

IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

I PODACI O KOMISIJI:

1. Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju: 20.04.2016. 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 Vera Katić, redovni profesor, Higijena i tehnologija mleka, 1996. godine, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
 3. Dr Saša Trailović, redovni profesor, Farmakologija i toksikologija, 2013. godine, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
 4. Dr Marina Radojičić, docent, Mikrobiologija sa imunologijom, 2012. godine, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
 5. Dr Dragana Vuković, vanredni profesor, Mikrobiologija, 2011. godine, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu.

II PODACI O KANDIDATU:

1. Ime, ime jednog roditelja, prezime: Nemanja, Milan, Zdravković
2. Datum rođenja, opština, Republika: 28.11.1985. Smederevska Palanka, Smederevska Palanka, Srbija
3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze*:
4. Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka*:

III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:

„Ispitivanje antibakterijskog dejstva karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola prema sojevima *S. aureus* izolovanih u slučajevima mastitisa krava”

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

Doktorska disertacija kandidata Nemanje Zdravkovića, dr.vet.med. „Ispitivanje antibakterijskog dejstva karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola prema sojevima *S. aureus* izolovanih u slučajevima mastitisa krava” napisana je na ukupno 134 strane A4 formata i sadrži 33 tabele, 13 slika, 13 grafikona i 13 šematskih prikaza. Disertacija sadrži sledeća poglavlja: Uvod (3 strane), Pregled literature (46 strana), Cilj i zadaci ispitivanja (1 strana), Materijal i metode ispitivanja (16 strana), Rezultati (37 strana), Diskusija (18 strana), Zaključci (2 strane), i Literatura (205 referenci, 11 strana). Disertacija na početku sadrži kratak sadržaj na srpskom i engleskom jeziku (3 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 se osvrnuo na značaj mastitisa kod krava i na velike zdravstvene i ekonomske probleme do kojih dovode u intezivnoj proizvodnji mleka. Kandidat je nabrojao najčešće uzročnike mastitisa kod krava *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* i *Streptococcus uberis*, i ukratko opisao patogenezu mastitisa, programe sprečavanja pojave i suzbijanja mastitisa. Imajući u vidu zabrinjavajuće širenje

1 rezistencije prema antimikrobnim sredstvima kod najznačajnijeg uzročnika mastitisa krava,
2 bakterije *Staphylococcus aureus*, kandidat je istakao sve češću pojavu terapijske
3 neefikasnosti antibiotika i neophodnost pronalaženja novih antibakterijskih sredstava,
4 uključujući etarska ulja biljaka i njihove aktivne komponente. Obim organskog stočarstva se
5 svake godine u Srbiji povećava, i kandidat je ukratko opisao specifičnosti antimikrobne
6 terapije u ovom vidu proizvodnje i mogućnost upotrebe etarskih ulja u borbi protiv infektivnih
7 oboljenja. Etarska ulja se odlikuju širokim spektrom bioloških aktivnosti i efikasnim
8 antimikrobnim dejstvom protiv određenih bakterija, gljivica i virusa. Kao aktivne komponente
9 ovih etarskih ulja izolovani su između ostalih karvakrol, eugenol, cinamaldehyd i timol, a koji
10 se nalaze u korijanderu (*Coriandrum sativum* L.), origanu (*Origanum vulgare* L.), ruzmarinu
11 (*Rosmarinus officinalis* L.), cimetu (*Cinnamomum zeylanicum* Breyn.), žalfiji (*Salvia officinalis*
12 L.), majčinoj dušici (timijanu) (*Thymus vulgaris* L.) i karanfiliću (*Syzygium aromaticum* L. syn.
13 *Eugenia carophyllata* Thunb.). U našoj zemlji nisu do sada vršena ispitivanja osetljivost *S.*
14 *aureus* izolovanih u slučajevima mastitisa krava na aktivne komponente etarskih ulja, a
15 rezultati bi mogli da obezbede efikasniju preventivu i terapiju ovog oboljenja.

