

IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

I PODACI O KOMISIJI:

1. Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju: 25.05.2016. godine
Nastavno – naučno veće Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

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

1. Dr Dejan Krnjaić, vanredni profesor, mikrobiologija sa imunologijom, 2010.godine, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
2. Dr Nikola Popović, redovni profesor, klinička dijagnostika, patologija i terapija životinja, 2001.godine, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
3. Dr Zoran Stanimirović, redovni profesor, genetika, 2007.godine, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
4. Dr Milanko Šekler, viši naučni saradnik, oblast biotehničkih nauka - veterinarstvo, mikrobiologija, 2014. godine, Veterinarski specijalistički institut Kraljevo,
5. Dr Kazimir Matović, naučni saradnik, oblast biotehničkih nauka - veterinarstvo, mikrobiologija, 2014. godine, Veterinarski specijalistički institut Kraljevo.

II PODACI O KANDIDATU:

1. Ime, ime jednog roditelja, prezime: Ivan, Veselin, Bošnjak

2. Datum rođenja, opština, Republika: 04.11.1974. godine, Zrenjanin, Zrenjanin, Republika Srbija

3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze*: 19.03.2010. godine, Beograd, „Usporedna ispitivanja hematoloških i biohemijskih parametara krvi konja inficiranih sa askaridama i strongilidama“

4. Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka*: preventivna veterinarska medicina, parazitologija

III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:

„Ispitivanje prisustva, serotipske pripadnosti i rezistencije prema antimikrobnim sredstvima *Salmonella* spp. kod gmizavaca i vodozemaca“

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

Doktorska disertacija kandidata mr Ivana Bošnjaka, dr vet. med. „Ispitivanje prisustva, serotipske pripadnosti i rezistencije prema antimikrobnim sredstvima *Salmonella* spp. kod gmizavaca i vodozemaca“ napisana je na ukupno 90 strane A4 formata i sadrži 9 tabela, 25 slika i 5 grafikona. Disertacija sadrži sledeća poglavlja: Uvod (2 strane), Pregled literature (28 strana), Cilj i zadaci ispitivanja (1 strana), Materijal i metode ispitivanja (5 strana), Rezultati (31 strana), Diskusija (9 strana), Zaključci (2 strane), i Literatura (106 referenci, 10 strana). Disertacija na početku sadrži kratak sadržaj na srpskom i engleskom jeziku (2 strane).

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

U Uvodu kandidat je opisao *Salmonella* vrste kao jedne od najznačajnijih infektivnih agenasa sa zoonoznim potencijalom, istakavši da životinje u prirodi predstavljaju njihov rezervoar i važan izvor zaraze ne samo za životinje nego i za ljude. Kako se salmonele često

nalaze u gastrointestinalnom traktu mnogih gmizavaca i vodozemaca, preko fecesa se izlučuju u okolnu sredinu i mogu uzrokovati infekcije kod velikog broja različitih vrsta životinja i ljudi. U Srbiji do sada nije ispitivano prisustvo i raširenost vrsta, podvrsta i serovarijeteta *Salmonella* kod gmizavaca i vodozemaca (kornjača, zmija, guštera i žaba), kako slobodnih u prirodi, tako i držanih u zoološkom vrtu ili gajenih kao kućni ljubimci, stoga bi dobijanje relevantnih podataka ukazalo na prisustvo određenih serovarijeteta *Salmonella* spp. i omogućilo procenu rizika po zdravlje ljudi i životinja.

Imajući u vidu da u našoj zemlji nije proučavana raširenost rezistencije prema antimikrobnim sredstvima kod sojeva *Salmonella* izolovanih od gmizavaca i vodozemaca, dobijeni rezultati prevalencije rezistencije ukazali bi na prisustvo gena rezistencije i potencijalni rizik po zdravlje ljudi od infekcija izazvanih rezistentnim sojevima ili usled prenošenja gena rezistencije.

Pregled literature predstavlja sintezu radova koji se odnose na najvažnije karakteristike roda, vrsta, podvrsta i serovarijeta *Salmonella*, njihovu klasifikaciju i nomenklaturu, morfološke, tinktorijalne, kulturne i metaboličke osobine, dijagnostičke metode ispitivanja, prisustvo i raširenost *Salmonella* spp. kod gmizavaca i vodozemaca, kao i njihov zoonozni aspekt.

