

3
4
5 IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

6
7 I PODACI O KOMISIJI:

8
9 1. **Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju:** Nastavno-naučno veće Fakulteta
10 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu na 200-toj sednici, održanoj 20.11.2019.
11 godine.

12
13 2. **Sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, zvanja, naziva uže**
14 **naučne oblasti za koju je izabran u zvanje, godinom izbora u zvanje i naziv fakulteta,**
15 **ustanove u kojoj je član komisije zaposlen:**

- 16
17 1. Dr Mirjana Dimitrijević, redovni profesor, Higijena i tehnologija mesa, 2019. godina,
18 Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu
19 2. Dr Brankica Lakićević, viši naučni saradnik, Higijena i tehnologija mesa, 2019. godina,
20 Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd
21 3. Dr Vlado Teodorović, redovni profesor, Higijena i tehnologija mesa, 2007. godina, Fakultet
22 veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.
23 4. Dr Dejan Krnjajić, redovni profesor, Mikrobiologija sa imunologijom, 2016. godina, Fakultet
24 veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.
25 5. Dr Vesna Đorđević, naučni savetnik, Higijena i tehnologija mesa, 2019. godina, Institut za
26 higijenu i tehnologiju mesa, Beograd
27
28

29 **Napomena:** redosled članova Komisije je takav da se prvo navode nastavnici sa FVM a zatim članovi iz drugih
30 institucija, sem u slučaju kada je mentor disertacije iz druge institucije. Tada se mentor iz druge institucije upisuje
31 pod rednim brojem 2, odnosno posle mentora sa FVM koji je pod rednim brojem 1.
32
33

34 II PODACI O KANDIDATU:

- 35
36 1. **Ime, ime jednog roditelja, prezime:** Ivana, Dragan, Zuber Bogdanović
37
38 2. **Datum rođenja, opština, Republika:** 29.08.1985., Cetinje, Crna Gora
39
40 3. **Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze*:**
41
42 4. **Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka*:**
43

44 III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:

45
46 “**Koncept kontrole *Listeria monocytogenes* u pogonu za preradu mesa uz upotrebu**
47 **sekvenciranja kompletnog genoma u cilju postizanja bezbednosti hrane**“
48
49

50 IV **PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broja strana poglavlja, slika, šema,**
51 **grafikona i sl.):** Doktorska disertacija Ivane Zuber Bogdanović napisana je na 94 strane
52 teksta i sadrži sledeća poglavlja: Uvod (dve strane), Pregled literature (34 strane), Ciljevi i
53 zadaci istraživanja (dve strane), Materijal i metode istraživanja (7 strana), Rezultati
54 istraživanja (17 strana), Diskusija (13 strana), Zaključci (dve strane) i Spisak literature (16
55 strana), Prilog (jedna strana). Na početku disertacije dat je kratak sadržaj na srpskom i
56 engleskom jeziku. Disertacija je dokumentovana sa 7 tabela ,14 slika i tabelarnim prilogom.
57

58 V **VREDNOVANJE POJEDINIH DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis**
59 **svakog poglavlja disertacije: uvoda-do 250 reči, pregleda literature-do 500 reči, cilja i**
60 **zadataka istraživanja-nije ograničeno, materijal i metoda – nije ograničeno, rezultata –**

1 nije ograničeno, diskusije-do 100 reči, spiska referenci-navesti broj referenci u
2 doktorskoj disertaciji):
3

4 U **Uvodu** kandidatkinja ističe da je hrana kontaminirana *L.monocytogenes* uzročnik najvećeg
5 broja slučajeva listerioze ljudi, te da je veoma važno obezbediti višestepenu kontrolu u svim
6 fazama proizvodnje, koja je neophodna u cilju postizanja njene mikrobiološke bezbednosti.
7 Kontaminacija hrane se najčešće dešava tokom njene proizvodnje, a *L. monocytogenes*
8 može poticati iz sirovina ili iz proizvodnog pogona. Sposobnost formiranja biofilмова sa
9 drugim vrstama bakterija, čini ovu patogenu bakteriju izuzetno otpornom na veliki broj
10 dezinfekcionih sredstava. Kada se toj činjenici dodaju i njena prirodna i stečena adaptacija na
11 dejstva antimikrobnih supstanci, jasna je sve veća zabrinutost koja vlada kada je u pitanju
12 kontaminacija hrane. S tim u vezi, na evropskom i međunarodnom nivou su uspostavljene
13 pravne regulative i standardi za praćenje i ispitivanje prisustva *L.monocytogenes* u celom
14 lancu proizvodnje hrane. Sve veću primenu u oblasti bezbednosti hrane imaju savremene
15 molekularne tehnike tipizacije mikroorganizama. Među njima, tehnika sekvenciranja
16 kompletnog genoma (eng. *Whole genome sequencing* - WGS) se izdvojila kao vodeća
17 metoda za karakterizaciju bakterija. Uz podatke o izgledu genoma, WGS pruža takođe i
18 informacije o markerima virulencije, determinantama rezistencije na antimikrobna sredstva, ali
19 i o evoluciji bakterijskih vrsta. Upotreba ove tehnike u mesnoj industriji se ogleda u njenoj
20 praktičnosti da definiše i odredi mesta ulaska i puteva daljeg širenja *L.monocytogenes*.
21 Pružajući informacije koje će olakšati razumevanje distribucije patogena duž lanca hrane i
22 unaprediti efektivnost epidemioloških istraga, tehnika sekvenciranja kompletnog genoma
23 uveliko unapređuje upravljanje sistemom bezbednosti hrane, kao i zaštiti javnog zdravlja.
24