16
17 **Pregled literature** predstavlja sintezu radova koji se odnose na etarska ulja, njihov
18 hemijski sastav i značaj, kao i već postojeću i potencijalnu primenu u veterinarskoj i humanoj
19 medicini. Kandidat je veoma detaljno izvršio analizu radova o medicinskim dejstvima etarskih
20 ulja i njihovih aktivnih komponenti, kao i palete preparata koji se primenjuju u Srbiji i u svetu,
21 kako u konvencionalnom tako i u organskom stočarstvu. Istakao je da se u literaturi kao
22 najznačajnije aktivne komponente etarskih ulja sa potentnim antimikrobnim dejstvom protiv *S.*
23 *aureus* navode karvakrol, cinamaldehyd, eugenol i timol. Veoma iscrpno je izvršen pregled
24 literature koji se odnosi na mastitis krava, multifaktorijsko oboljenje čija pojava u velikoj meri
25 zavisi i od faktora virulencije uzročnika, koji su sistematično opisani za *S. aureus*.
26 Konvencionalni program sprečavanja pojave i suzbijanja mastitisa na farmama muznih krava
27 podrazumeva terapiju antibioticima, što dovodi do selektivnog pritiska na uzročnike mastitisa i
28 doprinosi pojavi i širenju rezistentnih sojeva. Kandidat je detaljno analizirao savremenu
29 literaturu o prevalenciji rezistencije u veterinarskoj i humanoj medicini, pojavi i posledicama
30 terapijske neefikasnosti i riziku po zdravlje ljudi. Kako sposobnost produkcije biofilma
31 predstavlja važan faktor virulencije *S. aureus*, kandidat je prezentovao rezultate novijih
32 istraživanja o biofizičkim karakteristikama, strukturi, formiranju i širenju biofilma, fiziologiji
33 bakterija koje ga formiraju kao i značaju biofilma u patogenezi mastitisa krava. Poseban deo
34 pregleda literature se odnosi na organsku proizvodnju mleka u svetu, Evropskoj uniji i Srbiji,
35 sa osvrtom na propise i zahteve za sertifikaciju ovog vida proizvodnje, uključujući i
36 ograničenje odnosno zabranu upotrebe antibiotika.

37
38 **Cilj i zadaci** istraživanja ove disertacije bili su da se utvrdi antibakterijsko delovanje
39 odabranih komponenti etarskih ulja karvakrola, eugenola, cinamaldehyda i timola na sojeve *S.*
40 *aureus* izolovanih u slučajevima supkliničkih mastitisa krava, njihovo sinergističko delovanje u
41 tačnoj kulturi, kao i delovanje na formiranje biofilma *S. aureus*. Radi ostvarivanja cilja
42 istraživanja postavljeni su sledeći zadaci:

- 43 1. Izolacija i identifikacija uzročnika supkliničkih mastitisa krava primenom
44 konvencionalnih bakterioloških tehnika i tehnika molekularne biologije i formiranje
45 studijske kolekcije izolata *S. aureus*;
- 46 2. Utvrđivanje osetljivosti prema antibioticima ispitivanih sojeva *S. aureus*;
- 47 3. Utvrđivanje sposobnosti formiranja biofilma ispitivanih *S. aureus* sojeva detekcijom
48 gena odgovornih za nastanak biofilma i kvantifikacijom produkovanog biofilma;
- 49 4. Utvrđivanje minimalnih inhibitornih i minimalnih baktericidnih koncentracija aktivnih
50 komponenti etarskih ulja karvakrola, eugenola, cinamaldehyda i timola za ispitivane *S.*
51 *aureus* izolate pojedinačno i u različitim kombinacijama datih komponenti;
- 52 5. Utvrđivanje dužine antibakterijskog delovanja aktivnih komponenti etarskih ulja na
53 ispitivane sojeve *S. aureus*;
- 54 6. Utvrđivanje inhibitornog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja karvakrola,
55 eugenola, cinamaldehyda i timola na biofilmove ispitivanih izolata *S. aureus*;
- 56 7. Analiza dobijenih rezultata.

57
58 U poglavlju **Materijal i metode** navodi se da je uzorkovanjem i preliminarnim ispitivanjima
59 obuhvaćeno 7 farmi u okolini Beograda na kojima se ugaja 8500 mlečnih grla holštajn-frizijske
60 rase, od kojih je ukupno izolovano i dalje ispitivano 113 izolata koagulaza pozitivnih

1 *Staphylococcus* spp. Osim kliničkih izolata u radu su korišćeni i referentni sojevi *S. aureus*
2 ATCC 25923 i meticilin rezistentni *S. aureus* ATCC 43300 (American Type Culture Collection).
3 Kao kontrolni soj za produkciju biofilma korišćen je izolat *S. aureus* dobijen iz kolekcije sojeva
4 Instituta za mikrobiologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu.