U dve tabele navedene su najvažnije biohemijske karakteristike koje se primenjuju tokom postupka identifikacije roda, vrste i podvrste *Salmonella*, a kandidat se osvrnuo i na antigene karakteristike na osnovu kojih se vrši serotipizacija. Kandidat je izvršio veoma detaljnu analizu dijagnostičkih metoda koje se primenjuju kod ispitivanja prisustva *Salmonella* spp. kod gmizavaca i vodozemaca. Pored konvencionalnog klasičnog mikrobiološkog postupka izolacije, identifikacije i serotipizacije, opisani su i enzimski imuni test, ELISA test, i metoda molekularne genetičke detekcije PCR (lančana reakcija polimeraza). Posebno je istakao primenu masene spektrometrije kao analitičke metode koja je prethodnih godina našla mesto u identifikaciji mikroorganizama. Opisao je automatizovanu mikrobiološku identifikaciju koji koristi inovativnu masenu spektrometrijsku tehnologiju MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation - Time of Flight), i omogućava otkrivanje proteina direktno iz intaktnih mikroorganizama a time i identifikaciju u roku od nekoliko minuta.

Kandidat je obradio veliki broj radova koji se odnose na prisustvo *Salmonella* spp. kod gmizavaca i vodozemaca, analizirajući kliničku manifestaciju salmoneloze, inaparentnost infekcija i kliconoštvo, kao i prevalenciju podvrsta i serovarijeteta *Salmonella enterica*.

Veoma detaljno je izvršen pregled literature koji se odnosi na zoonozni aspekt *Salmonella* spp. prisutnih kod gmizavaca i vodozemaca. Ukazano je da je najviši rizik prisutan kod beba i dece mlađih od 5 godine, starih ljudi kao i osoba sa imunokompromitovanim stanjem, i da je od 1972. godine od strane Agencije za hranu i lekove SAD uvedeno obavezno ispitivanje kornjača na odsustvo salmonela pre njihove prodaje, odnosno zabrana prodaje jaja i kornjača manjih od 10 centimetara. Procenjuje se da je donetim propisima u SAD smanjen broj slučajeva salmoneloze kod dece odnosno ljudi za 100.000 slučajeva godišnje. Širom sveta pored kornjača i druge vrste životinja, zmije, gušteri i žabe, predstavljaju popularne kućne ljubimce. Kandidat je istakao da je teško precizno odrediti tačan broj slučajeva salmoneloze ljudi koji su posledica kontakta sa gmizavcima, ali je izneo podatak o proceni da je 70.000 ovakvih slučajeva godišnje u Sjedinjenim Američkim Državama, što predstavlja 6% svih slučajeva salmoneloze ljudi, odnosno 11% slučajeva kod osoba mlađih od 21. godine. Imajući u vidu veliki broj slučajeva indirektnog prenošenja salmonela Centar za kontrolu zaraznih bolesti SAD preporučio je da se ne drže gmizavci kao kućni ljubimci u domaćinstvima sa decom mlađom od 5 godina, kao i da se gmizavci ne drže u školama. I u zemljama članicama Evropske unije sistematski se prikupljaju epidemiološki podaci o pojavi i raširenosti slučajeva salmoneloze ljudi za koje se smatra da su izvor infekcije bili gmizavci. Tako je na primer u Švedskoj u periodu od 1990. do 2000. godine utvrđeno 339 datih slučajeva, što predstavlja 5% svih slučajeva salmoneloze ljudi, dok je u Ujedinjenom Kraljevstvu i u Holandiji 1% slučajeva salmoneloze ljudi direktno ili indirektno povezano sa gmizavcima.

Kandidat je u pregledu literature obradio radove koji upućuju na zaključak da je do pre kratkog vremena retko otkrivana rezistencija *Salmonella* spp. prema antimikrobnim sredstvima. Prethodnih godina povećao se broj izolata *Salmonella* koji su ispoljili rezistenciju na više antibiotika, pa i antibiotike prvog izbora u terapiji salmoneloze kod ljudi. Kandidat je istakao da su u Nemačkoj izolovani sojevi *Salmonella* spp. poreklom od gmizavaca otporni

prema nalidiksinskoj kiselini i ciprofloksacinu, a da su širom sveta ustanovljeni i multirezistentni izolati.