25 U poglavlju **Pregled literature** prikazana su dosadašnja naučna saznanja o rodu *Listeria* i
26 vrsti *Listeria monocytogenes*, faktorima virulencije i patogenosti, epidemiološkim podacima o
27 listeriozi ljudi, prisustvu ove patogene bakterije u hrani i proizvodnim pogonima za hranu,
28 zatim faktorima koji utiču na njen rast i preživljavanje u hrani, otpornosti na dejstvo
29 dezinfekcionih sredstava, kao i rezistenciji na antimikrobne lekove. Navodi se da se stopa
30 prijavljivanja listerioze ljudi izazvane kontaminiranom hranom povećava poslednjih godina.
31 Među skorašnjim je epidemija listerioze tokom 2017. i 2018. godine u Južnoafričkoj Republici,
32 sa preko 1000 laboratorijski potvrđenih i više od 200 smrtnih slučajeva. U istraživanjima
33 vođenim tokom ove epidemije, izolati su podvrgnuti sekvenciranju kompletnog genoma i
34 uzročnik listerioze je identifikovan u barenoj kobasici od svinjskog mesa, čija je konzumacija
35 dovela do oboljenja ljudi, a takođe je identifikovan i proizvodni pogon odakle je poticala
36 kontaminacija. Ukazano je da je *L.monocytogenes* čest kontaminant pogona za proizvodnju
37 hrane, iz kojih je izolovana sa opreme, radnih površina, okoline, sirovine i finalnih proizvoda.
38 Na njen rast i preživljavanje u hrani utiču različiti faktori, koji podrazumevaju temperaturu, pH,
39 aktivnost vode, koncentraciju soli, pakovanje u modifikovanoj atmosferi. Hrana spremna za
40 konzumiranje je posebno okarakterisana kao rizična po pitanju prisustva *L.monocytogenes*,
41 jer između njene proizvodnje i konzumacije ne postoji naknadni antimikrobni procesni korak.
42 Sposobnost *L.monocytogenes* da formira biofilmove, složene mikrobiološke ekosisteme
43 uronjene u ekstracelularni matriks različitog sastava i porekla, okarakterisano je kao ozbiljan
44 problem u industriji hrane, jer oni mogu predstavljati stalan izvor kontaminacije. Utvrđeno je
45 da ova patogena bakterija može biti prisutna i nekoliko godina u pogonu za proizvodnju
46 hrane, te ponovnom unakrsnom kontaminacijom proizvoda posledično dovesti do pojave
47 epidemija ili sporadičnih slučajeva listerioze ljudi. Pored formiranja biofilмова, rezistencija na
48 dezinfekciona sredstva, predstavlja jedan od osnovnih fenotipskih faktora koji doprinosi
49 preživljavanju i opstanku *L.monocytogenes* u sredinama za proizvodnju hrane.

50 Takođe, ukazano je da je rezistencija patogenih bakterija na antimikrobne lekove značajna
51 briga javnog zdravlja. Od 1988. godine., kada je prijavljen prvi soj *L. monocytogenes*
52 rezistentan na antibiotike, njihov broj je sve veći.

53 Uporedo sa razvojem molekularnih metoda za detekciju i tipizaciju bakterijskih vrsta, nalazila
54 se njihova primena u oblasti bezbednosti hrane. Usled potrebe ranog otkrivanja klastera
55 kojem priprada izazivač oboljenja ljudi, kao i njegovog izvora, uspostavljen je veliki broj
56 metoda identifikacije i tipizacije *L.monocytogenes*. Sveobuhvatna i pravovremena
57 karakterizacija *L. monocytogenes*, zasnovana na sekvenciranju kompletnog genoma (WGS)
58 je prepoznata kao moćna metoda za poređenje izolata u analizama epidemija listerioze ljudi.
59 Ona grupiše epidemiološki povezane izolate i razjašnjava mikroevoluciju i njihovu
60 perzistenciju u okviru jedne epidemije, a takođe unapređuje praćenje listerioze ljudi do samog

1 izvora u hrani. Upotreba ove metode se ogleda najpre u unapređenju molekularne tipizacije
2 *L.monocytogenes* izolovane iz uzoraka hrane ili proizvodne okoline, zatim u istraživanju
3 razlika u pojedinačnim nukleotidnim polimorfizmima kao osnove kvantitativne diferencijacije
4 različitih sojeva, a zatim i u identifikaciji genetskih determinanti ove patogene bakterije. U
5 zemljama Evropske Unije je njenom upotrebom istraženo nekoliko epidemija listerioze, a
6 takođe je postala obavezna u nacionalnim referentnim laboratorijama.

7
8 **Cilj istraživanja** u okviru ove doktorske disertacije bio je je da se primenom sekvenciranja
9 kompletnog genoma (WGS) analiziraju sojevi *L. monocytogenes* izolovani u procesu prerade
10 mesa, kako iz proizvoda, tako i sa površina proizvodnog pogona, tokom četvorogodišnjeg
11 perioda uzorkovanja. Za ostvarenje ovog cilja, ispitalo se najpre prisustvo ove patogene
12 bakterije, zatim njena sposobnost formiranja biofilma, a urađena je i molekularna
13 karakterizacija izolovanih sojeva *L. monocytogenes*, sa određivanjem raspodele serogrupa
14 među izolatima pomoću multipleks PCR i Next Generation Sequencing (NGS) podataka.
15 Procenjena je potom rezistencija na antimikrobne lekove, a takođe i utvrdilo prisustvo
16 markera za otpornost na dezinficijense.

17
18 U poglavlju **Materijal i metode** prikazani su detalji eksperimentalnog rada.

19
20 • Proizvodi su uzorkovani u proizvodnom pogonu za preradu mesa uz poštovanje
21 principa standarda MEST ISO 7218:2008 Mikrobiologija lanca hrane – Opšti zahtjevi i
22 uputstvo za mikrobiološka ispitivanja. Po pet jedinica proizvodne serije svakog ispitivanog
23 proizvoda je uzorkovano u skladu sa odredbama Pravilnika o mikrobiološkim kriterijumima za
24 bezbjednost hrane (Sl.CG br. 53/12). Uzorci su dostavljani laboratoriji u roku od do 2 sata od
25 uzorkovanja, transportovani u ručnom frižideru pri temperaturi od 2 °C - 4 °C. Uzorci su
26 pripremljeni za ispitivanje prema standardu MEST EN ISO 6887-2:2003 Mikrobiologija lanca
27 hrane - Pripremanje uzoraka za ispitivanje, početne suspenzije i decimalnih razblaženja za
28 mikrobiološko ispitivanje - Dio 2: Specifična pravila za pripremanje mesa i proizvoda od mesa.

29
30 • Uzorci briseva iz proizvodnog pogona za preradu mesa, uzeti su nakon čišćenja,
31 pranja i dezinfekcije pogona, u skladu sa standardom MEST ISO 18593:2004 Mikrobiologija
32 hrane i hrane za životinje - Horizontalne metode za tehnike uzimanja uzoraka sa površine
33 pomoću kontaktnih ploča i briseva. Uzorci su dostavljani laboratoriji u roku od do 2 sata od
34 uzorkovanja, a transportovani su u ručnom frižideru pri kontrolisanoj temperaturi od 2 °C do 4
35 °C.

36
37 • Detekcija *Listeria monocytogenes* rađena je metodom - MEST ISO/IEC 11290-
38 1:2010. Horizontalna metoda za detekciju *Listeria monocytogenes* – Deo 1: Metoda
39 detekcije.

40
41 • Za ispitivanje sposobnosti stvaranja biofilma korišćen je *Microplate biofilm assay*
42 (Borucki et al., 2003). Optička gustina je merena spektrofotometrijski (Labsystems
43 Multiscan®MCC/340) korišćenjem 595 nm filtera. Biofilmovi su posmatrani pod elektronskim
44 mikroskopom. Uzorak je bio obložen zlatom sa prskalicom (Sputter Coater, BAL TEC SCD
45 005, Lihtenštajn) (radno vreme 100 s, upotrebljena struja 30 mA) pre SEM analize (JEOL
46 JSM 6390 LV, Japan).