5
6 Kandidat je primenio sledeće metode:

- 7 • Klasične mikrobiološke metode izolacije i fenotipske identifikacije *S. aureus*,
8 zasejavanjem na krvni agar sa dodatkom 5% goveđe krvi, ispitivanjem morfoloških,
9 tinktorijalnih, kulturelnih i metaboličkih osobina uključujući prisustvo hemolize, bojenje
10 po Gramu, katalaza i koagulaza reakciju, ONPG test, kao i fermentaciju manitola i
11 maltoze.
- 12 • PCR metodu kod molekularne genetičke detekcije:
 - 13 o *nuc* gena za proizvodnju termostabilne nukleaze koji se pojavljuje u različitim
14 alelnim formama kod *S. aureus*, *S. intermedius* i *S. hyicus*, na čemu se zasniva
15 identifikacija vrste. Multipleks PCR metoda je izvođena po metodi koju je opisao
16 Gandra sa saradnicima 2011. godine uz upotrebu 6 prajmera: Nuc1 5'-
17 ATGAAGTCAAATAAATCGCT-3', Nuc2 5'-TTTGGTGAAAAATACTTCTC-3', Nuc
18 3 5'-AAAAATAAC-AACAGGATTGA-3' Nuc 4 5'-GTAAAGTCTGAAGCTTCTT-3',
19 Nuc 5, 5'-GAAAAAATTACAACAGGCG-3', Nuc 6 5'-CACATCCGTTGAAGA-
20 CTTT-3'. Amplifikacija fragmenta veličine 458 baznih parova je specifična za *S.*
21 *aureus*. Vizuelizacija produkata kod ove kao i kod drugih PCR metoda vršena je
22 posle elektroforeze na 1% agaroznom gelu i bojenja etidijum bromidom.
 - 23 o *coa* gena za produkciju koagulaze prema protokolu Kalorey i saradnika iz 2007.
24 godine uz upotrebu prajmera *coa* f 5'-ATAGAGAT-GCTGGTACAGG-3' i *coa* r 5'-
25 GCTTCCGATTGTTCGATGC-3', koji daju amplifikate veličine 627,710, ili 910
26 baznih parova.
 - 27 o *ica* A i D alelne forme gena koji kodira produkciju biofilma prema protokolu Naser
28 i saradnika iz 2012. godine upotrebom prajmera *icaAD*-f 5'-
29 TATTCAATTTACAGTCGCAC-3' i *icaAD*-r 5'-GATTCTCTCCCTCTCTGCCA-3',
30 koji daju amplifikate veličine 407 baznih parova.
- 31 • Disk difuzionu metodu ispitivanja osetljivosti na antimikrobne supstance prema CLSI
32 M02-A11 standardu (Clinical and Laboratory Standards Institute) uz upotrebu
33 antibiogram diskova (Becton, Dickinson and company, SAD): penicilin (10 i.j), cefoksitin
34 (30µg), tetraciklin (30µg), neomicin (5µg), trimetoprim-sulfametoksazol (1.25-23.75µg),
35 amoksicilin-klavulanska kiselina (20-10µg) i linkomicin (2µg), a interpretacija kategorija
36 vršena je prema standardu CLSI M100-S24.
- 37 • Metodu određivanja minimalnih inhibitornih koncentracija antimikrobnih supstanci (MIC
38 - mikrodilucionni test u bujonu) prema standardu NCCLS M26-A (National Committee for
39 Clinical Laboratory Standards), i to kako antibiotika linkomicina, neomicina i
40 kloksacilina u koncentracijama od 128µg/ml do 0,0625µg/ml, tako i aktivnih komponenti
41 etarskih ulja karvakrola, eugenola, cinamaldehyda i timola (Essentico, Kula, Srbija,
42 udela aktivne supstance 98,9%, gustine 1,098g/ml) u koncentraciji od 2560µg/ml do
43 1,25µg/ml.
- 44 • Metodu određivanja minimalne baktericidne koncentracije antimikrobnih supstanci
45 (MBC) prema standardu NCCLS M26-A (National Committee for Clinical Laboratory
46 Standards), koja se izvodi nakon određivanja MIC vrednosti, presejavanjem bakterija iz
47 bazenčića mikrotitracione ploče na Mueller Hinton agar i to kako iz bazenčića MIC
48 vrednosti tako i iz bazenčića četiri naredne više koncentracije aktivne supstance.

