNumerics™ Version 5.1. (*Applied Maths, Sint-Martens-*
41 *Latem, Belgium*), а потом је извршена калкулација генетске сличности изолата на основу
42 *Dice*-овог коефицијента корелације.

43 Изолати бактерија млечне киселине, одабрани применом rep-PCR анализе (n=162),
44 идентификовани су до нивоа врсте уз помоћ MALDI TOF (енг. Matrix-Assisted Laser
45 Desorption/Ionization Time Time-of-Flight) масене спектрометрије. Испитивани изолати
46 бактерија млечне киселине су засејани на неселективне подлоге, а затим инкубирани у
47 анаеробним условима (GenBox anaer; *BioMérieux, France*) у времену 24-48 часова при
48 температури од 30 °C. Примењена је метода директног трансфера; по завршеној
49 инкубацији, мала количина појединачних колонија је у виду танког филма директно
50 нанета на челичну плочицу са 96 места, која се налази у саставу уређаја (*Microflex LT*
51 *System; Bruker Daltonics, Germany*). Плочица са нанетим филмом је остављена да се
52 осуши на собној температури, а затим је на плочицу нанесен 1 µl матрикса, раствора α-
53 СНСА (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid; *Bruker Daltonics, Germany*). Изолати бактерија
54 млечне киселине, припремљени на овај начин, су потом подвргнути MALDI TOF масеној
55 спектрометрији. Спектрометар је био подешен за идентификацију бактерија на начин
56 препоручен од стране произвођача (фреквенција ласера 20 Hz у позитивном линераном
57 моду уз детекцију молекулских маса у распону 2-20 kDa и убрзањем од 20 kV).
58 Калибрација масеног спектрометра је извршена уз помоћ стандарда за бактеријску
59 идентификацију, екстракта соја *E. coli* DH5α са додатком протеина RNКазе А и
60 миоглобина (*Bruker Bacterial Test Standard – BTS; Bruker, Germany*). Снимљени спектри

1 су претраживани у односу на базу података протеинских секвенци, како би се утврдило
2 поклапање измерених маса пептида са теоријским масама. Број поклопљених пикова,
3 односно број експериментално добијених маса пептида, који одговарају теоријским
4 масама у бази података, представљен је коефицијентом поузданости идентификације.
5 Према упутству произвођача, коефицијент поузданости $\geq 2,0$, представља
6 идентификацију до нивоа врсте, док коефицијент поузданости $\geq 1,7$, а мањи од 2,
7 представља идентификацију до нивоа рода.

8 За испитивање осетљивости на антибиотике код идентификованих изолата бактерија
9 млечне киселине ($n=155$), коришћена је микродилуциона метода у микротитрационим
10 плочама са 96 поља. Код изолата бактерија млечне киселине, са изузетком ентерокока,
11 примењен је ISO стандард 10932:2010 „*Milk and milk products – Determination of the minimal*
12 *inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria and non-enterococcal*
13 *lactic acid bacteria (LAB)* (International Standardization Organization - ISO, 2010).
14 Осетљивост изолата БМК је испитивана у односу на сет антибиотика, предложен од
15 стране Панела о адитивима и производима или супстанцама применљивих у сточној
16 храни (енг. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed - FEEDAP)
17 Европске агенције за безбедност хране (енг. European Food Safety Agency - EFSA) (EFSA,
18 2012): гентамицин (gentamicin sulphate; *Fluka™, Honeywell, Germany*), канамицин
19 (kanamycin sulphate; *Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Germany*), стрептомицин (streptomycin
20 sesquisulfate hydrate; *Sigma-Aldrich, Germany*), тетрациклин (tetracycline hydrochloride;
21 *HiMedia, India*), еритромицин (erythromycin dihydrate; *Sigma-Aldrich, Germany*),
22 клиндамицин (clindamycin hydrochloride; *Sigma-Aldrich, Germany*), хлорамфеникол
23 (chloramphenicol; *Sigma Aldrich, Germany*) и ампицилин (ampicillin trihydrate; *Dr.*
24 *Ehrenstorfer, Augsburg, Germany*). Као референтни сој коришћен је *Lactococcus lactis*
25 ATCC 19435. Резултати испитивања осетљивости на антибиотике интерпретирани су на
26 основу граничних МИК вредности, датих у EFSA водичу (EFSA, 2012).