47
48 • Ispitivanje rezistencije na antimikrobne lekove je rađeno na svih 20 izolata
49 *L.monocytogenes* pomoću standardnog testa difuzije diska na agaru Mueller Hinton (Oxoid
50 Ltd., Basingstoke, UK), u skladu sa smernicama Instituta za kliničke i laboratorijske
51 standarde. Korišćeni su sledeći antibiotici: penicilin (P, 10U), amoksicilin + klavulanska
52 kiselina (AMC, 20/10µg), ampicilin (AMP, 10µg), ceftriakson (CRO, 30µg), cefotaksim (CTKS,
53 30µg), ciprofloksacin (CIP, 5µg), eritromicin (ERI, 15µg), hloramfenikol (CHL, 30µg),
54 nalidiksična kiselina (NA, 30µg) i trimetoprim + sulfametoksazol (SKST, 1,25/23,75µg) (Bio
55 Rad, Marnes-la-Coquette France).

56
57 • DNK ekstrakcija je rađena pomoću MagAttract HMV DNA kit kompleta, u skladu sa
58 uputstvima proizvođača (Qiagen, Hilden, Nemačka).

59

1 • Sekvenciranje kompletnog genoma (WGS) i analiza podataka je tokom istraživanja
2 podrazumevalo sledeće postupke:

3 Biblioteka fragmenata za sekvenciranje je pripremljena korišćenjem Nextera XT chemistry
4 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Sekvenciranje oba kraja fragmenta u dužini od 300 bp
5 (2x300 bp), uz minimalnu pokrivenost od 70x, prema preporučenim standardnim protokolima,
6 je izvršeno na uređaju Illumina MiSeq. Rezultujuće FASTQ datoteke su najpre obrađene
7 uklanjanjem sekvenci adaptera, a zatim raspoređene uz pomoć programa Velvet assembler
8 (Zerbino and Birney, 2008), integrisanog u Ridom SeqSphere software (Ruppitsch et al.,
9 2015) (version 3.1; Ridom GmbH, Münster, Germany). Sekvencirani fragmenti su skraćeni na
10 5' i 3' kraju do postizanja prosečne PHRED vrednosti od 30 na segmentu od 20 baznih
11 parova. Raspoređivanje fragmenata uz pomoć Velvet assembler-a je izvršeno uz k-mer
12 vrednosti i graničnu pokrivenost optimizovane automatski za svaki genom, a zasnovano na
13 prosečnoj dužini fragmenata do >1000 bp. Fragmenti dužine manje od 200 bp ili pokrivenosti
14 manje od 5 su isključeni iz analize. Genomi sastavljeni od sekvenciranih fragmenata su
15 upoređeni sa nedavno definisanom MLST šemom esencijalnog genoma, korišćenjem
16 SeqSphere+ (Ruppitsch et al., 2015). Minimalno razapinjuće stablo je prikazano u
17 SeqSphere+ i obojeno u InkScape v. 0.91.

18
19 • Određivanje serogrupe je izvršeno uz pomoć informacija dobijenih metodom
20 sekvenciranja kompletnog genoma -WGS (Hyden et al., 2016) i uz pomoć petostrukog PCR-a
21 (Doumith et al., 2004).

22
23 • U svrhu određivanja potencijala osetljivosti na antimikrobne lekove, karakteristični
24 proteini su analizirani u odnosu na sveobuhvatnu bazu antibiotske rezistencije
25 (Comprehensive Antibiotic Resistance Database - CARD) (McArthur et al., 2013), uz pomoć
26 BLASTp programa (programa za upoređivanje nukleotidnih ili proteinskih sekvenci sa
27 sekvencama iz baza podataka i proračun statističke značajnosti njihovog podudaranja).

28
29 • Sirovi rezultati nukleotidnih sekvenci su obrađeni u European Nucleotide Archive
30 (<http://www.ebi.ac.uk/ena>)

31
32 • Urađen je PCR skrining svih 20 izolata *L. monocytogenes* na prisustvo markera za
33 otpornost na dezinficijense - transpozona *Tn6188*, koji se odnosi na toleranciju na
34 benzalkonijum hlorid. Korišćeni su PCR prajmeri dizajnirani na osnovu dostupnosti sekvence
35 za transpozona *Tn6188* u genomu *L. monocytogenes* i to konkretno za ciljani *qacH* gen i *radC*
36 gene, u okviru kojeg je inkorporiran *Tn6188* transpozona (Muller et al., 2013). Elektroforeza
37 PCR produkata je radjena na horizontalnim agaroznim gelovima uz dodavanje SYBR Safe
38 (Life Technologies) ili etidijum bromid boje. Istih 20 sojeva je, takođe, pregledano na prisustvo
39 *bcrABC* markera otpornosti uz korišćenje BcF5 i BcR prajmera za target *bcrABC* gene (Muller
40 et al., 2013). Dobijeni PCR produkti su sekvencirani u *LGC Genomics*.

41
42 • Statistička analiza dela rezultata je urađena u softveru MINITAB, verzija 16.0, kao i u
43 statističkom paketu PrismaPad 6.00. "Box plots" analiza je korišćena za ispitivanje
44 sposobnosti formiranja biofilma od strane izolata *L. monocytogenes*.

45
46 U poglavlju **Rezultati ispitivanja** navodi se najpre da je tokom četvorogodišnjeg perioda (od
47 2011. do 2014. godine) uzorkovano ukupno 671 uzoraka iz ispitujućeg proizvodnog pogona
48 za preradu mesa i to 531 uzoraka proizvoda od mesa i 140 briseva iz pogona. Tokom
49 pomenutog perioda ispitivanja, prisustvo *L. monocytogenes* je ustanovljeno kod ukupno 20
50 (2,98%) uzoraka, odnosno u 18 (3,39%) uzoraka proizvoda od mesa i u 2 (1,43%) uzorka
51 briseva sa površina proizvodnog pogona za preradu mesa.

52 Ispitivanjem sposobnosti formiranja biofilma pomoću testa na mikrotitarskim pločama,
53 utvrđeno je da svih 20 izolata *L. monocytogenes* formiraju biofilm. Uočena je varijabilnost u
54 formiranju biofilma unutar kompleksa, ali varijacije u kapacitetu formiranja biofilma na nivou
55 serogrupe nisu primećene. Rezultati istraživanja su pokazali snažan uticaj hranljivih materija
56 iz medijuma na proizvodnju biofilma od strane *L. monocytogenes*. Primećene su značajne
57 razlike između dve grupe izolata u njihovoj sposobnosti da formiraju biofilmove. "Box plots"
58 analizom su ilustrovane srednje vrednosti merenja, kao i razlike u dobijenim rezultatima o
59 sposobnosti formiranja biofilma od strane ispitivanih izolata *L. monocytogenes*.

1 Odabrani izolat, poreklom od suve kobasice i identifikovan kao jak proizvođač biofilma, nije
2 bio u stanju da formira biofilm na površini nerđajućeg čelika. Skenirajućom elektronskom
3 mikroskopijom (SEM) su na površini nerđajućeg čelika ustanovljene pojedinačne ćelije i diplo-
4 forme V ili Y oblika, nakon inkubacije izolata *L. monocytogenes* u TSB u trajanju od 72h na
5 30°C.

6 Svih 20 izolata *L. monocytogenes* je u disk difuznom testu pokazalo osetljivost na antibiotike
7 sa terapijskom ulogom u lečenju listerioze: penicilin, amoksicilin + klavulanska kiselina,
8 ampicilin, ciprofloksacin, eritromicin, hloramfenikol i trimetoprim + sulfametoksazol. Sa druge
9 strane, kod istih izolata *L. monocytogenes* evidentirana je rezistencija na dejstvo cefalosporina
10 (ceftriakson i cefotaksim) i nalidiksične kiseline.

11 Na osnovu rezultata sekvenciranja kompletnog genoma (WGS), ustanovljeno je, osnovu
12 sedam konstitutivnih (eng. *housekeeping*) gena (*abcZ*, *bglA*, *cat*, *dapE*, *dat*, *ldh* i *lhkA*), da
13 ispitivani izolati *L. monocytogenes* potiču iz četiri tipa sekvence (ST515, ST8, ST21, ST121),
14 grupisane u četiri glavna klonalna kompleksa (CC1, CC8, CC21, CC121). Rezultati metode
15 tipizacije multilokusnih sekvenci "core" genoma (eng. *Core genome multilocus the sequence*
16 *typing – cgMLST*) izolata *L. monocytogenes* su grafički prikazani, pri čemu svaki krug
17 predstavlja alelni profil zasnovan na analizi sekvenci 1701 gena. Na povezujućim linijama
18 prikazanog stabla minimalnog račvanja (eng. *Minimum spanning tree - MST*) upisani su
19 brojevi koji ilustruju broj ciljnih gena sa različitim alelima. Izolati koji pripadaju jednom klasteru
20 svrstani su u "kompleks" srodnih genotipova (≤ 10 alela razlike) i na slici osenčeni sivom
21 bojom. Izolati grupisani u okviru istog tipa sekvence su prikazani istom bojom sa naznakom
22 godine njihove izolacije

23 Komleks 1, ujedno i najveći, činili su izolati iz serogrupe IIa (linija II), klaster tipa CT5746, tipa
24 sekvence ST21 i klonalnog kompleksa CC21. Unutar ovog kompleksa su se nalazili izolati koji
25 se međusobno razlikuju sa maksimalnom alelskom razlikom u tri gena. Izolati *L.*
26 *monocytogenes* koji su pripadali tipu sekvence ST21 su izolovani iz suve kobasice, pršute i
27 briseva proizvodnog pogona, uzorkovanih tokom 2011. i 2013. godine. Dva izolata *L.*
28 *monocytogenes*, poreklom od briseva iz proizvodnog pogona, od njih 140 koliko ih je ukupno
29 bilo uzorkovano tokom četvorogodišnjeg perioda, genetski su identična i izolovani su sa
30 daske za presovanje usoljene pršute i sa poda u prostoriji za soljenje pršute, tokom 2011.
31 godine.

32 Kompleks 2 je sadržao izolate koji su pripadali serograpi IIa (linija II), klaster tipovima
33 CT5747 i CT5750, tipu sekvence ST121 i klonalnom kompleksu CC121. Ovim kompleksom
34 su obuhvaćeni izolati sa maksimalnom alelskom razlikom u deset gena. Izolati koji formiraju
35 ovaj kompleks, poticali su iz suve kobasice, suve pancete, suve pečenice i suvog vrata,
36 uzorkovanih u periodu od 2012. do 2014. godine.

37 Kompleks 3 je sadržao izolate serogrupe IIa (linija II), različitih klaster tipova: CT295, CT1358
38 i CT5748, tipa sekvence ST8 i klonalnog kompleksa CC8. Izolati unutar ovog kompleksa su se
39 razlikovali maksimalnom alelskom razlikom u četiri gena. Pršut, suva kobasica, mleveni fil za
40 punjenje kobasica i suva pečenica su proizvodi iz kojih su izolovane *L. monocytogenes* iz
41 kompleksa 3 sa tipom sekvence ST8.

42 Od svih ispitivanih izolata, samo jedan je pripadao serograpi IVb (linija I), klaster tipu CT5749,
43 tipu sekvence ST515 i klonalnom kompleksu CC1, a izolovan je iz suve pečenice u komadu,
44 2012. godine.

45 Metodom sekvencioniranja celokupnog genoma, obezbedile su se i informacije o profilima
46 gena odgovornih za rezistenciju na antimikrobne lekove. U tu svrhu karakteristični proteini su
47 analizirani u odnosu na sveobuhvatnu bazu antibiotske rezistencije (Comprehensive Antibiotic
48 Resistance Database - CARD) uz pomoć BLASTp programa (programa za upoređivanje
49 nukleotidnih ili proteinskih sekvenci sa sekvencama iz baza podataka i proračunu statističke
50 značajnosti njihovog podudaranja).

51 Izolati unutar kompleksa 1 (CC21) su se karakterisali posedovanjem dva gena za enzime koji
52 modifikuju ciljna mesta delovanja antibiotika na ćelijskom zidu: *mprF* gen koji kodira enzim
53 zadužen za promenu naelektrisanja ćelijskog zida i *fosX* gen - za enzim koji određuje
54 rezistenciju na fosfomicin. Navedene gene su takođe posedovali i izolati svrstani u okviru
55 kompleksa 2 (CC121). Izolati *L. monocytogenes*, svrstane u okviru kompleksa 3 (CC8),
56 posedovali su samo *mprF* gen antimikrobne rezistencije, a prisustvo ovog gena je
57 ustanovljeno i kod jedinog izolata *L. monocytogenes* koji je pripadao IVb serograpi i
58 kompleksu CC1.

59

1 PCR skringom svih izolata *L.monocytogenes* na prisustvo Tn6188 i *brcABC* markera
2 rezistencije na dezinficijense, ustanovljeno je da je transpozon Tn6188, koji se odnosi na
3 toleranciju na benzalkonijum hlorid, prisutan kod šest izolata iz klonalnog kompleksa CC121,
4 sekvencionog tipa ST121, serogrupe IIa. Geni svrstani u *brcABC* kasetu, odgovorni za
5 plazmid-vezanu genetsku karakteristiku otpornosti prema kvaternarnim amonijum solima, nisu
6 detektovani.