- Metodu određivanja međusobnog zajedničkog odnosa antimikrobnih supstanci u mikrotitracionoj ploči prema metodi modifikovane šahovske table opisanoj u radu Verma iz 2007. godine, a koja se izvodila u različitim kombinacijama dve aktivne komponenti etarskih ulja u koncentracijama od 20 µg/ml do 1280µg/ml, odnosno od 1,25 µg/ml do 1280µg/ml. Bakterijski inokulum se pripremao prema standardu CLSI M7-A7, a nakon 24 h duge inkubacije i očitavanja pojedinačnih i zajedničkih MIC vrednosti određivao se međusobni odnos kao sinergistički, indiferentan odnosno antagonistički.
- Metodu određivanja dužine antibakterijskog delovanja prema time – kill modifikovanoj metodi opisanoj u radu Verma iz 2007. godine, a koja se izvodila u trajanju od 14 dana i kod koje su pored početne vršene i tri dodatne inokulacije bakterija 2., 4. i 6. dana ispitivanja, uz svakodnevno utvrđivanje broja bakterija i praćenje dinamike rasta odnosno inhibicije od strane aktivnih komponenti.
- Metodu utvrđivanja sposobnosti produkcije biofilma u mikrotitracionim pločama prema metodi Peeters i saradnika iz 2008. odnosno Farran i saradnika iz 2013. godine. Nakon 24 h duge inkubacije i ispiranja, dodavan je u bazenčiće 1% rastvor kristal violeta, a zatim i 30% rastvor sirćetne kiseline i određivana je masa biofilma merenjem ekstinkcije upotrebom spektrofotometra uz filtere od 450nm i 570nm.
- Metodu utvrđivanje inhibitornog dejstva antimikrobnih supstanci na masu biofilma opisanoj od strane Nostra i saradnika iz 2007. godine, koja se izvodila u mikrotitracionoj ploči na već formiranom biofilmu inokulisanjem aktivnih komponenti u koncentraciji od 80µg/ml do 2560µg/ml. Poređenjem očitanih ekstinkcija mase biofilma sa i bez aktivne komponente određivanom merenjem prema Peeters i saradnicima iz 2008. odnosno Farran i saradnicima iz 2013. godine izračunavano je smanjenje mase biofilma.
- Metodu utvrđivanja baktericidnog dejstva aktivnih komponenti prema ćelijama biofilma prema Saising i saradnicima iz 2012. godine merenjem degradacije tetrazolijumske soli - metiltiazoltetrazolium (MTT, Sigma-Aldrich, SAD). Metoda se zasniva na sposobnosti vijabilnih ćelija da žuto obojeno jedinjenje rastvorljivo u vodi 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol bromid (MTT) hemijski redukuju i pretvore u ljubičasto plave kristale formazana koji je nerastvorljiv u vodi. Očitavanje reakcije vršeno je rastvaranjem formazana pomoću dimetil sulfoksida (DMSO) a zatim i određivanjem vrednosti ekstinkcije upotrebom spektrofotometra. Koncentracija aktivne materije koja je dovela do smanjenja ekstinkcije na polovinu vrednosti ekstinkcije netretiranog biofilma uzeta je kao minimalna baktericidna vrednost koja dovodi do 50% smanjenja broja živih ćelija biofilma.
- Statistička ispitivanja matematičko-statističkim metodama uz procenu značajnosti. Svi dobijeni podaci obrađeni su metodom deskriptivne statistike, a u cilju obrade podataka koji su se odnosili na kvantitativnu analizu, rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija. Višestruko poređenje parametrijskih podataka vršeno je primenom testa najmanje značajne razlike (LSD), a potom i pomoću Studentovog t-testa i jednosmerne analize varijanse. Neparametrijski podaci su ispitani Kruskal–Wallis testom i utvrđivana je statistička značajnost, a Danovim testom određivani su nivoi razlike. Korišćeni su statistički paketi Statistica verzija 8.0 i GraphPad Prism verzija 5.0.

Navedena ispitivanja su urađena na Fakultetu veterinarske medicine u Beogradu (Katedra za mikrobiologiju) i Veterinarskom institutu Kraljevo u Kraljevu.

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

Molekularno-genetičkom analizom (PCR metodom) detekcije *nuc* gena za proizvodnju termostabilne nukleaze kandidat je potvrdio identifikaciju 103 izolata *S. aureus*. Tipiziranje *coa* gena za produkciju koagulaze urađeno je prajmerima koji otkrivaju 3 izoalelne forme i to I (627bp), II (710bp) i III (910bp). Kao najučestaliji nalaz kod ispitivanih izolata *S. aureus* utvrđena je III izoalelna forma kod 76 (73,77%) izolata, zatim II kod 6 (5,83%) izolata i I kod 3 (2,91%) izolata.