27 Код изолата ентерокока, испитивана је осетљивост на сет антибиотика, предложених
28 од стране Референтне лабораторије Европске уније за резистенцију на антимикуробне
29 лекове, а према водичу „*Protocol for antimicrobial susceptibility testing of Escherichia coli,*
30 *enterococci and staphylococci* (Danish Technical University, National Food Institute, 2011),
31 применом комерцијалних микротитрационих плоча импрегнираних са антибиотицима
32 (*Sensititre Trek, Thermo Fisher Scientific, USA*). Поред осетљивости на гентамицин,
33 тетрациклин, еритромицин, ампицилин и хлорамфеникол, код изолата ентерокока,
34 додатно је испитана осетљивост на ванкомицин, теикопланин,
35 квинпристин/далфопристин, даптомицин, ципрофлоксацин, тигециклин и линезолид. Као
36 референтни сој коришћен је *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. При интерпретацији
37 резултата за *Enterococcus faecalis*, примењене су граничне МИК вредности дате у водичу
38 Референтне лабораторије (Danish Technical University, National Food Institute, 2011) док
39 су за интерпретацију резултата код других врста ентерокока коришћене граничне МИК
40 вредности из литературе (Hayes and car., 2003), EFSA (EFSA, 2012) и Европског комитета
41 за испитивање осетљивости на антимикуробне препарате (енг. European Committee on
42 Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST) (EUCAST, 2018) водича.

43 Применом PCR методе, изолати бактерија млечне киселине, испитани су на присуство
44 гена за резистенцију на тетрациклин: *tet (A)*, *tet (B)*, *tet (C)*, *tet (K)*, *tet (L)*, *tet (M)*, *tet (O)*, и
45 *tet (W)*. Реакциона смеша (20 μ l) састојала се од 0,5 μ M прајмера (*Invitrogen, Thermo*
46 *Fisher Scientific, MA, USA*) испитиваних гена (Табела 1), 1 x PCR обојеног пуфера, 1,5 mM
47 x MgCl₂, dNTP у концентрацијама 200 μ M и 1U TaqDNA полимеразе (*Kappa Biosystems,*
48 *MA, USA*). Програм за амплификацију састојао се од иницијалне денатурације при
49 температури од 95 °C у трајању од 1 минуте и 30 циклуса амплификације: денатурација
50 при 95 °C у трајању од 30 секунди, везивање прајмера при специфичним температурама
51 (T_{an} - температура „*annealing*“-а) у трајању од 30 секунди, елонгација при 72 °C у трајању
52 од 30 секунди и финална елонгација при 72 °C у трајању од 5 минута. Реакција је
53 спроведена у PCR уређајима (Mastercycler gradient 5331, *Eppendorf AG, Hamburg,*
54 *Germany*; Surecycler G8800, *Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA*).

1 **Табела 1.** Секвенце прајмера, температуре везивања прајмера, величина
 2 амплификованих продуката и позитивне контроле за испитивање присуства *tet* гена
 3

| Ген | Секвенца прајмера | T _{an} (°C) | Величина продукта (bp) | Позитивна контрола | Референца |
|----------------|--|-------------------------|------------------------------|---|---|
| <i>tet</i> (A) | F: GTAATTCTGAGCACTGT R: CCTGGACAACATTGCTT | 55 | 670 | <i>Escherichia coli</i> DSM 3876 | (Hansen и cap., 1996) |
| <i>tet</i> (B) | F: CAGTGCTGTTGTTGTCATTAA R: GCTTGGAACTACTGAGTGTAА. | 52 | 500 | <i>E. coli</i> IM 648 | (Roe и cap., 1995) |
| <i>tet</i> (C) | F: AACAAATGCGCTCATCGT R: GGAGGCAGACAAGGTAT | 58 | 1138 | Плазмид pBR322 | (Frech и Schwarz, 2000) |
| <i>tet</i> (K) | F: TTATGGTGGTTGTAGCTAGAAA R: AAAGGGTTAGAAACTCTTGAАА | 55 | 348 | <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> subsp. <i>aureus</i> DSM 4911 | (Zycka- Krziesinska и cap., 2015) |
| <i>tet</i> (L) | F: GTMGTTGCGCGCTATATTCC R: GTGAAMGRWAGCCACCTAA | 55 | 696 | <i>Enterococcus</i> <i>mundtii</i> IM 613 | (Zycka- Krziesinska и cap., 2015) |
| <i>tet</i> (M) | F: GTTAAATAGTGTCTTGGAG R: СТААГАТАТGGCTCTAACAA | 50 | 750 | <i>Enterococcus</i> <i>faecium</i> IM 338 | (Nawaz и cap., 2011) |
| <i>tet</i> (O) | F: AACTTAGGCATTCTGGCTCAC R: TCCCACTGTTCCATATCGTCA | 52 | 515 | <i>Bifidobacterium</i> <i>adolescentis</i> IM 677 | (Nawaz и cap., 2011) |
| <i>tet</i> (W) | F: GAGAGCCTGCTATATGCCAGC R: GGGCGTATCCACAATGTТААС | 64 | 168 | <i>Bifidobacterium</i> <i>lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LMG 18314 | (Aminov и Mackie, 2007) |

4
 5 Продукти PCR амплификације су подвргнути хоризонталној електрофорези у 1%
 6 агарозном гелу (*Sigma-Aldrich, Germany*) са додатком боје Midori Green Advance (*Nippon*
 7 *Genetics, Germany*) и посматрани под UV светлом у трансилуминатору (*Uvitec, Cambridge,*
 8 *UK*). Покретљивост продуката PCR амплификације упоређена је са покретљивошћу
 9 продуката амплификације позитивних контрола и са стандардом познате молекулске
 10 масе (1 kbp DNA Ladder, *Nippon Genetics, Germany*).

11 Испитивање могућности преноса гена за резистенцију на тетрациклин рађено је
 12 модификованом методом коњуџације „*filter mating*“ на агару према Geversu и cap. (2003).
 13 Као потенцијални доноси одабрани су изолати *Enterococcus faecalis* и *Lactococcus lactis*,
 14 са фенотипом резистенције на тетрациклин, и код којих је утврђено присуство *tet*(M) гена.
 15 Потенцијалне реципијенте су представљали *Enterococcus faecalis* JH2-2 (LMG 19456) (без
 16 плаزمида, резистентан на рифампицин и фузидинску киселину) и изолат *Staphylococcus*
 17 *aureus* (резистентан на рифампицин; ентеротоксогени сој изолован из сира од сировог
 18 млека; део колекције бактерија Катедре за хигијену и технологију намирница анималног
 19 порекла). Потенцијални доноси и реципијенти су засејани у ВНИ (енг. Brain Heart Infusion
 20 – ВНИ) бујон (*HiMedia, India*) и инкубирани у трајању 18-20 часова при оптималној
 21 температури раста од 37 °C за *Enterococcus faecalis* и *Staphylococcus aureus*, односно од
 22 32 °C за *Lactococcus lactis*. Бујонске културе донора и реципијентата су затим пресејане
 23 у ВНИ бујон у односу 1:5 и инкубиране до средине експоненцијалне фазе раста (4-6
 24 часова). Након мешања култура донора и реципијента у односу 10:1 и 1:1, бујонске
 25 културе су пропуштене кроз мембранске филтере промера 0,45 µm (*Merck Millipore,*
 26 *Germany*). Филтери су потом испрани са пуферисаним сланим раствором (*Oxoid, UK*),
 27 како би се последило боље везивање бактеријских ћелија за филтер. Филтери са
 28 бактеријским ћелијама су асептично пренети на површину неселективне подлоге - ВНИ
 29 агара (*HiMedia, India*) и инкубирани преко ноћи при температурама оптималним за раст
 30 реципијента. По завршеној инкубацији, филтери су испрани са 10 ml пуферисаног сланог
 31 раствора (*Oxoid, UK*), а децимална разблажења испирака засејана на селективни агар за
 32 доноре (ВНИ агар са додатком тетрациклина у концентрацији од 10 µg/ml), реципијенте
 33 (ВНИ агар са додатком рифампицина у концентрацији од 50 µg/ml) и двоструко селективни
 34 агар за транскоњуганте (ВНИ агар са додатком тетрациклина у концентрацији од 10 µg/ml
 35 и рифампицина у концентрацији од 50 µg/ml). Поред тога, бујонске културе донора и