Cilj i zadaci istraživanja su bili da se ispita prisustvo serotipova *Salmonella* spp. kod gmizavaca i vodozemaca u Republici Srbiji, da se ustanovi postojanje rezistencije prema antimikrobnim sredstvima kod izolata *Salmonella* spp. i da se proceni rizik od infekcija ljudi *Salmonella* spp. poreklom od gmizavaca i vodozemaca.

Radi ostvarivanja cilja istraživanja postavljeni su sledeći zadaci:

1. Uzimanje kloakalnih i orofaringealnih briseva kao i fecesa od gmizavaca i vodozemaca slobodnih u prirodi, iz zoološkog vrta i kućnih ljubimaca.
2. Izolacija, identifikacija i serotipizacija sojeva *Salmonella* spp. izolovanih od gmizavaca i vodozemaca.
3. Ispitivanje osetljivosti izolata *Salmonella* spp. prema antimikrobnim sredstvima.
4. Detekcija gena rezistencije odnosno mutacija kod sojeva *Salmonella* spp. izolovanih iz vodozemaca i gmizavaca.

U poglavlju **Materijal i metode** naveden je materijal koji je tokom istraživanja uzorkovan od kornjača, guštera, zmija i žaba, uključujući kloakalne, orofaringealne i briseve kože, kao i feces. Uzorci su bili prikupljeni od gmizavaca i vodozemaca slobodnih u prirodi, iz zoološkog vrta i držanih kao kućni ljubimci.

Kandidat je primenio sledeće metode:

- Mikrobiološku metodu izolaciju i identifikaciju *Salmonella* spp. koja je izvođena prema standardu SRPS EN ISO 6579:2008 Horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella* spp. uz upotrebu propisanih hranljivih podloga puferizovane peptonske vode, Rapapport Vasiliadis bujona, modifikovanog polutečnog Rapapport Vasiliadis agara i ksiloza lizin dezoksiholat (XLD) agara. Pored standardom propisane podloge XLD agara korišćene su još tri diferencijalne podloge: MacConkey agar, Hektoen enteric agar i hromogena podloga chromID™ *Salmonella* Agar (SM2) proizvođača Biomerieux.
- Mikrobiološke metode identifikacije vrste i podvrste *Salmonella* ispitivanjem kulturelnih i metaboličkih osobina uključujući ispitivanje biohemijskih osobina upotrebom podloge sa ureom po Christensenu, podloge sa citratom po Simonsu, podloge za Voges Proskauer i metil crvenu reakciju, podloge sa fenilalaninom, podloge za indol kao i ONPG diskova. Tokom identifikacije ispitivane su i oksidaza reakcija, katalaza reakcija, sposobnost produkcije H₂S, razgradnja lizina kao i fermentacija laktoze, dulcitola, sorbitola i tartarata. Po potrebi korišćen je i komercijalni identifikacioni test BBL™ Crystal™ Enteric/Nonfermenter ID Kit proizvođača Becton Dickinson iz SAD.
- MALDI-TOF masenu spektrometrija uz upotrebu Vitek MS aparata proizvođača bioMérieux iz Francuske i identifikaciju bakterija analizom utvrđenih masenih spektara primenom programa MYLA® software2 proizvođača bioMérieux iz Francuske.
- Serološku tipizaciju izolata *Salmonella* spp. izvođenu prema standardu CEN ISO/TR 6579-3:2014, Horizontalna metoda za otkrivanje, određivanje broja i tipizaciju *Salmonella* — Deo 3: Uputstvo za tipizaciju *Salmonella* spp. Tokom serotipizacije korišćeni su polivalentni i monovalentni antiserumi salmonela kako grupni tako i specifični za O, H i Vi antigene, proizvođača Bio-Rad i Becton Dickinson, SAD, Statens Serum Instituta iz Danske i Instituta za javno zdravlje Srbije Dr Milan Jovanović Batut, Beograd.
- Disk difuzionu metodu ispitivanja osetljivosti na antimikrobne supstance prema CLSI M02-A11 standardu (Clinical and Laboratory Standards Institute) uz upotrebu antibiogram diskova (Becton, Dickinson and company, SAD): ampicilin (10 µg) , cefotaksim (30µg), hloramfenikol (30µg), ciprofloksacin (5µg), gentamicin (10µg), nalidiksinska kiselina (30µg), tetraciklini (30µg) i trimetoprim sa sulfametoksazolom (1.25+23.75µg), a interpretacija kategorija vršena je prema standardu CLSI M100-S24.
- Mikrodilucioni test u bujonu, metodu određivanja minimalnih inhibitornih koncentracija antimikrobnih supstanci prema standardu CLSI (CLSI, 2014), za sledeća antimikrobna sredstva ampicilin, cefotaksim, hloramfenikol, ciprofloksacin, gentamicin, nalidiksinsku kiselina, tetraciklin i trimetoprim sa sulfametoksazolom, u koncentracijama antibiotika u rasponu od 32 µg/ml do 0,0312 µg/ml, sa izuzetkom za trimetoprim sa

sulfametoksazolom kod koga je koncentracija bila u rasponu od 120 µg/ml + 32 µg/ml do 0,58 µg/ml + 0,0312 µg/ml.

- Deskriptivne i analitičke statističke metode. Od deskriptivnih statističkih metoda korišćeni su apsolutni i relativni brojevi (%). Testiranje na normalnost izvedeno je pomoću Kolmogorov-Smirnov testa, a zatim su primenjivani χ^2 test i Kappa statistička analiza. Signifikantnost razlika ustanovljavana je na nivou značajnosti od 5%. Statistička obrada podataka izvođena je primenom softverskog paketa Statistica verzija 8.0 i GraphPad Prism verzija 5.0.

Originalni podaci koji su dobijeni u ovoj disertaciji izneti su u poglavlju **Rezultati**, a prikazani su tekstualno, tabelarno, u slikama i grafikonima.

U uzorcima od 317 gmizavaca i vodozemaca, poreklom od 42 različite vrste životinja, ustanovljeno je prisustvo *Salmonella* spp. kod 16 različitih vrsta i ukupno 57 jedinki, odnosno kod 17,98% ispitanih životinja. U okviru istraživanja ni kod jednog vodozemaca nije utvrđena *Salmonella* spp., a od 301 ispitanog gmizavaca od 57 su izolovani sojevi *Salmonella* spp., odnosno od 18,93% jedinki. Izolovana je vrsta *Salmonella enterica* i to 41 soj podvrste *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (I) i 16 sojeva *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb).

Prilikom prikupljanja uzoraka kod većeg broja gmizavaca i vodozemaca uzimani su istovremeno kloakalni i orofaringealni brisevi odnosno kloakalni bris i feces, koji su zatim u laboratoriji ispitivani kao posebni uzorci. Iz 38 paralelno ispitanih kloakalnih i orofaringealnih briseva gmizavaca i vodozemaca izolovano je 13 sojeva *Salmonella enterica* i to 2 soja iz oba brisa, 10 samo iz kloakalnog i 1 iz orofaringealnog. Tokom paralelnog ispitivanja 20 kloakalnih briseva i fecesa od gmizavaca ukupno je izolovano 5 sojeva *Salmonella enterica*, i to 2 soja i iz kloakalnih briseva i fecesa, a 3 soja samo iz fecesa.

MALDI-TOF masenom spektrometrijom upotrebom Vitek MS aparata ispitano je 25 prethodno biohemijski identifikovanih izolata *Salmonella enterica* i determinisano :

- 17 izolata kao *Salmonella* group sa verovatnoćom od 99%,
- 5 izolata kao *Salmonella enterica* ssp *diarizonae* ili *Salmonella enterica* ssp *arizonae* sa verovatnoćom od 50%,
- 1 izolat kao *Salmonella* group, *Salmonella enterica* ssp *diarizonae* ili *Salmonella enterica* ssp *arizonae* sa verovatnoćom od 33,3%,
- 1 izolat kao *Salmonella* group, *Salmonella enterica* ssp *diarizonae*, *Salmonella enterica* ssp *arizonae* ili *Citrobacter koseri* sa verovatnoćom od 25%,
- 1 izolat kao *Salmonella enterica* ssp *diarizonae*, *Salmonella enterica* ssp *arizonae*, *Lactococcus raffinolactis* ili *Serratia fonticola* sa verovatnoćom od 20,3%.

Serološkom tipizacijom i dodatnim biohemijskih reakcijama determinisano je kao *Salmonella enterica* subsp. *enterica* 16 izolata od 17 izolata *Salmonella* group prema MALDI-TOF MS analizi, i kao *Salmonella enterica* ssp *diarizonae* 8 izolata koji su prema MALDI-TOF MS rezultatima bili najverovatnije *Salmonella enterica* ssp *diarizonae* ili *Salmonella enterica* ssp *arizonae*. Jedan izolat koji je prema rezultatima konvencionalnih biohemijskih reakcija, BBL™ Crystal™ Enteric/Nonfermenter ID kita i MALDI-TOF MS analize potvrđivan kao *Salmonella* spp. upotrebom komercijalnog API® 20E bioMérieux kita kao i polivalentnih antiseruma identifikovan je kao *Citrobacter youngae* sa 99,6% verovatnoće.

Primenom Kappa statističke analize utvrđena je izuzetno visoka podudarnost dobijenih rezultata identifikacije *Salmonella* spp. primenom MALDI-TOF MS sa rezultatima biohemijske identifikacije *Salmonella*, a Kappa vrednost je iznosila $k = 0,947$, odnosno sa 95% intervalom pouzdanosti između 0.846-1.000.

Salmonella enterica je izolovana od 24 od 152 ispitane kornjače, 14 od 76 ispitanih guštera i 19 od 73 ispitane zmije, a time je prevalencija u odnosu na broj jedinki obuhvaćenih ispitivanjem iznosila 15,79%, 18,42% i 26,03%.

Od ukupno 42 ispitane vrste životinja izolati *Salmonella enterica* su poticali od 16 različitih vrsta gmizavaca i to: šumske kornjače (*Testudo hermanni*), barske kornjače (*Emys orbicularis*), crvenouhe kornjače (*Trachemys scripta elegans*), zelembača (*Lacerta viridis*), iguane (*Iguana iguana*), bradate agame (*Pogona vitticeps*), leopard gekona (*Eublepharis macularius*), gecka (*Hemithysconyx caudicinctus*), sudanskog oklopnog guštera (*Gerrhosaurus major*), ribarice (*Natrix tessellata*), smuka (*Zamenis longissimus*), poskoka (*Vipera ammodytes*), boe (*Boa constrictor*), kalifornijske kraljevske zmije (*Lampropeltis getula californiae*), pitona (*Python regius*) i mlečna zmija (*Lampropeltis triangulum*). Prevalencija nalaza salmonela bila je najviša kod kalifornijske kraljevske zmije, sudanskog oklopnog

guštera, poskoka, ribarice, boe i mlečne zmije, kod kojih se kretala u rasponu od 40% pa čak i do 100%.

Od 24 soja *Salmonella* izolovanih od 152 kornjače, 8 je poticalo od jedinki slobodnih u prirodi, 12 iz zoološkog vrta i 4 od kućnih ljubimaca. Od 14 sojeva *Salmonella* izolovanih od 76 guštera, 1 je poticao od jedinke slobodne u prirodi, 3 iz zoološkog vrta i 10 od kućnih ljubimaca. Od 19 sojeva *Salmonella* izolovanih od 73 zmije, 10 je poticalo od jedinki slobodnih u prirodi, 4 iz zoološkog vrta i 5 od kućnih ljubimaca. Statističkom analizom utvrđena je statistički značajna razlika u raširenosti *Salmonella* kod kornjača i zmija u zavisnosti od prirode njihovog staništa i držanja. Kod kornjača gajenih kao kućni ljubimci prisustvo *Salmonella* je statistički značajno više nego kod kornjača slobodnih u prirodi ili zoološkog vrta $p=0.0002$. Kod zmija u prirodi prisustvo *Salmonella* je statistički značajno više nego kod zmija držanih u zoološkom vrtu ili gajenih kao kućni ljubimci $p=0.023708$.

Nakon sprovedene identifikacija i serotipizacija od ukupno 57 izolovanih sojeva utvrđeno je prisustvo 41 soja *Salmonella enterica* subspecies *enterica* i 16 sojeva *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae*, što predstavlja 71,93 % odnosno 28,07% od ukupnog broja izolata, i to:

