

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 Универзитета у Београду на
11 188. седници одржаној 26.9.2018. 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 Неђељко Карабасил, ванредни професор, хигијена и технологија меса, 2013.
18 године, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду;
19 2. Др Дејан Видановић, виши научни сарадник, микробиологија са имнулогијом,
20 2012. године, Ветеринарски специјалистички институт Краљево;
21 3. Др Владо Теодоровић, редовни професор, хигијена и технологија меса, 2005.
22 године, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду;
23 4. Др Љубиша Шарић, научни сарадник, биотехничке науке-прехранбено
24 инжињерство, 2012., Институт за прехранбене технологије Нови Сад;
25 5. Др Лазар Ранин, редовни професор, микробиологија, 2000. године, Медицински
26 факултет, Универзитета у Београду.

27
28
29 **II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:**

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

32 Марко, Предраг, Дмитрић

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

35 25.2.1987. Чачак, Република Србија

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

38
39 **4. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука*:**

40
41 **III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

42 „Детекција салмонела врста и карактеризација *Salmonella* Enteritidis и *Salmonella*
43 *Turphimurium* пореклом из ланца хране“

44
45
46 **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (навести броја страна поглавља, слика,**
47 **шема, графикона и сл.):**

48 Докторска дисертација Марка Дмитрића написана је на 154 стране и садржи следећа
49 поглавља: Увод (две стране), Преглед литературе (18 страна), Циљ и задаци
50 истраживања (једна страна), Материјал и методе (29 страна), Резултати (55 страна),
51 Дискусија (26 страна), Закључци (две стране), Списак литературе (21 страна). Насловна
52 страна на српском и енглеском језику, подаци о комисији, захвалница, кратак садржај на
53 српском и енглеском језику, садржај дисертације и списак скраћеница се налазе на
54 почетку докторске дисертације и нису нумерисани. Биографија и изјаве кандидата се
55 налазе на крају докторске дисертације и нису нумерисане. Дисертација је
56 документована са 75 табела (у поглављу преглед литературе четири табеле, у
57 поглављу материјал и методе 15 табела и у поглављу резултати 56 табела), четири
58 слике (у поглављу преглед литературе две слике, у поглављу резултати две слике) и
59 два графикона у поглављу резултати.

60

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

7 У поглављу „Увод“ наведен је значај *Salmonella* spp. са аспекта јавног здравља
8 кроз приказ епидемиошких података у свету, Европи и Републици Србији. У основним
9 цртама извршено је поређење стандардне методе за детекцију *Salmonella* spp. и *real-*
10 *time PCR* методе, посебно наглашавајући предност алтернативних метода у смислу
11 бржег добијања резултата. Кандидат посебно ставља акценат на значај валидације
12 алтернативних метода које се користе као замена стандардним методама у
13 микробиологији намирница, без обзира да ли се оне примењују у циљу детекције или
14 типизације патогених микоорганизама преносивих храном. Даље, кандидат наводи
15 значај имплементације алтернативне методе у рутинским испитивањима, али и значај
16 валидационе студије спроведене током израде докторске дисертације, уз осврт да је
17 ова теза дала и потпуно нови протокол за детекцију *Salmonella* spp. применом *real-time*
18 *PCR* методе.

19 Навођењем епидемиолошких података о високој заступљености *Salmonella*
20 *Enteritidis* и *S. Typhimurium* као узročника салмонелозе људи у Европи, наглашава се
21 значај генотипизације и испитивања осетљивости према антимиѡробним лековима
22 спроведеним током израде ове докторске дисертације, а у којима су предмет
23 испитивања били ови, епидемиошки важни серотипови.
24

25 Поглавље „Преглед литературе“ обухвата 14 потпоглавља, при чему у првом
26 кандидат наводи основне податке о таксономији и номенклатури *Salmonella* spp. У овом
27 поглављу наводи и основне морфолошке, биохемијске и културелне особине *Salmonella*
28 spp., услове неопходне за њихов раст и преживљавање, али и инфективну дозу
29 неопходну за изазивање обољења. Даље, кандидат наводи поделу серотипова према
30 адаптираности на домаћина, а након тога следи потпоглавље о епидемиологији
31 *Salmonella* spp. уз приказ епидемиошких података у Републици Србији и Европи, са
32 посебним акцентом на салмонелозе у којима је пут преноса била храна. Затим су
33 укратко кроз одговарајућа потпоглавља описани патогенеза, клиничка слика, и
34 осетљивост *Salmonella* према антимиѡробним лековима.

35 Потпоглавље „Методе за детекцију и одређивање броја *Salmonella* spp.“ даје
36 преглед метода изолације стандардизованих од стране установа као што су
37 „International Organization for Standardization (ISO)“, „Association of Official Analytical
38 Chemists (AOAC)“, „Food and Drug Administration (FDA)“ и „Food Safety and Inspection
39 Service (FSIS)“, уз опис фаза стандардне методе за детекцију *Salmonella*
40 spp. прихваћене од стране Института за стандардизацију Републике Србије
41 („Микробиологија ланца хране - Хоризонтална метода за откривање, одређивање броја
42 и серотипизацију *Salmonella* - Део 1: Откривање *Salmonella* spp. - SRPS EN ISO 6579-
43 1:2017“). Сходно предмету докторске дисертације, кандидат је посебну пажњу посветио
44 детекцији *Salmonella* spp. применом полимераза ланчане реакције (*Polymerase Chain*
45 *Reaction - PCR*), при чему су описани основни принципи класичног и *real-time PCR*. У
46 овом потпоглављу кандидат даје и преглед метода за типизацију *Salmonella* spp.,
47 фенотипских и генотипских.

48 Последње потпоглавље („Валидација алтернативних метода“) наглашава
49 неопходност валидације алтернативних метода које се употребљавају у микробиологији
50 хране, уз навођење међународно прихваћених протокола за валидацију.
51

52 У оквиру поглавља „Циљ и задаци истраживања“, као циљ истраживања у
53 оквиру ове докторске дисертације био је да се уради *in house* валидација *real-time PCR*
54 протокола за детекцију *invA* и *ttr* гена *Salmonella* spp. у храни и храни за животиње, као
55 и *real-time PCR* протокола за детекцију *Salmonella* *Enteritidis* и *S. Typhimurium* у храни,
56 затим молекуларну карактеризацију *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* изолованих из
57 феѡеса живине, хране, хране за животиње и људи, као и процену значаја налаза сојева
58 *Salmonella* *Enteritidis* и *S. Typhimurium* из ланца хране за јавно здравље. Такође, циљ је
59 био и да се допринесе бољем познавању путева контаминације хране животињског
60 порекла салмонелама.

1
2 За остварење ових циљева, постављени су следећи задаци:

- 3 1. Урадити *in house* валидацију *real-time PCR* протокола за детекцију *invA* и *ttr* гена *Salmonella* spp. у храни и храни за животиње;
- 4 2. Урадити *in house* валидацију *real-time PCR* протокола за детекцију *Salmonella* Enteritidis и *Salmonella* Typhimurium у пилећем месу и узорцима коже врата живине;
- 5 3. Дизајнирати прајмере и пробе и оптимизовати нови *real-time PCR* протокол за детекцију *invA* гена *Salmonella* spp.;
- 6 4. Формирати колекцију серотипова *Salmonella* Enteritidis и *Salmonella* Typhimurium;
- 7 5. Испитати осетљивост серотипова *Salmonella* Enteritidis и *Salmonella* Typhimurium на антимикуробне лекове и одредити минималне инхибиторне концентрације;
- 8 6. Извршити молекуларну карактеризацију серотипова *Salmonella* Enteritidis и *Salmonella* Typhimurium.

9
10 У поглављу „Материјал и методе“ кроз одговарајућа потпоглавља детаљно су
11 описани материјали и методе коришћени при изради докторске дисертације. Комплетно
12 испитивање спроведено је у лабораторији Ветеринарског специјалистичког института
13 „Краљево“. Након навођења општих стандарда које мора да имплементира
14 лабораторија за испитивање, кандидат наводи и стандарде које примењује
15 лабораторија за молекуларну дијагностику. Затим наводи уређаје на којима су вршена
16 испитивања (*AriaMx Real-Time PCR u Stratagene Mx3005P PCR; Agilent Technologies, SAD*).

17 У трећем потпоглављу приказани су референтни сојеви коришћени током
18 експерименталног дела докторске дисертације. Вештачка контаминација узорака
19 извршена је употребом референтних култура *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) и
20 *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076). Као стандард приликом извођења PFGE
21 употребљена је *Salmonella* Braenderup (ATCC BAA664). Током *exclusivity* провере
22 прајмера и пробе употребљене су 23 референтне културе и 22 лабораторијска изолата
23 из колекције ВСИ „Краљево“. Током *inclusivity* провере прајмера и пробе употребљено је
24 76 изолата *Salmonella*. Поред тога, коришћен је и материјал добијен током учешћа у
25 испитивањима оспособљености - „Proficiency Testing Scheme“ (*Salmonella* Bracknell, *S.*
26 *Typhimurium*, *S. Senftenberg*, *S. Agona*). За детекцију *Salmonella* spp. испитивањем је
27 обухваћено 616 узорака хране подељених у пет категорија (месо и производи од меса,
28 месо живине, воће и поврће, млеко и млечни производи, узорци из окружења) и 100
29 узорака хране за животиње (потпуна крмна смеша за исхрану живине, потпуна крмна
30 смеша за исхрану свиња и сојина сачма). За детекцију *Salmonella* Enteritidis и *S.*
31 *Typhimurium* испитано је 120 вештачки контаминираних узорака (пилеће месо и пилеће
32 кожице са врата).

33 Израда ове докторске дисертације обухватила је и формирање колекције
34 салмонела, за молекуларну карактеризацију и испитивање осетљивости на
35 антимикуробне лекове 60 изолата *Salmonella* Enteritidis и 60 изолата *Salmonella*
36 *Typhimurium*. Од 60 изолата *Salmonella* Enteritidis и исто толико изолата *Salmonella*
37 *Typhimurium* 24 је изоловано из хране и хране за животиње, 24 из фецеса живине и 12
38 из клиничког материјала оболелих људи. У истраживање су укључени лабораторијски
39 изолати салмонела детектованих у Ветеринарском специјалистичком институту
40 „Краљево“ (66 изолата), Институту за јавно здравље Србије „Др Милан Јовановић
41 Батут“ (24 изолата), Научном институту за прехранбене технологије у Новом саду
42 (ФИНС) (20 изолата) и Ветеринарском специјалистичком институту „Јагодина“ (10
43 изолата).

44 Детекција *Salmonella* spp. у храни, храни за животиње и фецесу живине током
45 студије поређења метода извршена је у складу са методом “Микробиологија ланца
46 хране - Хоризонтална метода за откривање, одређивање броја и серотипизацију
47 *Salmonella* - Део 1: Откривање *Salmonella* spp. (SRPS EN ISO 6579-1:2017)”.
48 Серотипизација *Salmonella* spp. извршена је у складу са стандардом “ Хоризонтална
49 метода за откривање, одређивање броја и типизацију *Salmonella* - Део 3: Упутство за
50 типизацију *Salmonella* spp. (SRPS CEN ISO/TR 6579-3:2014).

51 Након периода предобогашења, вршена је екстракција ДНК *Salmonella* spp.
52 применом три процедуре - екстракција заснована на термалној лизи ћелије, екстракција

1 применом комерцијалног препарата „*Insta™ Gene matrix*“ (BioRad, SAD) и екстракција
2 према протоколу комерцијалног кита „*iQ-Check Salmonella II*“ (BioRad, SAD).

3 Детекција *Salmonella* spp. вршена је применом четири *real-time PCR* протокола:
4 протокол заснован на детекцији *InvA* гена *Salmonella* spp. (Табела 1), протокол заснован
5 на детекцији *ttr* гена *Salmonella* spp. (Табела 2), нови протокол заснован на детекцији
6 *InvA* гена *Salmonella* spp. (Табела 3) и *iQ check® Salmonella II* кит (BioRad, USA).

7
8 **Табела 1.** Прајмери и проба употребљени за детекцију *InvA* гена *Salmonella* spp.

Прајмер / проба	Секвенца (5'–3')	Величина ампликона
Sal-139 (forward)	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGGCAA	285 bp
Sal-141 (reverse)	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	
Sal- <i>invA</i> -SO-WH проба	CTCTGGATGGTATGCCCGGTAACA	

9
10
11 **Табела 2.** Прајмери и проба употребљени за детекцију *ttr* гена *Salmonella* spp.

Назив	Секвенца (5'–3')
<i>ttr</i> -6 (forward)	CTCACCAGGAGATTACAACATGG
<i>ttr</i> -4 (reverse)	AGCTCAGACCAAAAAGTGACCATC
Target проба (<i>ttr</i> -5)	CACCGACGGCGAGACCGACTTT
IAC секвенца	GACTCACCAGGAGATTACAACATGGCTCTTGCTGTGCATCATCGCAGAACA TCAAAGCGTTCGCGTGCCTGTGGGATGGTCACTTTTGGTCTGAGCTAC
Proba za IAC	CACACGGCGACGCGAACGCTTT

12
13
14 **Табела 3.** Детекција *InvA* гена *Salmonella* spp. – секвенце дизајнираних прајмера и пробе

Таргет	Прајмер / проба	Секвенца (5'–3')	Величина ампликона
<i>InvA</i> gen	<i>InvA</i> MD2.1 (forward)	GTTCTTTGACGGTGCGATG	179 bp
	<i>InvA</i> MD2 (reverse)	GATCTGGGCGACAAGACCAT	
	<i>InvA</i> MD2 (proba)	TCGGTGGGATGACYGCCA	

15
16 Детекција генома *Salmonella* Enteritidis i *S. Typhimurium* применом *real-time PCR*
17 методе: извршена је користећи прајмере и пробе за детекцију *safA* (*S. Enteritidis*) и *fliA-IS200*
18 гена (*S. Typhimurium*) (Табела 4).

19
20 **Табела 4.** Прајмери и пробе за детекцију *safA* (*S. Enteritidis*) и *fliA-IS200* гена (*S.*
21 *Typhimurium*).

Прајмер/ проба	Секвенца (5'–3')	Величина ампликона
<i>safA</i> (forward)	GGTTGCTAACACGACACTG	166 bp
<i>safA</i> (reverse)	TGGGGCATTGGTATCAAAG	
<i>safA</i> проба	CTCCTCCCATTCCACATTTGCG	
<i>fliA-IS200</i> (forward)	CATTACACCTTCAGCGGTAT	254 bp
<i>fliA-IS200</i> (reverse)	CTGGTAAGAGAGCCTTATAGG	
<i>fliA-IS200</i> проба	CGGCATGATTATCCGTTTCTACAGAGG	

22
23 Поређење C_q вредности природно и вештачки контаминираних узорак извршено
24 је у *Microsoft Office 2010* применом т-теста.

25 Испитивање осетљивости на антимикробне лекове извршено је према *EUCAST*
26 (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) протоколу. Минимална
27 инхибиторна концентрација (*MIC*) одређена је применом Е-теста.

28 Гел електрофореза у пулсирајућем пољу (*Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE*)
29 извршена је према "*PulseNet USA Standardized PFGE Protocol*".

30
31 Поглавље „**Резултати**“ подељено је на пет потпоглавља. У **првом** потпоглављу
32 приказани су резултати *real-time PCR* детекције *invA* и *ttr* гена *Salmonella* spp. у храни и
33 узорцима из окружења. Укупно 616 узорак (466 потенцијално природно
34 контаминираних и 150 вештачки контаминираних узорак), подељених у 5 категорија

1 (месо и производи од меса, месо живине, воће и поврће, млеко и млечни производи и
2 узорци из окружења), испитано је на присуство *Salmonella* spp. *real-time PCR* методама
3 за детекцију *InvA* и *ttr* гена. Паралелно са алтернативним методама извршено је и
4 испитивање узорака стандардном методом (SRPS EN ISO 6579-1:2017). Испитивањем
5 616 узорака применом стандардне SRPS EN ISO 6579-1:2017 методе, *Salmonella* spp.
6 детектоване су у 197 узорака. Са друге стране, применом *real-time PCR* за детекцију
7 *InvA* гена и *ttr* гена *Salmonella* spp., утврђено је присуство генома *Salmonella* spp. у 202,
8 односно 203 узорка. Применом алтернативних метода лажно негативни резултати нису
9 утврђени. Сви узорци који су показали „позитивну девијацију“ (негативан резултат
10 применом референтне методе, а позитиван применом алтернативне методе), били су
11 такође позитивни након испитивања применом валидованог, комерцијалног *IQ check®*
12 *Salmonella II* кит (*BioRad, USA*) (потврђивање алтернативне методе). Релативна
13 осетљивост и лажно позитиван количник алтернативне методе, износили су 100% и
14 0.0%. Релативна тачност била је у опсегу од 98.7% до 99.2%, у зависности од
15 процедуре екстракције ДНК и примењеног *real-time PCR* протокола. Најниже C_q
16 вредности остварене су применом *real-time PCR* протокола за детекцију *ttr* гена
17 *Salmonella* spp., након екстракције применом комерцијалног препарата „*Insta™ Gene*
18 *matrix*“ (*BioRad, SAD*) („*Chelex*“).

19 У **другом** потпоглављу приказани су резултати *real-time PCR* детекције *invA* и *ttr*
20 гена *Salmonella* spp. у храни за животиње. Укупно 100 узорака хране за животиње
21 испитано је на присуство *Salmonella* spp. *real-time PCR* методама за детекцију *InvA* и *ttr*
22 гена, након екстракције применом комерцијалног препарата „*Insta™ Gene matrix*“
23 (*BioRad, SAD*) („*Chelex*“). Паралелно са алтернативним методама извршено је и
24 испитивање узорака стандардном методом (SRPS EN ISO 6579-1:2017). Применом
25 стандардне и алтернативних метода *Salmonella* spp. детектоване су у 52 узорка
26 (остварено је 100% слагање метода).

27 У **трећем** потпоглављу приказани су резултати развоја нове *real-time PCR* методе
28 за детекцију *invA* гена *Salmonella* spp. Граница детекције одређена је испитивањем
29 серије децималних разређења геномске ДНК *S. Enteritidis*. На овај начин одређен лимит
30 детекције нове *real-time PCR* методе износи 10 копија/ *PCR*. Ефикасност амплификације
31 израчуната је помоћу софтвера *PCR* уређаја. Просечна ефикасност *PCR* израчуната из
32 „*slope*“ стандардне криве добијене испитивањем серије разређења геномске ДНК *S.*
33 *Enteritidis*, износила је 96,86%. Просечна вредност коефицијента корелације (P^2)
34 износила је 0,998, а „*slope*“ 3,4.

35 Робустност нове методе проверена је модификацијама стандардне процедуре
36 које су подразумевале употребу два различита *real-time PCR* уређаја (*AriaMx Real-Time*
37 *PCR* и *Stratagene Mx3005P PCR*), припрему реакционе смеше користећи два различита
38 мастер микса (*Brilliant III Ultra-Fast QPCR Master Mix, Agilent Technologies, SAD i Path-*
39 *ID™ qPCR Master Mix, Applied Biosystems*) и извођење *PCR* у укупној запремини микса
40 од 25 μ l, при чему је као „*template*“ у реакцију додавано 2 μ l и 5 μ l ДНК (50 копија ДНК *S.*
41 *Enteritidis* по реакцији). Различите комбинације побројаних параметара су примењене.
42 Метода је успешно примењена приликом испитивања узорка у три понављања за сваку
43 модификацију.

44 Користећи „*Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*“, испитивањем прајмера и
45 пробе у *NCBI* бази нуклеотида потврђена је специфичност у односу на остале
46 публиковане секвенце циљног гена и одсуство хомологије са секвенцама других
47 микроорганизама. Аналитичка специфичности дизајнираних прајмера и пробе извршена
48 је испитивањем ДНК 76 изолата *Salmonella* spp. (*inclusivity*) и ДНК 45 изолата
49 припадника других родова (*exclusivity*) укључујући и припаднике фамилије
50 *Enterobacteriaceae*, као што су *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*,
51 *Citrobacter freundii* и *Citrobacter youngae*. Метода је успешно детектовала све изолате
52 *Salmonella* spp., са друге стране није регистрована амплификација ДНК изолата који
53 нису припадници рода *Salmonella*.

54 Након оптимизације нове *real-time PCR* методе извршено је испитивање 150
55 вештачки контаминираних узорака уз паралелно испитивање применом стандардне
56 методе (SRPS EN ISO 6579-1:2017). Екстракција ДНК извршена је применом
57 комерцијалног препарата „*Insta™ Gene matrix*“ (*BioRad, SAD*) („*Chelex*“). Резултати
58 испитивања вештачки контаминираних узорака показали су да је нова *real-time PCR*
59 метода осетљива и може детектовати 1-10 cfu у 25 g пилећег меса, ћевапа, малина,
60 пастеризованог млека и кожа са врата живине.

1 Тридесет вештачки контаминираних узорака пилећег меса испитано је применом
2 три *real-time PCR* методе (протоколи за детекцију *ttr* и *invA*, и нови протокол за
3 детекцију *invA* гена). Применом новог протокола остварене су најниже C_q вредности.

4 У **четврт**ом потпоглављу приказани су резултати *real-time PCR* детекције *S.*
5 *Enteritidis* и *S. Typhimurium*. Укупно 120 вештачки контаминираних узорака испитано је
6 применом *multiplex real-time PCR* протокола за детекцију *safA* гена *S. Enteritidis* и *fliA-*
7 *IS200* гена *S. Typhimurium*, при чему су као „template“ у једној реакцији истовремено
8 били присутни ДНК оба серотипа и ДНК интерне амплификационе контроле (*IAC*).
9 Примењене су две процедуре екстракције - екстракција заснована на термалној лизи
10 ћелије („PBS“), екстракција применом комерцијалног препарата „*Insta™ Gene matrix*“
11 *BioRad*, *SAD* („Chelex“). Паралелно је извршено и испитивање узорака стандардном
12 методом (*SRPS EN ISO 6579-1:2017*). Резултати испитивања показали су да је
13 примењена *real-time PCR* метода осетљива и може детектовати циљни серотип у 25 g
14 пилетине и пилећих кожица при нивоу контаминације 1-10 cfu. Истоветни резултати
15 остварени су након обе процедуре екстракције.

16 У **пет**ом потпоглављу приказани су резултати карактеризације *Salmonella*
17 *Enteritidis* и *S. Typhimurium* пореклом из ланца хране. Типизација 60 изолата *Salmonella*
18 *Enteritidis* и 60 изолата *S. Typhimurium* применом *real-time PCR* протокола за детекцију
19 *safA* гена *S. Enteritidis* и *fliA-IS200* гена *S. Typhimurium* показала је да су одабране
20 секвенце специфичне за испитиване серотипове.

21 Испитивањем генетске сличности 60 изолата *S. Enteritidis*, употребом ензима
22 *XbaI*, утврђено је 20 различитих PFGE профила. Унутар изолата који припадају истом
23 профили генетска сличност је износила 100% док је сличност између различитих
24 генотипова износила од 78% до 97%. Два најзаступљенија генотипа обухватила су 50%
25 укупног броја изолата (33% изолата из фецеса, 58,34 % изолата из хране и хране за
26 животиње и чак 66,7% изолата пореклом од оболелих људи). Испитивањем генетске
27 сличности 60 изолата *S. Typhimurium*, употребом ензима *XbaI*, утврђен је 21 различит
28 PFGE профил. Унутар изолата који припадају истом профили генетска сличност је
29 износила 100% док је сличност између различитих генотипова износила од 77% до 98%.
30 Два најзаступљенија генотипа обухватила су 50% укупног броја изолата (29,17%
31 изолата из фецеса, 41,67% изолата пореклом од оболелих људи и чак 75 % изолата из
32 хране и хране за животиње).

33 Испитивањем осетљивости на антимикуробне лекове 60 изолата *S. Enteritidis*,
34 применом диск дифузионе методе укупно 10% изолата показало је резистенцију на
35 пефлоксацин, 5% на ампицилин и 1,67% на тетрациклин. Свих 60 изолата показали су
36 осетљивост на азитромицин, цефотаксим, цефтазидим, хлорамфеникол, гентамицим,
37 меропенем, тигециклин и триметоприм. Изолати резистентни након испитивања диск-
38 дифузионом методом, испитани су Е-тестом, при чему је 3 од 3 изолата (100%)
39 показало резистентност на ампицилин, 1 од 1 (100%) на тетрациклин и 3 од 6 (50%) на
40 ципрофлоксацин.

41 Испитивањем осетљивости на антимикуробне лекове 60 изолата *S. Typhimurium*,
42 применом диск дифузионе методе резистенција се кретала од 3,33% на пефлоксацин,
43 11,67 % на триметоприм, 31,67% на хлорамфеникол, 46,67 % на тетрациклин до 50% на
44 амоксицилин. Изолати из хране показали су висок степен резистенције на
45 хлорамфеникол (70,83%), ампицилин (75%) и тетрациклин (75%). Такође, хумани
46 изолати у високом проценту показали су резистенцију на ампицилин (66,67%),
47 тетрациклин (66,67%) и триметоприм (50%). Свих 60 изолата показали су осетљивост
48 на азитромицин, цефотаксим, цефтазидим, гентамицин, меропенем и тигециклин.
49 Изолати резистентни након испитивања диск-дифузионом методом, испитани су Е-
50 тестом при чему 2 од 2 (100%) изолата показало резистенцију на ципрофлоксацин, 19
51 од 19 (100%) на хлорамфеникол и 7 од 7 (100%) на триметоприм, док је 29/30 (96,7)%
52 било резистентно на ампицилин и тетрациклин

53
54 У поглављу „**Дискусија**“ кандидат је свеобухватно анализирао добијене
55 резултате, критички их упоређујући са резултатима студија спроведених од стране
56 других истраживача приказаним у наведеној литератури.

57
58 У поглављу „**Литература**“ кандидат је навео 200 референци које је користио
59 приликом израде докторске дисертације.

60

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

- 3 1. Валидациона студија приликом које су тестирани *real-time PCR* протоколи за
4 детекцију *invA* и *ttr* гена *Salmonella* spp. у храни и храни за животиње показала је да
5 испитани протоколи могу бити употребљени као адекватна замена стандардној
6 методи. Релативна осетљивост алтернативних метода износила је 100%. У
7 зависности од процедуре екстракције ДНК и примењеног *real-time PCR* протокола,
8 релативна тачност била је у опсегу од 98.7% до 99.2%. Ниже C_q вредности
9 остварене су применом *real-time PCR* протокола за детекцију *ttr* гена *Salmonella*
10 spp.
11
- 12 2. Извршено је дизајнирање прајмера и пробе и оптимизација новог *real-time PCR*
13 протокола за детекцију *invA* гена *Salmonella* spp. Остварени резултати показали су
14 да нова метода поседује високе перформансе и да би након валидације између
15 различитих лабораторија могла постати међународно прихваћен *real-time PCR*
16 протокол за детекцију *Salmonella* spp. у храни.
17
- 18 3. Оптимизација *real-time PCR* протокола за детекцију *safA* гена *Salmonella* Enteritidis
19 и *fliA-IS200* гена *S. Typhimurium* у пилећем месу и кожицима са врата живине
20 успешно је извршена. Остварено је 100% слагање алтернативне и стандардне
21 методе, уз осетљивост 1-10 cfu/25 g узорка.
22
- 23 4. Типизација 60 изолата *Salmonella* Enteritidis и 60 изолата *S. Typhimurium* применом
24 *real-time PCR* протокола за детекцију *safA* гена *S. Enteritidis* и *fliA-IS200* гена *S.*
25 *Typhimurium* показала је да су одабране секвенце специфичне за испитиване
26 серотипове.
27
- 28 5. Испитивањем генетске сличности 60 изолата *S. Enteritidis*, употребом ензима *XbaI*,
29 утврђено је 20 различитих PFGE профила. Унутар изолата који припадају истом
30 профили генетска сличност је износила 100% док је сличност између различитих
31 генотипова износила од 78% до 97%. Два најзаступљенија генотипа обухватила су
32 50% укупног броја изолата (33% изолата из фецеса, 58,34 % изолата из хране и
33 хране за животиње и чак 66,7% изолата пореклом од оболелих људи).
34
- 35 6. Испитивањем генетске сличности 60 изолата *S. Typhimurium*, употребом ензима
36 *XbaI*, утврђен је 21 различит PFGE профил. Унутар изолата који припадају истом
37 профили генетска сличност је износила 100% док је сличност између различитих
38 генотипова износила од 77% до 98%. Два најзаступљенија генотипа обухватила су
39 50% укупног броја изолата (29,17% изолата из фецеса, 41,67% изолата пореклом
40 од оболелих људи и чак 75 % изолата из хране и хране за животиње).
41
- 42 7. Поређењем два различита начина екстракције ДНК *Salmonella* spp., ниже C_q
43 вредности остварене су након процедуре применом комерцијалног препарата
44 „*Insta™ Gene matrix, BioRad (Chelex)*“ него применом процедуре засноване на
45 термалној лизи ћелије (*PBS*). Квалитативно изражени крајњи резултати били су
46 истоветни независно од примењене процедуре екстракције.
47
- 48 8. Применом диск дифузионе методе, свих 60 изолата *S. Enteritidis* (100%) су
49 осетљиви на азитромицин, цефотаксим, цефтазидим, хлорамфеникол, гентамицин,
50 меропенем, тигециклин и триметоприм, док је 10% показало резистенцију на
51 пефлоксацин, 5% на ампицилин и 1,67% на тетрациклин. Резистентни сојеви,
52 испитани су и Е-тестом, при чему је 3 од 3 изолата (100%) показало резистентнију
53 на ампицилин, 1 од 1 (100%) на тетрациклин и 3 од 6 (50%) на ципрофлоксацин.
54
- 55 9. Применом диск дифузионе методе, свих 60 изолата *S. Typhimurium* (100%) су
56 осетљиви на азитромицин, цефотаксим, цефтазидим, гентамицин, меропенем и
57 тигециклин, док је резистенција утврђена код 3,33% изолата на пефлоксацин,
58 11,67% на триметоприм, 31,67% на хлорамфеникол, 46,67 % на тетрациклин и 50%
59 на амоксицилин. Изолати из хране показали су у високом проценту резистенције на
60 хлорамфеникол (70,83%), ампицилин (75%) и тетрациклин (75%). Такође, хумани

1 изолати у високом проценту показали су резистенцију на ампицилин (66,67%),
2 тетрациклин (66,67%) и триметоприм (50%). Резистентни сојеви, испитани су и Е-
3 тестом, при чему је 2 од 2 (100%) изолата показало резистенцију на
4 ципрофлоксацин, 19 од 19 (100%) на хлорамфеникол и 7 од 7 (100%) на
5 триметоприм, док је 29 од 30 (96,7)% било резистентно на ампицилин и
6 тетрациклин.

7
8 **VII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА** (навести
9 да ли су добијени резултати у складу са постављеним циљем и задацима
10 истраживања, као и да ли закључци произилазе из добијених резултата):

11
12
13
14
15
16 **VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

17
18 **1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави**
19 **теме?**

20 Докторска дисертација кандидата Марка Дмитрића под насловом „Детекција салмонела
21 врста и карактеризација *Salmonella* Enteritidis и *Salmonella* Typhimurium пореклом из
22 ланца хране“ написана је у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

23
24 **3. Да ли дисертација садржи све елементе прописане за завршену докторску**
25 **дисертацију?**

26 Докторска дисертација кандидата Марка Дмитрића под насловом „Детекција салмонела
27 врста и карактеризација *Salmonella* Enteritidis и *Salmonella* Typhimurium пореклом из
28 ланца хране“ садржи све елементе прописане за завршену докторску дисертацију.

29
30 **3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?**

31 Докторска дисертација кандидата Марка Дмитрића под насловом „Детекција салмонела
32 врста и карактеризација *Salmonella* Enteritidis и *Salmonella* Typhimurium пореклом из
33 ланца хране“ обухвата четири основне целине а оригиналан допринос науци
34 подразумева следеће:

- 35
36
37 (1) Успешно је извршена *in house* валидација *real-time PCR* протокола за детекцију
38 *invA* и *ttr* гена *Salmonella* spp. у храни и храни за животиње, при чему је поред
39 поређења протокола извршено и испитивање утицаја два начина екстракције.
40
41 (2) Успешно је извршена *in house* валидација *real-time PCR* протокола за детекцију
42 *Salmonella* Enteritidis и *Salmonella* Typhimurium у храни. При чему је истовремено
43 извршено и поређење два начина екстракције.
44
45 (3) Извршено је дизајнирање прајмера и пробе и оптимизација потпуно новог *real-*
46 *time PCR* протокола за детекцију *invA* гена *Salmonella* spp. у храни.
47
48 (4) Извршена је молекуларна карактеризација и испитивање осетљивости на
49 антимикробне лекове 60 изолата *Salmonella* Enteritidis и 60 изолата *Salmonella*
50 Typhimurium изолованих из хране, хране за животиње и фецеса.

51
52 **4. Да ли је ментор током провере оригиналности дисертације утврдио**
53 **неоправдано преклапање текста са другим публикацијама (одговорити са да или**
54 **не): НЕ**

55
56 **IX СПИСАК НАУЧНИХ РАДОВА САДРЖИНСКИ ПОВЕЗАНИХ СА ДОКТОРСКОМ**
57 **ДИСЕРТАЦИЈОМ У КОЈИМА ЈЕ ДОКТОРАНД ПРВИ АУТОР ОДНОСНО АУТОР СА**
58 **НЕЈВЕЋИМ ДОПРИНОСОМ** (написати имена свих аутора, годину објављивања,
59 наслов рада, назив часописа, импакт фактор и класификацију према Правилнику

1 о поступку, начину вредновања и квантитативном исказивању
2 научноистраживачких резултата истраживача):
3

4 **РАД У ИСТАКНУТОМ МЕЂУНАРОДНОМ ЧАСОПИСУ (M22, IF 1.51):**
5

6 **Dmitric Marko**, Vidanovic Dejan, Matovic Kazimir, Sekler Milanko, Saric Ljubisa, Arsic Milos,
7 Karabasil Nedjeljko. 2018. In-house validation of real-time PCR methods for detecting the INV
8 A and TTR genes of Salmonella spp. in food. Journal of Food Processing and Preservation,
9 42(2), e13455-n/a. doi: 10.1111/jfpp.13455
10
11
12
13

14 **X ПРЕДЛОГ:**
15

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

- 18 - да се докторска дисертација прихвати а кандидату одобри одбрана
19 - да се докторска дисертација врати кандидату на дораду
20 - да се докторска дисертација одбије
21
22
23
24

25 ДАТУМ
26
27 _____

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

28 1. **Др Неђељко Карабасил**
29 ванредни професор
30

31 -----

32 2. **Др Дејан Видановић**
33 виши научни сарадник
34

35 -----

36 3. **Др Владо Теодоровић**
37 редовни професор
38

39 -----

40 4. **Др Љубиша Шарић**
41 научни сарадник
42

43 -----

44 5. **Др Лазар Ранин**
45 редовни професор
46

47 -----
48
49
50
51
52
53