1 рецепијената, у количини од 0,1 ml, су засејане на двоструко селективни агар како би се
2 утврдило да ли је дошло до спонтаних мутација. Након инкубације у времену од 48 часова
3 при оптималној температури за доноре и рецепијенте, одређен је број колонија (log
4 CFU/ml) на селективним и двоструко селективним подлогама. Фреквенција преноса је
5 израчуната као број транскоњуганата по рецепијенту. Потенцијални транскоњуганти су
6 испитани на осетљивост према тетрациклину и присуство *tef(M)* гена применом ланчане
7 реакције полимеразе. Као позитивна контрола коришћен је сој *Enterococcus faecium* IM
8 338.

9 Добијени резултати су обрађени у статистичком пакету PrismaPad 7.00 и Microsoft
10 Excell-у. У анализи података су примењени дескриптивни статистички параметри:
11 аритметичка средина, стандардна девијација, минимална и максимална вредност.
12

13 Поглавље **Резултати** је, сходно постављеним задацима истраживања, подељено у
14 шест потпоглавља.

15 У **првом** потпоглављу приказани су резултати заступљености бактерија млечне
16 киселине и субпопулације бактерија млечне киселине резистентне на тетрациклин у
17 узорцима традиционалних сирева Србије. Одређивањем броја колонија на плочама
18 MRS-S агара без тетрациклина и са додатком тетрациклина у двострукорастућим
19 концентрацијама (1-256 µg/ml), утврђено је да концентрација тетрациклина од 16 µg/ml,
20 код већине узорка традиционалних сирева, доводи до умерене редукције броја
21 бактерија млечне киселине, док концентрација тетрациклина од 64 µg/ml у већој мери
22 редукује број БМК. На основу тога, претпостављено је да се МИК вредности за
23 тетрациклин налазе у интервалу 16-64 µg/ml, те су резултати заступљености
24 субпопулације БМК резистентне на тетрациклин, у оквиру овог потпоглавља, приказани у
25 односу на ове концентрације тетрациклина. Просечна вредност броја БМК у хомољском
26 сиру износила је $7,65 \pm 1,09 \log \text{ CFU/g}$. Када је у подлогу додат тетрациклин у
27 концентрацијама 1,2,4 и 8 µg/ml, није дошло до већег смањења броја БМК, осим код 2
28 узорка хомољског сира, где је већ при концентрацији тетрациклина од 1 µg/ml, дошло до
29 смањења броја БМК за више од 2 log CFU/g. Концентрација тетрациклина од 16 µg/ml,
30 код највећег броја узорка хомољског сира је извршила редукцију броја БМК за 1,2-2,5
31 log CFU/g. При концентрацији тетрациклина од 64 µg/ml, просечан број БМК у узорцима
32 хомољског сира је износио $3,98 \pm 2,82 \log \text{ CFU/g}$. Просечна вредност броја БМК у узорцима
33 златарског сира износила је $7,74 \pm 0,6 \log \text{ CFU/g}$. Концентрације тетрациклина у подлози
34 од 1,2,4 и 8 µg/ml, нису имале приметан утицај на број БМК; смањење броја БМК, код
35 највећег броја узорка, износило је око 1 log CFU/g. При концентрацији тетрациклина од
36 16 µg/ml, у већини узорка златарског сира, редукција броја БМК је износила 1,8-3 log
37 CFU/g. При концентрацији тетрациклина од 64 µg/ml, просечан број БМК у узорцима
38 златарског сира, износио је $3,35 \pm 2,02 \log \text{ CFU/g}$. У узорцима сјеничког сира, просечан број
39 БМК износио је $7,47 \pm 0,71 \log \text{ CFU/g}$. Концентрације терациклина у подлози од 1,2,4 и 8
40 µg/ml, код највећег броја узорка, довеле су до смањења броја БМК за око 1 log CFU/g.
41 Концентрација тетрациклина од 16 µg/ml, код највећег броја узорка сјеничког сира,
42 довела је до смањења броја БМК за 2-3 log CFU/g. При концентрацији тетрациклина од
43 64 µg/ml, запажају се варијације у смањењу броја БМК (0,8-4,5 log CFU/g). Просечан број
44 БМК, у узорцима сјеничког сира, при овој концентрацији тетрациклина, износио је
45 $3,93 \pm 2,24 \log \text{ CFU/g}$.
46

47 У **другом** потпоглављу, приказани су резултати генотипизације изолата БМК
48 применом гер-PCR методе са (GTG)₅ прајмером. На основу прорачуна сличности, помоћу
49 Dice-овог коефицијента корелације, 162 (72,65%) изолата је показало различите гер-PCR
50 „fingerprint“ типове.
51

52 У **трећем** потпоглављу приказани су резултати идентификације БМК применом MALDI
53 TOF масене спектрометрије. Од укупно 162 изолата БМК пореклом из традиционалних
54 сирева Србије, применом MALDI TOF масене спектрометрије, идентификовано је 155
55 (95,68%) изолата. Изолати БМК идентификовани су као: *Lactobacillus plantarum* (23,87%),
56 *Lactobacillus paracasei* (18,71%), *Lactobacillus brevis* (8,39%), *Lactobacillus kefir* (3,22%),
57 *Lactobacillus curvatus* (1,93%), *Lactobacillus parakefiri* (1,29%), *Lactobacillus paraplantarum*
58 (0,65%), *Lactobacillus coryniformis* (0,65%), *Lactobacillus diolivorans* (0,65%), *Leuconostoc*
59 *mesenteroides* (11,61%), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (1,29%), *Enterococcus faecalis*

1 (10,98%), *Enterococcus durans* (3,22%), *Lactococcus lactis* (9,03%), *Lactococcus garvieae*
2 (3,22%) и *Pediococcus pentosaceus* (1,29%).
3

4 У **четвртм** потпоглављу приказани су резултати испитивања осетљивости на
5 антибиотике код изолата БМК. Дат је приказ дистрибуције МИК вредности за сваки од
6 испитиваних антибиотика, дистрибуција резистенције у односу на врсте БМК, као и
7 профил мултирезистенције код изолата БМК. Графички је представљена дистрибуција
8 МИК вредности за тетрациклин код врста БМК са већим бројем изолата (*Lactobacillus*
9 *plantarum*, *Lactobacillus paracasei* и *Enterococcus faecalis*). Од укупно 155 изолата БМК, 62
10 (40,0%) изолата не показује резистенцију ни на један од испитиваних антибиотика.
11 Резистенција на један од испитиваних антибиотика утврђена је код 62 (40,0%) изолата
12 БМК. Најзаступљенији профил резистенције код изолата БМК јесте резистенција на
13 аминокликозидне антибиотике. Резистенција на канамицин је представљала
14 карактеристику 50 (37,59%) од укупно испитаних 133 изолата БМК, док је резистенција на
15 стрептомицин утврђена код 21 (21,88%) од укупно испитаних 96 изолата БМК.
16 Преваленција осталих фенотипова резистенције на антибиотике је била следећа:
17 тетрациклин (21/155; 13,55%), клиндамицин (15/133; 11,28%), гентамицин (13/155; 8,39%),
18 хлорамфеникол (12/155; 7,74%), еритромицин (9/155; 5,81%), ампицилин (1/155; 0,65%).
19 Мултирезистенција је утврђена код 5 (3,23%) изолата БМК. Од изолата БМК, са
20 фенотипом резистенције на тетрациклин, 9 (42,86%) изолата је припадало врсти
21 *Enterococcus faecalis*. Изолати *Enterococcus faecalis* су показали висок ниво резистенције
22 на тетрациклин; код 8 изолата МИК је износио 64 µg/ml, а код 1 изолата 128 µg/ml.
23 Дистрибуција МИК вредности за тетрациклин код изолата *Enterococcus faecalis*, показује
24 бимодалну расподелу, што указује на механизме стечене резистенције на тетрациклин.
25