Salmonella enterica subspecies *enterica*

<i>Salmonella</i> Ago 30 : z38 . -	– 5 izolata
<i>Salmonella</i> Ahuza 43:k:1,5	– 2 izolata
<i>Salmonella</i> Apapa 45 : m,t : -	– 3 izolata
<i>Salmonella</i> Benin 9,46 : y : 1,7	– 4 izolata
<i>Salmonella</i> Bispebjerg 4,5,12:a:e,n,x	– 3 izolata
<i>Salmonella</i> Eastbourne 9,12:e,h:1,5	– 1 izolat
<i>Salmonella</i> Enteritidis 9,12 : g,m : -	– 1 izolat
<i>Salmonella</i> Finkenwerder 6,14:d:1,5	– 1 izolat
<i>Salmonella</i> Glostrup 6,8:z10:e,n,z15	– 2 izolata
<i>Salmonella</i> Hadar 6,8 : z10 : e,n,x	– 1 izolat
<i>Salmonella</i> Potsdam 6,7:l,v:e,n,z15	– 2 izolata
<i>Salmonella</i> Thompson 6,7 . k : 1,5	– 9 izolata
<i>Salmonella</i> Umbilo 28 : z10 : e,n,x	– 6 izolata
<i>Salmonella</i> Wagania 4,12:b:e,n,z15	– 1 izolat

Salmonella enterica subspecies *diarizonae*

IIIb (6),14 : z10 : z	– 2 izolata
IIIb 14:l, v:z53	– 2 izolat
IIIb 17 : z10 : e,n,z15	– 2 izolata
IIIb 17 : l,v : z	– 2 izolat
IIIb 18 : l,v : z	– 1 izolat
IIIb 35 : i : z35	– 2 izolata
IIIb 47 : - : z35	– 1 izolat
IIIb 50 : i : z	– 1 izolat
IIIb 50 : r : z	– 3 izolat
IIIb 61 : c : z35	– 1 izolat

Utvrđivanjem antigenske građe izolata *Salmonella enterica* utvrđeno je da su spadali u 14 različitih serovarijeta *S.enterica* subsp. *enterica* i 10 različitih serovarijeteta *S.enterica* subsp. *diarizonae*.

Prema podacima kojima raspolažemo od ukupno utvrđenih 24 serovarijeteta, po prvi put je identifikovano u Srbiji 13 serovarijeteta to: *S. Ago*, *S. Apapa*, *S. Benin*, *S. Finkenwerder*, *S. Wagania*, IIIb 17 : l,v : z, IIIb 17: z10 : e,n,z15, IIIb 18 : l,v : z, IIIb 47 : - : z35, IIIb 50 : r : z, IIIb 35 : i : z35, IIIb 50 : i : z i IIIb 61 : c : z35.

Za identifikovani serovarijetet IIIb 17 : l,v : z je potrebna potvrda u supranacionalnoj referentnoj laboratoriji, WHO *Salmonella* Reference Centre Pasteur Institute Paris, jer nije naveden u postojećoj White – Kauffmann - Le minor šemi.

Od serovarijeteta *Salmonella enterica* subsp. *enterica* koji su izolovani od gmizavaca u okviru doktorske disertacije, u Srbiji kod ljudi se mogu ustanoviti često *S. Enteritidis*, *S. Thompson* i *S. Hadar*, odnosno sporadično *S. Glostrup*, *S. Bispebjerg* i *S. Potsdam*.

Od serovarijeteta koji spadaju u REPAS serovarijetete (Reptile-Exotic-Pet-Associated-Salmonellosis), serovarijetete gmizavaca kućnih ljubimaca koji se dovode u vezu sa infekcijama ljudi, u okviru istraživanja izolovani su *S. Apapa*, *S. Eastbourne*, *S. Potsdam* i

veći broj serovarijeteta *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* uključujući i IIIb (6),14 : z10 : z.

Primenom disk difuzione i mikrodilucione metode utvrđena je kod svih 57 izolata *Salmonella* spp. osetljivost prema svim ispitivanim antimikrobnim sredstvima, ampicilinu, cefotaksimu, hloramfenikolu, ciprofloksacinu, gentamicinu, nalidiksinskoj kiselini, tetraciklinima i trimetoprimu sa sulfametoksazolom. Kako nije kod izolata utvrđena rezistencija prema antibioticima i hemoterapeuticima nije ni sprovedeno ispitivanje prisustva određenih gena rezistencije odnosno pojave mutacija u genomu bakterija.

U poglavlju **Diskusija** kandidat kritički analizira rezultate dobijene u istraživanju i poredi ih sa rezultatima domaćih i stranih autora.

Poglavlje **Literatura** sadrži 106 bibliografskih jedinica uglavnom iz strane literature.