Prilikom ispitivanja osetljivosti izolata *S. aureus* utvrđeno je da je učestalost multirezistentnih sojeva na tri ili više antibiotika veoma retka i prisutna samo kod 6,19%

1 izolata. Izuzev rezistencije prema penicilinu G, koja je okrivena kod 96,19% izolata,
2 rezistencija prema ostalim antibioticima ustanovljena je u niskom procentu od 0 do 13,33%.
3 Tokom ispitivanja potvrđeno je 6 sojeva meticilin rezistentnih *S. aureus* (MRSA), što
4 predstavlja 5,71% od svih ispitanih izolata.

5 Fenotipskim ispitivanjem formiranja mase biofilma utvrđena srednja vrednost
6 ekstinkcije iznosila je 0,084, u rasponu od 0,056 do 0,144. Najveći broj izolata, njih 60%,
7 formiralo je biofilm ekstinkcije od 0,07 do 0,09. Iznad ove grupe koja se karakterisala
8 srednjom vrednošću ekstinkcije, produkcijom veće mase biofilma odlikovalo se 26% ispitanih
9 izolata, na kojima je kasnije ispitivano dejstvo aktivnih komponenti etarskih ulja. Od ukupno
10 113 izolata ispitanih u ovom radu, 89 izolata, odnosno 88,76% *S. aureus* je posedovalo *ica*
11 AD alelnu formu gena.

12 Utvrđivanjem minimalnih inhibitornih i minimalnih baktericidnih koncentracija aktivnih
13 komponenti etarskih ulja karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola prema izolatima *S.*
14 *aureus* od mastitisa krava, utvrđeno je da sve komponente ispoljavaju određen stepen
15 antimikrobne aktivnosti. Srednja vrednost minimalne inhibitorne koncentracije MIC
16 cinamaldehida iznosila je 161,5±23,41µg/ml a MIC50, vrednost minimalne inhibitorne
17 koncentracije koja je dovela do inhibicije rasta 50% ispitivanih sojeva izolata *S. aureus*
18 uzročnika mastitisa, bila je 160µg/ml. Srednja vrednost MIC karvakrola bila je
19 237,7±10,77µg/ml, eugenola 271,6±23,84µg/ml, a timola 306,5±23,46µg/ml. MIC50
20 karvakrola, eugenola i timola iznosio je 320µg/ml. Potentnost aktivnih komponenti etarskih
21 ulja, odnosno ispoljena antimikrobna aktivnost u zavisnosti od srednje vrednosti minimalne
22 inhibitorne koncentracije, ustanovljena u ovoj disertaciji od najefikasnije do najmanje efikasne
23 bila je u sledećem redosledu: cinamaldehyd > karvakrol > eugenol > timol. U okviru rada
24 sprovedeno je i ispitivanje baktericidnog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja, i utvrđena
25 srednja minimalna baktericidna vrednost. MBC je bila najniža za cinamaldehyd 680µg/ml, viša
26 za karvakrol sa 857,4µg/ml i eugenol sa 1086,2µg/ml, i na kraju najviša za timol sa
27 1106,4µg/ml.

28 Od ukupno 462 ispitane kombinacije različitih koncentracija aktivnih komponenti
29 etarskih ulja, kod 50 je bilo moguće vršiti očitavanje rezultata i izračunavanje vrednosti
30 individualnih frakcionih inhibitornih koncentracija (FIC). Ukupno je otkriveno 7 sinergističkih
31 kombinacija. Najniža vrednost FIC iznosila je 0,312 pri kombinaciji 20µg/ml karvakrola i
32 80µg/ml eugenola. U drugih šest kombinacija dobijene su pojedinačne vrednosti FIC na
33 granici sinergizama (FIC=0,5) i to kod karvakrola 20µg/ml i eugenola 40µg/ml, karvakrola
34 40µg/ml i cinamaldehyda 1,25µg/ml, karvakrola 40µg/ml i cinamaldehyda 2,5µg/ml, karvakrola
35 40µg/ml i timola 20µg/ml, cinamaldehyda 1,25µg/ml i timola 40µg/ml kao i kod cinamaldehyda
36 80 µg/ml i timola 20µg/ml.