26 У **петом** потпоглављу приказани су резултати испитивања присуства гена за
27 резистенцију на тетрациклин код изолата БМК (n=155). Гени *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(K)*,
28 *tet(O)* и *tet(W)* нису утврђени код изолата БМК. Присуство *tet(M)* гена утврђено је код 4
29 (2,58%) изолата БМК: 2 изолата *Enterococcus faecalis*, 1 изолата *Lactococcus lactis* и 1
30 изолата *Lactobacillus paracasei*. Код изолата *Enterococcus faecalis* 251, који је био носилац
31 *tet(M)* гена, доказано је присуство и *tet(L)* гена. Изолат *Lactobacillus paracasei* 444, код
32 кога је утврђено присуство *tet(M)* гена, показао је фенотип осетљивости на тетрациклин
33 (МИК 0,5 µg/ml).
34

35 У **шестом** потпоглављу представљени су резултати испитивања могућности преноса
36 гена за резистенцију на тетрациклин на одабране реципијенте у условима *in vitro*. Пренос
37 *tet(M)* гена је утврђен унутар врсте, односно са *tet(M)* позитивног изолата *Enterococcus*
38 *faecalis* 202 на *Enterococcus faecalis* JH2-2. Фреквенција трансфера гена је била ниска; у
39 случају мешања донора и реципијента у односу 1:10 износила је $1,35 \pm 0,57 \times 10^{-6}$, односно
40 $7,82 \pm 0,72 \times 10^{-8}$ када су донор и реципијенти мешани у односу 1:1. Код добијених
41 транскоњуганата реакцијом ланчане полимеразе, потврђен је фенотип резистенције на
42 тетрациклин (МИК > 128 µg/ml), као и присуство *tet(M)* гена. Засејавањем донора и
43 реципијента на двоструко селективну подлогу, није утврђен раст колонија, што указује да
44 код донора и реципијента нису наступиле спонтане мутације. У другим комбинацијама
45 донор/реципијент (*Enterococcus faecalis* 202/*Staphylococcus aureus*; *Lactococcus lactis*
46 237/*Enterococcus faecalis* JH2-2; *Lactococcus lactis* 237/*Staphylococcus aureus*), пренос
47 *tet(M)* гена није доказан.
48

49 У поглављу **Дискусија** кандидат је свеобухватно анализирајући добијене резултате и
50 поређењем са резултатима истраживања приказаним у наведеној литератури, дао
51 критички осврт добијених резултата.
52
53
54
55
56
57
58
59

1 **VI ЗАКЉУЧЦИ ИСТРАЖИВАЊА (навести закључке који су приказани у докторској**
2 **дисертацији):**

3
4 На основу спроведених испитивања и добијених резултата, могу се извести следећи
5 закључци:

- 6
7 1. Просечан број бактерија млечне киселине у узорцима традиционалних сирева
8 Србије износио је 7,47-7,74 log CFU/g. При концентрацији тетрациклина од 64
9 µg/ml, просечан број бактерија млечне киселине у узорцима истих сирева износио
10 је 3,35-3,98 log CFU/g.
- 11
12 2. Генотипизацијом изолата бактерија млечне киселине, применом гер-PCR са
13 (GTG)₅ олигонуклеотидним прајмером, утврђен је високи генетички диверзитет.
- 14
15 3. MALDI TOF масена спектрометрија се показала као успешна метода у
16 идентификацији бактерија млечне киселине пореклом из традиционалних
17 сирева. Изолати бактерија млечне киселине су идентификовани као: *Lactobacillus*
18 *plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kefir*,
19 *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus parakefir*, *Lactobacillus paraplantarum*,
20 *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus diolivorans*, *Leuconostoc mesenteroides*,
21 *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans*,
22 *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garvieae* и *Pediococcus pentosaceus*.
- 23
24 4. Најзаступљенији фенотип резистенције код изолата бактерије млечне киселине
25 јесте резистенција на аминогликозидне антибиотике. Резистенција на канамицин
26 представљала је карактеристику 37,59% изолата, док је резистенција на
27 стрептомицин утврђена код 21,88% изолата бактерија млечне киселине.
28 Преваленција осталих фенотипова резистенције је била следећа: тетрациклин
29 (13,55%), клиндамицин (11,28%), гентамицин (8,39%), хлорамфеникол (7,74%),
30 еритромицин (5,81%) и ампицилин (0,65%).
- 31
32 5. Присуство *tet(M)* гена утврђено је код 2,58% изолата бактерија млечне киселине.
33 Код једног изолата *Enterococcus faecalis* доказано је присуство *tet(M)* и *tet(L)* гена.
- 34
35 6. Потврђен је пренос *tet(M)* гена са изолата *Enterococcus faecalis* 202 на
36 *Enterococcus faecalis* JH2-2 у условима *in vitro*. Фреквенција преноса гена је била
37 ниска.
- 38
39 7. Изолати бактерија млечне киселине пореклом из традиционалних сирева Србије
40 не представљају резервоар гена резистенције на тетрациклин.

41
42
43 **VII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА (навести**
44 **да ли су добијени резултати у складу са постављеним циљем и задацима**
45 **истраживања, као и да ли закључци произилазе из добијених резултата):**

46
47 Представљање и тумачење добијених резултата је у складу са постављеним циљевима
48 и задацима истраживања. Изведени закључци су јасно формулисани и произилазе из
49 добијених резултата.

50
51 **VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

- 52
53 1. **Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у**
54 **пријави теме?**

55
56 Докторска дисертација кандидата Тијане Ледине је написана у складу са образложењем
57 наведеним у пријави теме.

58

1 2. **Да ли дисертација садржи све елементе прописане за завршену докторску**
2 **дисертацију?**

3 Докторска дисертација кандидата Тијане Ледине садржи све елементе прописане за
4 завршену докторску дисертацију.

5
6
7

3. **По чему је дисертација оригиналан допринос науци?**

8 Оригиналан допринос науци докторске дисертације Тијане Ледине представљају
9 резултати који указују на високи генетички диверзитет изолата бактерија млечне
10 киселине пореклом из традиционалних сирева Србије. Добијени резултати, поред тога
11 што потврђују биодиверзитет традиционалних сирева, пружају могућност да се
12 озбиљније размишља о заштити ознаке географског порекла ових сирева и на
13 међународном нивоу. Успешна идентификација изолата бактерија млечне киселине, и
14 поред јединствености аутохтоне микробиоте традиционалних сирева Србије, применом
15 MALDI TOF масене спектрометрије, доказ је да се ова метода са успехом може користити
16 у карактеризацији микробиолошке слике традиционалних производа од млека. Поред
17 тога, резултати преваленције резистенције на тетрациклин, присуства *tet* гена, те
18 могућности преноса истих гена у условима *in vitro*, дају могућност да се на објективан
19 начин процене бактерије млечне киселине као могући резервоар *tet* гена. Према
20 резултатима ове докторске дисертације, иако је хазард препознат, ризик је занемарљив.

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
54
55
56
57
58
59

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

IX ПРЕДЛОГ:

На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже (одабрати једну од три понуђених могућности):

- да се докторска дисертација прихвати а кандидату одобри одбрана

ДАТУМ
04.04.2018.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

Др Снежана Булајић, ванредни професор,
Факултет ветеринарске медицине
Универзитета у Београду

Др Вера Катић, редовни професор у пензији,
Факултет ветеринарске медицине
Универзитета у Београду

Др Дејан Крњаић, редовни професор,
Факултет ветеринарске медицине
Универзитета у Београду

Др Ирена Здовц, ванредни професор,
Ветеринарски факултет
Универзитета у Љубљани

Др Јелена Миочиновић, ванредни професор,
Пољопривредни факултет
Универзитета у Београду
