

Биолошки факултет
Број захтева: 15/207-1
Датум: 06.04.2012.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ВЕЋУ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ ПРИРОДНИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији

Молимо да, сходно члану 46. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду («Гласник Универзитета», број 131/06), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата: **Мр Гордане В. Козодеровић, дипломираног биолога.**

КАНДИДАТ: **Мр Гордана В. Козодеровић**

пријавио је докторску дисертацију под називом:

„Анализа природе резистенције на хинолоне и молекуларна типизација одабраних серотипова *Salmonella enterica subspecies enterica*“.

из научне области: Биологија, Молекуларна биологија бактерија.

Универзитет је дана 05.05.2011. године, својим актом под бр. 02 број: 06-5614/28-11 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата која је гласила:

„Анализа природе резистенције на хинолоне и молекуларна типизација одабраних серотипова *Salmonella enterica subspecies enterica*“.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата: **Мр Гордане В. Козодеровић**, образована је на II редовној седници Наставно- научног већа Универзитета у Београду- Биолошког факултета, одржаној 04.11.2011. год, одлуком Факултета под бр.15/526-04.11.2011. год. у саставу:

Име и презиме члана Комисије

Звање

Научна област

1) Др Јелена Лозо

Доцент
Универзитет у Београду-
Биолошки факултет

Биохемија и
молекуларна биологија

2) Др Весна Милошевић

Редовни професор
Универзитет у Новом Саду-
Медицински факултет

Микробиологија

3) Др Маја Велхнер

Научни саветник
Научни институт за
ветеринарство „Нови Сад“

Микробиологија

4) Др Наташа Голић

Виши научни сарадник
Универзитет у Београду-
Институт за молекуларну
генетику и генетичко
инжењерство

Молекуларна генетика и
генетичко инжењерство

Наставно-научно веће Биолошког факултета Универзитета у Београду прихватило је извештај Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата мр Гордане В. Козодеровић на VI редовној седници одржаној 06. априла 2012. године.

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић- Вукчевић

Прилог: 1. Извештај Комисије са предлогом.

2. Акт Наставно-научног већа факултета о усвајању извештаја.



УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Студентски трг 16
11000 БЕОГРАД
Република СРБИЈА
Тел: +381 11 2186 635
Факс: +381 11 2638 500
Е-пошта: dekanat@bio.bg.ac.rs

15/207-06.04.2012.

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 59. став 1. тачка 1. Статута Универзитета у Београду- Биолошког факултета, Наставно- научно веће Факултета, на VI редовној седници одржаној 06.04.2012. године, донело је

О Д Л У К У

Прихвата се Извештај Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата:

Мр Гордане В. Козодеровић, под насловом:

„Анализа природе резистенције на хинолоне и молекуларна типизација одабраних серотипова *Salmonella enterica subspecies enterica*“.

Универзитет је дана 05.05.2011. године. својим актом под бр. 02 број: 06-5614/28-11 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације кандидата.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја:

Kozoderović G., Velhner M, Jelesić Z, Stojanov I, Petrović T, Stojanović D, Golić N. 2011. Molecular typing and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from poultry, food, and humans in Serbia. Folia Microbiol 56: 66-71. **M23**

Декан Биолошког факултета

Проф. др Јелена Кнежевић- Вукчевић

Доставити:

- Универзитету у Београду,
- докторанту,
- Стручној служби Факултета.

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На II редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 4. новембра 2011. године, прихваћен је извештај ментора др Јелене Лозо и др Весне Милошевић о урађеној докторској дисертацији мр Гордане В. Козодеровић, истраживача сарадника Института за јавно здравље Војводине под насловом „Анализа природе резистенције на хинолоне и молекуларна типизација одабраних серотипова *Salmonella enterica* subspecies *enterica*“ и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу др Јелена Лозо, доцент Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Весна Милошевић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Новом Саду, др Маја Велхнер, научни саветник Научног института за ветеринарство “Нови Сад“ и др Наташа Голић, виши научни сарадник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство у Београду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација мр Гордане В. Козодеровић написана је на 118 страна које су подељене у поглавља: Увод (42 стране), Циљеви рада (1 страна), Материјал и методе (12 страна), Резултати (20 страна), Дискусија (24 стране), Закључци (2 стране), и Литература (17 страна). Рад садржи 13 слика и 19 табела (1 Слика и 1 табела у уводу, 6 табела у материјалу и методама и 12 слика и 12 табела у резултатима) као и 209 библиографских јединица.

Анализа докторске дисертације

У **УВОДУ** ове дисертације дат је преглед актуелних литературних података о најзначајнијим аспектима у изучавању салмонела. Увод је подељен у седам одељака. Први одељак се бави основним карактеристикама бактерија из рода *Salmonella* и специфичношћу за поједине домаћине. У другом одељку направљен је кратак преглед историјата открића салмонела, а затим су описани и детаљи савремене таксономије и класификације и специфичности означавања серотипова салмонела с обзиром да већина познатих серотипова

припада подврсти *Salmonella enterica* subspecies *enterica*. У трећем одељку описане су бактериолошке и биохемијске карактеристике салмонела. Четврти одељак бави се физиолошким и молекуларним механизмима патогености салмонела и инфекцијама које изазивају код људи, животиња и биљака као и начинима опстанка салмонела у спољашњој средини. Детаљније су описане инфекције код живине гајене за људску исхрану, будући да се тематика тезе односи и на ризике од преношења салмонела са пилића на људе у ланцу исхране. У следећем одељку кандидаткиња се бави самом епидемиологијом инфекција, односно изворима, путевима и начинима преношења салмонела са животиња на људе. Дат је преглед савремених метода молекуларне типизације сојева салмонела као незаобилазни део савремених епидемиолошких студија, са освртом на корисност појединих метода у типизацији салмонела. Детаљније је описана метода типизације RAPD-PCR („randomly amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction“) која је коришћена у овом истраживачком раду. Описани су актуелни епидемиолошки трендови салмонелоза у свету и у Војводини односно на територији Јужнобачког округа. У шестом одељку разматрају се аспекти антибиотског лечења салмонелоза код људи. Седми одељак бави се молекуларним механизмима резистенције бактерија на антибиотике, проблематиком тестирања осетљивости на антибиотике, што је била и једна од метода коришћених у овом раду. Дат је преглед актуелне ситуације када је резистенција салмонела на антибиотике у питању, а затим је детаљније описана група хинолона, феномен смањене осетљивости и молекуларни механизми резистенције салмонела на хинолонску групу антибиотика, с обзиром на опасност коју наведени феномен представља у терапији.

Велики јавно здравствени значај салмонела, нарочито *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*) и ризици у безбедност исхране као и тренд растуће учесталости резистенције салмонела на антибиотике, нарочито на хинолонске препарате у свету иницирали су истраживања која су објављена у овој тези. С обзиром на потребу установљивања једноставног система молекуларно епидемиолошке типизације сојева *S. Enteritidis* детектованих у ланцу исхране, а нарочито детекције и анализе сојева салмонела резистентних на хинолоне, основни **ЦИЉЕВИ РАДА** били су: да се изврши карактеризација колекције спорадичних и епидемијских изолата *S. Enteritidis* пореклом од пилића, људи оболелих од салмонелозе и намирница живинског порекла идентификованих на подручју Јужнобачког округа у периоду 2005.-2006. године. Карактеризација је подразумевала типизацију изолата методом RAPD-PCR, резистотипизацију (одређивање маркера резистенције на антибиотике) и дефинисање молекуларних механизма резистенције на хинолоне код резистентних изолата. Следећи циљ био је да се анализира учесталост резистенције на хинолоне на већем узорку изолата *S. Enteritidis* пореклом од људи и намирница идентификованих на подручју Јужнобачког округа у периоду 2005.-2010. године. Следећи циљ је био да се одреде типови резистенције код *S. Enteritidis* резистентних на хинолоне и да се анализира појава феномена смањене осетљивости на флуорохинолоне *S. Enteritidis*, као и да се детектују мутације односно полиморфизам мутација у региону који детерминише резистенцију на хинолоне (QRDR) *gyrA* гена одговорних за резистенцију на хинолоне код *S. Enteritidis*. Један од циљева био је и да се анализира учесталост резистенције на хинолоне код других серотипова салмонела идентификованих у истом периоду као и одређивање типова резистенције код изолата других серотипова салмонела резистентних на хинолоне.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** наведени су подаци о изолатима салмонела коришћеним у истраживању, медијуми, серуми, раствори и реагенси за култивацију и идентификацију бактерија и за поједине методе, а затим кандидаткиња детаљно описује коришћене методе. Потврдна идентификација салмонела из колекције извршена је стандардним бактериолошким и серолошким тестовима, ДНК је изолована помоћу две методе - за потребе RAPD типизације и за умножавање QRDR региона *gyrA* гена. RAPD

типизација је изведена PCR методом са четири прајмера за сваки изолат. Описана је методологија за селекцију изолата резистентних на налидиксичну киселину и дифузиона метода за тестирање осетљивости на антибиотике. Детекција феномена смањене осетљивости на флуорохинолоне извршена је одређивањем минималних инхибиторних концентрација (MIC) на налидиксичну киселину (NAL) и ципрофлоксацин (CIP) агар дилуционом методом. Анализа природе и полиморфизма мутација одговорних за резистенцију на хинолоне извршена је умножавањем QRDR региона *gyrA* гена PCR методом и секвенцирањем. Дискриминативна моћ типизационих метода квантификована је израчунавањем индекса дискриминације или Симпсоновог индекса диверзитета, а сродност изолата, односно сличност RAPD профила одређена је помоћу Dice коефицијента.

У оквиру поглавља **РЕЗУЛТАТИ** кандидаткиња јасно и прегледно износи своје експерименталне резултате. Први одељак односи се на карактеризацију 60 изолата *S. Enteritidis* из пилића, људи и намирница. Приказани су карактеристични профили појединачних изолата добијени након RAPD типизације са четири прајмера и раздвајања електрофорезом у агарозном гелу. Резултати RAPD анализе омогућили су разликовање 16 генетичких група, а метода је успешно дискриминисала епидемијски сој код три изолата који потичу из епидемије у хамбургерији. Резистотипизацијом 60 изолата *S. Enteritidis* из пилића, људи и намирница је нађено укупно пет резистотипова, а вишеструка резистенција је откривена код три изолата. Детектовано је девет изолата резистентних на NAL. Феномен смањене осетљивости на флуорохинолоне показао се код свих девет изолата резистентних на NAL јер су MIC вредности за CIP биле повишене (0.256-0.512 mg/l) у односу на NAL осетљиве изолате (0.016 -0.064 mg/l). Умножавањем QRDR региона *gyrA* гена PCR методом и секвенцирањем откривене су мутације које стоје у основи резистенције на хинолоне код *S. Enteritidis*. Седам изолата је имало Asp87Asn мутацију и по један изолат је имао Asp87Gly и Ser83Phe мутацију у QRDR региону *gyrA* гена. Систем типизације који је укључивао комбинацију RAPD типизације, резистотипизације и полиморфизма мутација у QRDR региону *gyrA* гена омогућио је разликовање 22 генетички различите групе међу 60 изолата *S. Enteritidis*. Израчунавање Симпсонових индекса диверзитета открило је да је дискриминативна моћ појединачних метода типизације била је знатно нижа него дискриминативна моћ комбинације три методе ($D = 0.828$).

Откриће NAL резистентних у колекцији од 60 изолата иницирало је даље истраживање овог феномена који указује на смањену осетљивост на флуорохинолоне. Ово истраживање је укључило анализу 900 изолата *S. Enteritidis* пореклом од људи и намирница са подручја Јужнобачког округа у шестогодишњем периоду, а затим и других серотипова салмонела у циљу селекције и анализе NAL резистентних сојева. Међу 900 изолата *S. Enteritidis* откривено је 26 (2.9%) NAL резистентних изолата, од којих је код половине то био једини маркер резистенције, док је код 12 изолата резистенција на NAL била удружена са резистенцијом на ампицилин, а нађена су и два изолата резистентна на три антибиотика. Феномен смањене осетљивости на флуорохинолоне доказан је код 25 од 26 изолата. Свих 26 NAL резистентних изолата *S. Enteritidis* имало је по једну мутацију у QRDR региону *gyrA* гена, Asp87Asn је била најчешћа, а нађене су и Asp87Gly и Ser83Phe мутације. Није установљена корелација између MIC вредности за NAL и CIP и типова мутација.

Даље интересовање проширило се на истраживање резистенције на хинолоне код других серотипова салмонела, па је анализом 259 изолата различитих серотипова у шестогодишњем периоду откривено 25 изолата резистентних на NAL, који су припадали серотиповима *S. Hadar* (девет), *S. Infantis* (седам), *S. Typhimurium* (шест) и *S. Agona* (три). 76% изолата је било вишеструко резистентно на три или четири антибиотика, а резистенција на NAL била је најчешће удружена са резистенцијом на ампицилин и тетрациклин.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** кандидаткиња је анализирала учесталост најчешћих серотипова код људи, животиња и намирница у свету, у суседним земљама и у Војводини и

објаснила уочене разлике у учесталости прехранбеним навикама становништва. Затим је образложен избор RAPD типизације са одабраним прајмерима као адекватног метода за епидемиолошка истраживања сојева салмонела у светлу других метода које су коришћене у типизацији салмонела. Резултати типизације су указали на циркулацију генетички врло сродних сојева *S. Enteritidis* међу пилићима и људима на територији Јужнобачког округа и на потребу коришћења више метода типизације у циљу добијања задовољавајуће дикриминативне моћи. Није било сојева карактеристичних за поједине фарме пилића, већ је дистрибуција сојева била насумична у све три групе изолата (пилићи, људи, намирнице). Анализирани су и епидемијски изолати из једне епидемије и детекција контаминације у разним стадијумима технолошког процеса производње у фабрици бисквита са најмање четири детектована соја *S. Enteritidis*, што је јасно указивало на јаја као извор контаминације. Учесталост резистенције на NAL од свега 2.9%, и нижа учесталост осталих маркера резистенције се не уклапају у литературне податке из земаља у окружењу и у свету. Добијене резултате кандидаткиња је образложила мањом применом антибиотика у узгоју и лечењу пилића на фармама Јужнобачког округа, а нарочито у ређем третману кока носиља флуорохинолонима. Први резултати анализе мутација у QRDR региону *gyrA* гена и феномена смањене осетљивости на флуорохинолоне код салмонела у Србији говоре о постојању три врсте мутација које су и други аутори проналазили код NAL резистентних салмонела, с тим што нигде није нађена доминација Asp87Asn мутације као у овом истраживању. Ипак, резултати не говоре у прилог клоналног ширења NAL резистентних *S. Enteritidis* у Јужнобачком округу. У овом раду први пут је детектована мутација у QRDR региону *gyrA* гена код изолата који није показивао феномен смањене осетљивости на флуорохинолоне. Већа заступљеност резистенције на NAL и вишеструке резистенције на антибиотике код других серотипова салмонела у односу на серотип *Enteritidis* објашњени су претпоставком да су пилићи и животиње чије се месо користи за исхрану (где су други серотипови чешћи) изложенији интензивнијем третману антибиотикима од кока носиља које се гаје за производњу јаја, где серотип *Enteritidis* доминира.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** кандидаткиња сажето износи најважније закључке до којих се може доћи на основу анализе добијених експерименталних резултата и указује на потребу увођења адекватног система молекуларне типизације сојева и праћења појаве резистенције, нарочито резистенције на хинолоне код салмонела, у лабораторијску праксу.

На крају се налази поглавље **ЛИТЕРАТУРА** у коме је дата листа библиографских јединица.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Kozoderović G, Velhner M, Jelesić Z, Stojanov I, Petrović T, Stojanović D, Golić N. 2011. Molecular typing and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from poultry, food, and humans in Serbia. *Folia Microbiol* **56**: 66-71. **M23**

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

1. Velhner M, Kozoderović G, Jelesić Z, Stojanov I, Ratajac R, Stojanović D. 2010. Rezistencija bakterija na hinolone i njen uticaj na zdravlje ljudi i životinja. *Vet Glasnik* **64**: 277-285. **M 51**
2. Kulauzov M, Mihajlović-Ukropina M, Jelesić Z, Medić D, Kozoderović G. 2010. Sensitivity of bacteria to antimicrobial drugs and interpretation of results. *Med Pregl* **63**: 17-21. **M 51**

3. Velhner M, Kozoderović G, Jelesić Z. 2007. Molekularna karakterizacija *Salmonella enterica* serotip Enteritidis: priznate metode i njihova primena u određivanju klonalnog diverziteta. *Savremena poljoprivreda* **56**: 112-121. **M 52**
4. Velhner M, Potkonjak D, Stojanov I, Stojanović D, Petrović J, Kozoderović G. 2011. *Salmonella* control in poultry production and resistance monitoring in Serbia. *Arhiv Veterinarske Medicine* **4**: 11-22. **M 53**

БЗ. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. Kozoderović G, Jelesić Z, Velhner M. 2009. Resistance to quinolones among *Salmonella* Enteritidis isolates in Vojvodina. *Microbiologia Balkanica*, 6th Balkan Congress of Microbiology, Ohrid, Macedonia, 28-31 October, Mak Med Pregled, 63 (Suppl 78): 120 **M34**
2. Jelesić Z, Kozoderović G, Velhner M, Mihajlović-Ukropina M. 2007. Quinolone resistance in human and poultry isolates of *Salmonella* Enteritidis. *Microbiologia Balkanica*, 5th Balkan Congress of Microbiology, Budva, Montenegro, 24-27 October, Abstract book: 103 **M34**

Мишљење и предлог Комисије:

Комисија сматра да докторска дисертација мр Гордане Козодеровић „Анализа природе резистенције на хиолоне и молекуларна типизација одабраних серотипова *Salmonella enterica subspecies enterica*“ представља оригинално и научно засновано истраживање сојева салмонела у ланцу исхране. У овој докторској дисертацији је приказана прва молекуларно епидемиолошка анализа сојева *S. Enteritidis* који циркулишу међу пилићима и људима на северу Србије и прва анализа учесталости и молекуларних механизма резистенције на хиолоне код салмонела. Резултати ове тезе омогућавају примену савремених метода за ефикасно праћење и надзор над салмонелама у људској и животињској популацији и у процесу производње хране. Методологија експерименталног рада и тумачење добијених резултата одговарају постављеним циљевима. Кандидаткиња је од почетка свог научног рада у истраживању молекуларних механизма резистенције и молекуларне типизације, те располаже обимним теоријским и практичним знањем, самосталношћу и искуством у експерименталном раду.

Комисија сматра да докторска дисертација мр Гордане Козодеровић представља значајан научни и практични допринос на пољу изучавања епидемиологије и резистенције салмонела.

На основу изложеног комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета да прихвати овај Извештај и одобри јавну одбрану ове докторске дисертације.

КОМИСИЈА:

др Јелена Лозо, доцент,
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Весна Милошевић, редовни професор,
Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду

др Маја Велхнер, научни
саветник, Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“

др Наташа Голић, виши научни сарадник,
Институт за молекуларну генетику и генетичко
инжењерство, Универзитет у Београду

Београд, 23.03.2012.