37 Tokom ispitivanja dužine antibakterijskog delovanja aktivnih komponenti etarskih ulja
38 na *S. aureus*, najduže dejstvo tokom celog dvonedelnog oglada ispoljili su karvakrol i
39 cinamaldehyd. Timol se odlikovao antimikrobnim dejstvom tokom prvih 5 dana, a eugenol
40 tokom prva dva dana oglada odnosno do prve reinokulacije. Kratkoročno dejstvo je imao i
41 kontrolni antibiotik linkomicin, koji je očekivano doveo do kratkotrajne inhibicije rasta i
42 razmnožavanja bakterije tokom prva 24h od početka oglada.

43 Ispitivanjem inhibitornog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja na biofilme *S.*
44 *aureus* izolovanih od mastitisa krava utvrđeno je da su najpotentnije dejstvo u redukciji
45 biomase imali sa srednjom vrednošću MIC biofilma karvakrol 1152µg/ml, eugenol 1460µg/ml,
46 timol 1592µg/ml i cinamaldehyd 1716µg/ml. Najpotentnije dejstvo u redukciji broja živih ćelija
47 biofilma imali su sa srednjom vrednošću minimalne baktericidne koncentracije (MBC biofilma)
48 timol 1156µg/ml, karvakrol 1284µg/ml, eugenol 1512 µg/ml i na kraju cinamaldehyd
49 1776µg/ml.

50
51 U poglavlju **Diskusija** kandidat analizira rezultate dobijene u istraživanju i poredi ih sa
52 rezultatima domaćih i stranih autora.

53 Imajući u vidu rezultate identifikacije koagulaza pozitivnih *Staphylococcus* vrsta dobijenih
54 primenom klasičnih mikrobioloških metoda izolacije i fenotipske identifikacija odnosno PCR
55 metodom detekcijom *nuc* gena, kandidat je istakao prednost molekularno genetičkih metoda
56 koje obezbeđuje tačnu i bržu identifikaciju.

57 Iako je ustanovljena, izuzev prema penicilinu G, relativno niska prevalencija rezistencije
58 i multiple rezistencije prema antibioticima i hemoterapeuticima, kandidat ističe prisustvo
59 rezistencije prema amoksicilinu sa klavulanskom kiselinom i meticilinu kod 13,33% odnosno
60 5,71% ispitanih izolata. Dobijeni rezultati prevalencije MRSA kod *S. aureus* izolovanih kod

mastitisa krava su u skladu sa rezultatima drugih autora u Srbiji koji su ustanovili prevalenciju između 0% i 5,9%. Kao epidemiološki i epizootiološki veoma interesantna tema, prisustvo i raširenost MRSA u mleku je ispitivana širom sveta, i nalazi variraju u zavisnosti od podneblja, perioda ispitivanja i broja prikupljenih uzoraka i kreću se od 0% do 17,53% ispitanih izolata *S. aureus*.

Formiranje biofilma obezbeđuje efikasnu zaštitu bakterijama od imunskog odgovora organizma i/ili antimikrobne terapije i doprinosi njihovom preživljavanju i uspostavljanju hroničnog toka mastitisa. Osetljivost na antibiotike bakterijskih ćelija u biofilmu je smanjena usled nemogućnosti ulaska lekova u jonizovanoj formi, prisustva enzima koji ih razgrađuju i ređih deoba bakterija. Imajući u vidu fenotipsku potvrdu produkcije biofilma kod svih izolata kao i detekciju *ica* gena kod 88,76% izolata, može se zaključiti da je sposobnost stvaranja biofilma ključna za infekciju i dugotrajniju kolonizaciju epitela vimena, što je u skladu sa rezultatima drugih autora.

U okviru ispitivanja ustanovljeno je da su sve ispitane komponente etarskih ulja pokazale određen stepen antimikrobne aktivnosti. Prema radovima u kojima se poredi antibakterijsko delovanje etarskih ulja ili aktivnih komponenti etarskih ulja sa delovanjem antibiotika, vrednosti MIC etarskih ulja i aktivnih komponenti etarskih ulja višestruko prevazilaze MIC vrednosti antibiotika, odnosno i do 1000 puta slabije deluju. To je u potpunosti u skladu sa rezultatima dobijenim u okviru ove doktorske disertacije. Na osnovu analize dobijenih MIC vrednosti aktivnih komponenti etarskih ulja, uočeno je da se vrednosti ne razlikuje kod osetljivih i rezistentnih izolata *S. aureus* prema određenim antibioticima. Imajući u vidu ove rezultate kandidat je izneo mišljenje da se etarska ulja i njihove komponente mogu primeniti u terapiji infekcija izazvanih mikroorganizmima rezistentnim prema antibioticima. Utvrđene srednje vrednosti MIC karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola u okviru ove doktorske disertacije su u najvećem broju slučajeva niže nego što su MIC vrednosti dobijene u istraživanjima drugih autora, odnosno aktivne komponente etarskih ulja ispoljile su jače antibakterijsko dejstvo.

Baktericidno dejstvo komponenti etarskih ulja obuhvaćenim ispitivanjem u okviru doktorske disertacije je potentnije, odnosno sa nižim MBC vrednostima u odnosu na rezultate radova drugih autora. Upoređujući vrednosti odnosa MBC i MIC od najveće ka najmanjoj razlici, utvrđen je sledeći redosled: cinamaldehyd < eugenol < timol < karvakrol. Srednja vrednost MBC u odnosu na srednju vrednost MIC je bila veća za 3,60 do 4,21 puta, što je u skladu sa rezultatima drugih autora.

Ukupno je otkriveno sedam sinergističkih kombinacija, sa najboljim efektom pri kombinaciji 20µg/ml karvakrola i 80µg/ml eugenola. Rezultati drugih autora su veoma različiti i variraju od supraaditivnog sinergizma pa čak i do antagonizma u zavisnosti od date kombinacije i koncentracija aktivnih komponenti etarskih ulja.

Ispitivanje dužine efekta, time-kill test, je retko izvođeno u svetu i postoji mali broj radova koji obuhvata ovu temu. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima publikovanim u drugim radovima i nesumnjivo ukazuju na veliki potencijal cinamaldehida i karvakrola u dužini delovanja u odnosu na preostale dve aktivne komponente etarskih ulja, eugenol i timol, kao i kontrolni antibiotik linkomicin.

Imajući u vidu MIC i MBC vrednosti aktivnih komponenti etarskih ulja prema biofilmu, komparativno najjače dejstvo ispoljili su timol i karvakrol što je u skladu sa radovima stranih autora. Manje smanjenje antimikrobne aktivnosti karvakrola i timola u odnosu na cinamaldehyd, ukazuje na mogućnost kombinovanja ovih aktivnih komponenti etarskih ulja sa cinamaldehydom, a time i postizanja sveobuhvatnog antibakterijskog delovanja protiv planktonske i forme biofilma *S. aureus*.

Poglavlje **Literatura** sadrži 205 bibliografskih jedinica uglavnom iz strane literature.

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

1. U odnosu na fenotipizaciju, molekularna identifikacija *nuc* gena primenom lančane reakcije polimeraze obezbeđuje tačnu i bržu identifikaciju koagulaza pozitivnih *Staphylococcus* vrsta.
2. Kod izolata *S. aureus* poreklom od krava sa supkliničkim i kliničkim mastitisom izuzetno je retka multipla rezistencija prema antimikrobnim sredstvima. Na tri i više