7
8 U poglavlju **Diskusija** kandidat kritički razmatra dobijene rezultate i poredi ih sa rezultatima
9 drugih autora. Najpre se razmatra nalaz *L.monocytogenes* u ispitivanim uzorcima proizvoda i
10 briseva sa površina proizvodnog pogona za preradu mesa. Potom se diskutuje o sposobnosti
11 formiranja biofilma i rezistencije na antibiotike sojeva *L. monocytogenes* izolovanih iz hrane.
12 Takođe analitički se razmatraju rezultati sekvenciranja kompletnog genoma ispitivanih izolata,
13 sa ciljem ustanovljavanja izvora kontaminacije. Na kraju diskutuje se o identifikaciji gena
14 rezistencije na antimikrobne lekove, kao i markera za otpornost na dezinficijense.

15
16 U **Spisku literature** kandidatkinja je u doktorskoj disertaciji navela 143 reference.

17 18 VI **ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA** (navesti zaključke koji su prikazani u doktorskoj 19 disertaciji):

20
21 Na osnovu sprovedenog ispitivanja i razmatranja dobijenih rezultata zaključeno je sledeće:

- 22
23 1. Tokom četvorogodišnjeg perioda ispitivanja, od ukupno 671 ispitanih uzoraka
24 proizvoda od mesa (531) i briseva sa površina proizvodnog pogona za preradu
25 mesa (140), prisustvo *L.monocytogenes* je ustanovljeno kod 20 (2,98%) uzoraka,
26 odnosno u 18 (3,39%) uzoraka proizvoda od mesa i u 2 (1,43%) uzorka briseva sa
27 površina proizvodnog pogona za preradu mesa.
- 28 2. Kod svih ispitivanih sojeva *L.monocytogenes* potvrđena je njihova sposobnost
29 formiranja biofilma, koja je kod četiri soja bila snažna, a umerena kod ostalih
30 ispitivanih sojeva. Uočena je varijabilnost u formiranju biofilma unutar kompleksa,
31 ali varijacije u kapacitetu formiranja biofilma na nivou serogrupe nisu primećene.
- 32 3. Formiranje biofilma na površini nerđajućeg čelika, od strane odabranog soja sa
33 osobinama snažnog produkora biofilma, nije zabeleženo skenirajućom
34 elektronskom mikroskopijom (SEM), već su ustanovljene pojedinačne ćelije i diplo-
35 forme V ili Y oblika.
- 36 4. Svi ispitivani izolati *L.monocytogenes* su u disk difuznom testu pokazali osetljivost na
37 antibiotike sa terapeutskom ulogom u lečenju listerioze: penicilin, amoksicilin +
38 klavulanska kiselina, ampicilin, ciprofloksacin, eritromicin, hloramfenikol i trimetoprim
39 + sulfametoksazol. Rezistencija je ustanovljena na dejstvo cefalosporina
40 (ceftriaksona i cefotaksima) i nalidiksične kiseline.
- 41 5. Metodom sekvenciranja kompletnog genoma, utvrđeno je da ispitivani izolati
42 *L.monocytogenes* potiču iz četiri tipa sekvence (ST515, ST8, ST21, ST121),
43 grupisane u četiri glavna klonalna kompleksa (CC1, CC8, CC21, CC121).
44 Ustanovljena velika povezanost izolata unutar sekvencionog tipa (ST) ukazuje da su
45 oni bili prisutni u proizvodnom pogonu tokom dužeg vremenskog perioda.
- 46 6. Svi ispitivani izolati *L.monocytogenes* su pripadali serograpi IIa (linija II) , osim
47 jednog, koji je pripadao serograpi IVb (linija I).
- 48 7. Gen rezistencije na antimikrobne lekove - *mprF* je utvrđen kod svih ispitivanih izolata
49 *L.monocytogenes*. Kod sojeva klonalnih kompleksa CC21 i CC121, serogrupe IIa,
50 detektovan je *fosX* gen, dok u genomima klonalnih kompleksa CC8 (serogrupe IIa)
51 CC1, serogrupe IVb, nije ustanovljen.
- 52 8. Otpornost na benzalkonijum hlorid ustanovljena je kod je kod šest izolata
53 *L.monocytogenes*, klonalnog kompleksa CC121, sekvencionog tipa ST121,
54 serogrupe IIa, gde su evidentirani geni za transpozon Tn6188. Nasuprot tome, ni u
55 jednom ispitivanom izolatu nije utvrđena otpornost na kvaternarne amonijumove soli,
56 odnosno prisustvo gena za *brcABC*.
- 57 9. Kontaminacija proizvoda od mesa ukazuje da *L.monocytogenes* opstaje u
58 proizvodnom pogonu za preradu mesa i neophodno je poboljšati postojeće
59 intergrisane sisteme kontrole.
60

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

4
5 Komisija smatra da su dobijeni rezultati ispitivanja u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima
6 istraživanja i da zaključci ove doktorske disertacije proizilaze iz dobijenih rezultata. Dobijeni
7 rezultati prikazani su tabelarno i grafički i na osnovu toga kritički tumačeni, jasno i razumljivo.

8
9 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**

10
11 **1. Da li je disertacija napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme?**

12
13 Doktorska disertacija je u potpunosti napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi
14 teme.

15
16 **2. Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?**

17
18 Doktorska disertacija Ivane Zuber Bogdanović sadrži sve bitne elemente koji su neophodni i
19 zahtevaju se za završenu doktorsku disertaciju.

20
21 **3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?**

22
23 Originalan doprinos nauci doktorske disertacije Ivane Zuber Bogdanović su rezultati koji
24 ukazuju da se analizom izolovanih sojeva *L.monocytogenes* iz proizvoda od mesa, kao i
25 površina proizvodnog pogona za preradu mesa, primenom sekvenciranja kompletnog
26 genoma (WGS), značajno pomaže bržem i kompletnijem sagledavanju izvora i puteva
27 kontaminacije ovom patogenom bakterijom. Ovo istraživanje takođe ukazuje da rezultati
28 ispitivanja osetljivosti na antimikrobne lekove mogu doprineti efikasnijim terapijama listerioze
29 ljudi, dok bi rezultati ispitivanja markera za otpornost na dezinficijense, u značajnoj meri
30 olakšali subjektima u poslovanju sa hranom odabir najefikasnijih preventivnih i korektivnih
31 mera u cilju borbe protiv ovog patogena prenosivog hranom, a koji dugo može opstati u
32 proizvodnim pogonima za hranu.

33
34 **4. Da li je mentor tokom provere originalnosti disertacije utvrdio neopravdano**
35 **preklapanje teksta sa drugim publikacijama (odgovoriti sa da ili ne): NE**

36
37
38 **IX SPISAK NAUČNIH RADOVA SADRŽINSKI POVEZANIH SA DOKTORSKOM**
39 **DISERTACIJOM U KOJIMA JE DOKTORAND PRVI AUTOR ODNOSNO AUTOR SA**
40 **NAJVEĆIM DOPRINOSOM (napisati imena svih autora, godinu objavljivanja, naslov**
41 **rada, naziv časopisa, impakt faktor i klasifikaciju prema Pravilniku o postupku, načinu**
42 **vrednovanja, i kvantitativnom iskazivanju naučnoistraživačkih rezultata istraživača):**

43
44 **Rad u međunardnom časopisu izuzetnih vrednosti (M21a)**

- 45
46 1. **Zuber, I.,** Lakicevic, B., Pietzka, A., Milanov, D., Djordjevic, V., Karabasil, N.,
47 Teodorovic, V., Ruppitsch, W., Dimitrijevic, M.(2018). Molecular characterization of
48 *Listeria monocytogenes* isolates from a small scale meat processor in Montenegro,
49 2011–2014. Food Microbiology, 79: 116-122.

50
51 **Saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u celini (M33 =1)**

- 52
53 1.Brankica Lakićević, Z. Petrović, Dubravka Milanov, **Ivana Zuber**, Vesna Janković,
54 Nevena Grković, Mirjana Dimitrijević (2019). Influence of two different culture media
55 on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* isolated from a small-scale meat
56 processing facility. In Book of Proceedings of of 60thInternational Meat Industry
57 Conference MEATCON2019, IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science
58 333 (2019) 012033, IOP Publishing. DOI: 10.1088/1755-1315/333/1/012073

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

X PREDLOG:

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

- **da se doktorska disertacija prihvati a kandidatu odobri odbrana**
- ~~da se doktorska disertacija vrati kandidatu na doradu~~
- ~~da se doktorska disertacija odbije~~

DATUM

27.12.2019.

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

Dr Mirjana Dimitrijević, redovni profesor,
Fakultet veterinarske medicine,
Univerzitet u Beogradu

Dr Brankica Lakićević, viši naučni saradnik
Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd

Dr Vlado Teodorović, redovni profesor,
Fakultet veterinarske medicine,
Univerzitet u Beogradu

Dr Dejan Krnjaić, redovni profesor,
Fakultet veterinarske medicine,
Univerzitet u Beogradu.

Dr Vesna Đorđević, naučni savetnik
Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd