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

1. U uzorcima od 317 gmizavaca i vodozemaca, poreklom od 42 različite vrste životinja, ustanovljeno je prisustvo *Salmonella* spp. kod 16 različitih vrsta gmizavaca i ukupno kod 57 jedinki, odnosno kod 17,98% ispitanih životinja.
2. Primena MALDI-TOF masene spektrometrije (matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry) u determinaciji roda i vrste *Salmonella* može uspešno zameniti identifikaciju koja se zasniva na ispitivanju fiziološko-biohemijskih osobina bakterija. Primenom *Kappa* statističke analize i izračunate *Kappa* vrednosti $k=0,947$ utvrđena je izuzetno visoka podudarnost dobijenih rezultata identifikacije *Salmonella* spp. primenom MALDI-TOF MS i konvencionalne mikrobiološke metode biohemijske identifikacije.
3. Kod vodozemaca obuhvaćenih ispitivanjem velike zelene žabe (*Pelophylax ridibundus*), šumske krastave žabe (*Bufo bufo*), žutotrbe ognjene žabe (*Bambina variegata*), zelene krastače (*Bufo viridis*), šarenog daždevnjaka (*Salamandra salamandra*) nije ustanovljeno prisustvo *Salmonella* spp.
4. *Salmonella enterica* je izolovana iz uzoraka poreklom od 16 različitih vrsta gmizavaca i to: šumske kornjače (*Testudo hermanni*), barske kornjače (*Emys orbicularis*), crvenouhe kornjače (*Trachemys scripta elegans*), zelembača (*Lacerta viridis*), iguane (*Iguana iguana*), bradate agame (*Pogona vitticeps*), leopard gekona (*Eublepharis macularius*), gecka (*Hemitherconyx caudicinctus*), sudanskog oklopnog guštera (*Gerrhosaurus major*), ribarice (*Natrix tessellata*), smuka (*Zamenis longissimus*), poskoka (*Vipera ammodytes*), boe (*Boa constrictor*), kalifornijske kraljevske zmije (*Lampropeltis getula californiae*), pitona (*Python regius*) i mlečne zmije (*Lampropeltis triangulum*).
5. *Salmonella enterica* je izolovana od 57 od 301 ispitano gmiavaca, odnosno od 18,93% jedinki, i to 41 soj *Salmonella enterica* subspecies *enterica* i 16 sojeva *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae*.
6. *Salmonella enterica* je izolovana od 24 od 152 ispitane kornjače, 14 od 76 ispitanih guštera i 19 od 73 ispitane zmije, a time je prevalencija u odnosu na broj jedinki obuhvaćenih ispitivanjem iznosila 15,79%, 18,42% i 26,03%.
7. Prevalencija *Salmonella enterica* kod kornjača gajenih kao kućni ljubimci je statistički značajno viša nego kod kornjača slobodnih u prirodi ili čuvanih u zoološkom vrtu, $p=0.0002$.
8. Prevalencija *Salmonella enterica* kod zmija slobodnih u prirodi je statistički značajno viša nego kod zmija čuvanih u zoološkom vrtu ili gajenih kao kućni ljubimci, $p=0.0237$.
9. Izolati salmonela su spadali u 24 serovarijeteta *Salmonella enterica* subsp. *enterica* i *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*, od kojih je po prvi put identifikovano u Srbiji 13 serovarijeteta: S. Ago, S. Apapa, S. Benin, S. Finkenwerder, S. Wagenia, IIIb 17 : I,v : z, IIIb 17: z10 : e,n,z15, IIIb 18 : I,v : z, IIIb 47 : - : z35, IIIb 50 : r : z, IIIb 35 : i : z35, IIIb 50 : i : z i IIIb 61 : c : z35.
10. Kod gmizavaca obuhvaćenim ispitivanjem utvrđeni su serovarijeteti S. Enteritidis, S. Thompson i S. Hadar koji su u Srbiji često ustanovljeni kod ljudi, odnosno S. Glostrup, S. Bispebjerg i S. Potsdam čije je prisustvo potvrđeno kod ljudi u Srbiji.

11. Kod gmizavaca obuhvaćenim ispitivanjem utvrđeni su serovarijeteti *Salmonella enterica* subspecies *enterica* S. Apapa, S. Eastbourne, S. Potsdam i veći broj serovarijeteta *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* uključujući i IIIb (6),14 : z10 :z, a koji spadaju u REPAS serovarijetete *Salmonella enterica*, serovarijeteti prisutne kod gmizavaca gajenih kao kućni ljubimci i koji se dovode u vezu sa infekcijama ljudi.
12. Primenom disk difuzione i mikrodilucione metode utvrđena je kod svih 57 izolata osetljivost prema svim ispitivanih antibioticima.
13. Dobijeni rezultati jasno potvrđuju da zmije, gušteri i kornjače, slobodni u prirodi, držani u zoološkom vrtu i gajeni kao kućni ljubimci, mogu biti rezervoar različitih podvrsta i serovarijeteta *Salmonella enterica* i da predstavljaju rizik po zdravlje ljudi, što nameće potrebu za sistematskim pristupom, opsežnijim ispitivanjima prisustva i moguće epidemiološke povezanosti salmoneloze gmizavaca i ljudi.

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

Rezultati istraživanja su prikazani tekstualno i dokumentovani su sa 25 slika, 7 tabela i 5 grafikona. Rezultati su pravilno i kritički tumačeni.

Tekst je napisan koncizno, jasnim i razumljivim stilom. Komisija smatra da su dobijeni rezultati ispitivanja u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja i da zaključci ove doktorske disertacije proizilaze iz dobijenih rezultata.

VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:

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

Disertacija je napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi. Primijenjene metode ispitivanja su standardizovane i prilagođene cilju i zadacima disertacije, navedenim u prijavi teme.

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

Doktorska disertacija kandidata mr Ivana Bošnjaka, dr vet. med. sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju.

3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?

Originalan doprinos nauci ove disertacije ogleda se u tome što je po prvi put u Srbiji ispitivano i ustanovljeno prisustvo i raširenost *Salmonella* vrsta kod gmizavaca i vodozemaca. Po prvi put u Srbiji je izvršena mikrobiološka identifikacija *Salmonella* upotrebom MALDI-TOF masene spektrometrije, sprovedena analiza i poređenje masenih spektara sa rezultatima serotipizacije. Po prvi put u Srbiji je identifikovano 13 serovarijeteta *Salmonella enterica* subsp. *enterica* i *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*: S. Ago, S. Apapa, S. Benin, S. Finkenwerder, S. Wagenia, IIIb 17: l,v : z, IIIb 17: z10 : e,n,z15, IIIb 18 : l,v : z, IIIb 47 : - : z35, IIIb 50: r : z, IIIb 35 : i : z35, IIIb 50 : i : z i IIIb 61 : c : z35. Kako je utvrđeno prisustvo kod kornjača, guštera i zmija serovarijeteta *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, prethodno dokazanih i kao uzročnika salmoneloze ljudi u Srbiji, S. Enteritidis, S. Thompson, S. Hadar, S. Glostrup, S. Bispebjerg i S. Potsdam, dobijeni rezultati potvrđuju postojanje rizika po zdravlje ljudi i ukazuju na neophodnost sprovođenja daljih istraživanja i usmeravanja posebne pažnje na otkrivanje i sprečavanje prenošenja salmonela sa gmizavaca i vodozemaca na ljude i domaće životinje.

1 **IX PREDLOG:**

2
3 **Na osnovu ukupne ocene disertacije, komisija predlaže (odabrati jednu od tri**
4 **ponuđenih mogućnosti):**

5
6 Na osnovu ukupne ocene doktorske disertacije kandidata mr Ivana Bošnjaka dr vet.
7 med. Komisija predlaže da se doktorska disertacija prihvati, a kandidatu odobri odbrana.

8
9 **DATUM**

10
11 13.06.2016.godine

12 **POTPISI ČLANOVA KOMISIJE**

- 13
14
15
16 1. dr Dejan Krnjaić, van.prof.
17 Fakultet veterinarske medicine
18
19
20
21
22
23
24 2. dr Nikola Popović, red. prof.
25 Fakultet veterinarske medicine
26
27
28
29
30
31
32 3. dr Zoran Stanimirović, red. prof.
33 Fakultet veterinarske medicine
34
35
36
37
38
39
40 4. dr Milanko Šekler, viši naučni
41 saradnik VSI Kraljevo
42
43
44
45
46
47
48 5. dr Kazimir Matović, naučni saradnik
49 VSI Kraljevo
50
51
52
53
54
55
56
57
58