- 1 antibiotika rezistencija je utvrđena kod 7 od ukupno 113 ispitivanih izolata, odnosno
2 kod 6,19%.
- 3 3. Izuzev penicilina G prema kome je rezistencija utvrđena kod 96,16% ispitanih izolata,
4 rezistencija prema drugim antibioticima i hemoterapeuticima pojavljuje se sporadično,
5 i to u rasponu od 0% do 13,33%.
- 6 4. Sposobnost formiranja biofilma determinisana *icaAD* genom utvrđena je u velikom
7 procentu, kod 88,76% ispitanih izolata, što ukazuje da ova karakteristika predstavlja
8 jedan od ključnih faktora virulencije *S. aureus* kod mastitisa krava.
- 9 5. Na osnovu utvrđenih vrednosti minimalnih inhibitornih i baktericidnih koncentracija,
10 ispitivane aktivne komponente etarskih ulja ispoljile su antimikrobno dejstvo prema
11 izolatima *S. aureus* u sledećem opadajućem nizu: cinamaldehyd > karvakrol >
12 eugenol > timol. Srednje vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) su
13 iznosile kod cinamaldehyda 161,5µg/ml, karvakrola 320µg/ml, eugenola 271,6µg/ml
14 i timola 306,5µg/ml. Najpotentnije baktericidno dejstvo pokazao je cinamaldehyd sa
15 srednjom vrednošću MBC od 680µg/ml, zatim karvakrol sa 857,4µg/ml, eugenol
16 1086,2µg/ml i na kraju timol sa 1106,5µg/ml.
- 17 6. Utvrđena je statistički vrlo značajna razlika u antimikrobnom dejstvu cinamaldehyda u
18 odnosu na ostale ispitane aktivne komponente etarskih ulja ($p < 0,01$), dok je značajna
19 statistička razlika utvrđena između antimikrobnog dejstva eugenola i timola ($p < 0,05$).
- 20 7. Aktivne komponente etarskih ulja karvakrol, eugenol, cinamaldehyd i timol su
21 podjednako efikasno delovale na izolate *S. aureus* osetljive i rezistentne prema
22 određenim antibioticima, što imajući u vidu stalni globalni porast rezistencije potencira
23 njihovu primenu kao antimikrobnih sredstava.
- 24 8. Određene kombinacije i koncentracije aktivnih komponenti etarskih ulja odlikuju se
25 sinergističkim dejstvom, koje je bilo najizraženije kod kombinacije 20µg/ml karvakrola
26 i 80µg/ml eugenola.
- 27 9. Aktivne komponente karvakrol i cinamaldehyd se odlikuju izuzetno dugim
28 antibakterijskim dejstvom na izolate *S. aureus* u trajanju od najmanje 14 dana i više je
29 nego opravdano nastaviti *in vitro* i *in vivo* ispitivanja u cilju pripreme nove formulacije
30 efikasnijih preparata sa protrahiranim dejstvom kod mastitisa krava.
- 31 10. Aktivne komponente etarskih ulja karvakrol i timol odlikovale su se najpotentnijem
32 delovanjem u redukciji biomase odnosno broja viabilnih ćelija biofilma *S. aureus*.
- 33 11. Imajući u vidu najpotentnije dejstvo cinamaldehyda prema planktonskoj formi *S.*
34 *aureus* kao i karvakrola i timola prema biomasi i viabilnim ćelijama biofilma, nameće
35 se kao mogućnost kombinacija ovih aktivnih komponenti etarskih ulja u cilju
36 postizanja sveobuhvatnog antibakterijskog delovanja.

37
38 **VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li**
39 **su dobijeni rezultati u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li**
40 **zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):**

41
42 Rezultati istraživanja su prikazani tekstualno i dokumentovani su sa 12 slika, 20
43 tabela, 12 grafikona i 8 šematskih prikaza. Rezultati su pravilno i kritički tumačeni.

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

47
48 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**

49
50 **1. Da li je disertacija napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme?**

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

54
55 **2. Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?**

56 Doktorska disertacija kandidata Nemanje Zdravkovića, dr vet. med. sadrži sve
57 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 dejstvo aktivnih komponenti etarskih ulja: karvakrola, eugenola, cinamaldehida i timola prema izolatima *S. aureus* poreklom od krava obolelih od mastitisa. Po prvi put u našoj zemlji vršena je molekularno genetička detekcija PCR metodom *ica A* i *D* alelne forme gena koji kodiraju produkciju biofilma, veoma važnog faktora virulencije *S. aureus* za nastajanje mastitisa krava. Veoma značajan doprinos nauci disertacije se ogleda i u detaljnim ispitivanjima zajedničkog sinergističkog dejstva kao i dužini antimikrobnog dejstva aktivnih komponenti etarskih ulja, kako prema planktonskoj tako i prema formi biofilma, koja su nedvosmisleno ukazala na mogućnost formulacije preparata, koji će se pored efikasnog antimikrobnog svojstva odlikovati i protrahiranim delovanjem. Dobijeni rezultati su od velikog značaja za prevenciju mastitisa u organskoj proizvodnji, i ukazuju na opravdanost upotrebe etarskih ulja i njihovih aktivnih komponenti kao alternativu zabranjenoj ili organskoj primeni antibiotika u lečenju infektivnih oboljenja kod ovog vida stočarske proizvodnje.

IX PREDLOG:

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

Na osnovu ukupne ocene doktorske disertacije kandidata Nemanje Zdravkovića dr.vet.med, Komisija predlaže da se doktorska disertacija prihvati, a kandidatu odobri odbrana.

DATUM

13.06.2016.godine

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

1. Dr Dejan Krnjaić, van.prof.
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

2. Dr Vera Katić, red. prof.
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

3. Dr Saša Trailović, red. prof.
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

4. Dr Marina Radojičić, docent
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

5. Dr Dragana Vuković, van.prof.
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu