

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:

10 18. oktobar 2023. godine, 249. sednica Nastavno-naučnog veća Fakulteta veterinarske
11 medicine Univerziteta u Beogradu.

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 • prof. dr Dejan Krnjaić, redovni profesor, Mikrobiologija sa imunologijom, 2016. godine,
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
 - 18 • prof. dr Milan Maletić, vanredni profesor, Ginekologija sa andrologijom, 2022. godine,
19 Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
 - 20 • dr Dušan Milivojević, naučni saradnik, Molekularna mikrobiologija, 2019. godine,
21 Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu

22
23 II PODACI O KANDIDATU:

24
25 1. Ime, ime jednog roditelja, prezime: Slobodan, Branislav, Vujinović

26
27 2. Datum rođenja, opština, Republika: 28.01.1989. godine, Šabac, Republika Srbija

28
29 3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze*:

30
31 4. Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka*:

32
33 III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:

34 Ispitivanje virulentnosti i prevalencije genotipova koagulaza pozitivnih uzročnika mastitisa krava

35
36 IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broja strana poglavlja, slika, šema,
37 grafikona i sl.):

38 Doktorska disertacija kandidata Slobodana Vujinovića napisana je na 108 strana i
39 sadrži sledeća poglavlja: Uvod (pet strana), Pregled literature (16 strana), Cilj i zadaci (jedna
40 strana), Materijal i metode (12 strana), Rezultati (16 strana), Diskusija (13 strana), Zaključci
41 (dve strane), Literatura (28 strana), Biografija (jedna strana) i Prilozi 1-3 (četiri strane). Kratak
42 sadržaj na srpskom i engleskom jeziku nalazi se na prve četiri strane, a biografija kandidata i
43 izjave na poslednjih pet strana disertacije. U disertaciji se nalazi 15 slika (koje se nalaze u
44 poglavlju Rezultati), 13 tabela (po jedna tabela u poglavljima Pregled literature i Materijal i
45 metode, kao i 11 u poglavlju Rezultati) i jedan grafikon (u poglavlju Rezultati).

46
47 V VREDNOVANJE POJEDINIH DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis
48 svakog poglavlja disertacije: uvoda-do 250 reči, pregleda literature-do 500 reči, cilja i
49 zadataka istraživanja-nije ograničeno, materijal i metoda – nije ograničeno, rezultata –
50 nije ograničeno, diskusije-do 100 reči, spiska referenci-navesti broj referenci u
51 doktorskoj disertaciji):

52 U Uvodu kandidat je ukratko opisao mastitis krava kao najčešću bolest mlečnih grla
53 koja je praćena velikim zdravstvenim problemima i profitabilnošću farmi. *Staphylococcus*
54 *aureus* (*S. aureus*) je naveden kao najvažniji i najrasprostranjeniji uzročnik infektivnih mastitisa

1 u svetu, čija je kontrola dodatno zakomplikovana pojavom rezistencije datog uzročnika prema
2 antimikrobnim sredstvima i čestim izostankom očekivane terapijske efikasnosti primenjenog
3 lečenja. *S. aureus* izaziva hronične mastitise, koji se teško eliminišu iz stada mlečnih krava, što
4 zavisi, pre svega, od karakteristika izolata *S. aureus* i ekspresije različitih gena faktora
5 virulencije. Kandidat je konstatovao da se genotipske metode tipizacije sve više koriste zbog
6 njihove tačnosti i velike diskriminatorne moći, od kojih posebno mesto zauzima tipizacija
7 polimorfizma intergenskog spajsera operona gena koji kodiraju rRNK ribozoma. Od ključnog
8 značaja u utvrđivanju virulencije izolata *S. aureus* je ispitivanja prisustva gena koji kodiraju date
9 faktore: *coa* gena koji kodira enzim koagulazu, *spa* gena koji kodira protein A, gena površinskih
10 bakterijskih proteina koji posreduju u adherenciji bakterija za komponente ekstracelularnog
11 matriksa domaćina (*cflA* i *cflB* geni koji kodiraju klamping factor A i B; gen *fnbA* koji kodira
12 fibronektin vezujući protein A; *cna* gena koji kodira kolagen vezujući protein), *cap5* i *cap8* gena
13 koji regulišu ekspimiranje kapsularnih polisaharida, *efb* gena koji kodira ekstracelularni
14 fibrinogen vezujući protein, *icaA* i *icaD* gena odgovornih za produkciju biofilma, kao i se gena i
15 gena *tsst-1* koji kodiraju produkciju enterotoksina i toksina 1 toksičnog šok sindroma. Da bi se
16 problem mastitisa mlečnih krava, koji su često perzistentni, sveo na najmanju moguću meru,
17 kandidat ističe da je neophodno dobro poznavanje virulencije datog izolata *S. aureus*, kako bi
18 se na osnovu tih saznanja mogle primeniti efikasne i efektivne mere kontrole.

19 Poglavlje ***Pregled literature*** je podeljeno u pet potpoglavlja. U prva dva potpoglavlja
20 kandidat je izvršio analizu radova koji se odnose na mastitis krava kao i karakteristike
21 stafilokoknog mastitisa. Istakao je da mastitis krava predstavlja jedan od najaktuelnijih
22 problema u proizvodnji mleka, koji nanosi velike ekonomske gubitke, a da direktni ekonomski
23 gubici kod mastitisa obuhvataju: troškove lekova, troškove veterinarskih usluga, odbačeno
24 mleko lečenih životinja, a u nekim teškim slučajevima i uginuće životinja. Naveo je i indirektno
25 gubitke koji obuhvataju smanjenje proizvodnje i kvaliteta mleka, prevremeno izlučivanje
26 hronično obolelih životinja i poremećaje plodnosti. Dodatno je istakao da mastitis krava
27 potencijalno ugrožava javno zdravlje jer se mlekom koje potiče iz vimena obolelih krava mogu
28 preneti toksini i uzročnici zoonotskih bolesti. Naveo je da se mastitisi mogu pojaviti u klinički
29 vidljivoj formi sa raširenošću od 1-3% i supkliničkoj formi sa raširenošću preko 30% krava na
30 farmama. Kandidat je izneo podatke da mastitise uzrokuje širok spektar mikroorganizama, i to
31 najčešće bakterije u visokom procentu od 95-98%. Uzročnici se dele u dve grupe: kontagioznih
32 mastitisa i one čiji su uzročnici mikroorganizmi iz okruženja. Uzročnici kontagioznih mastitisa
33 prisutni su i razmnožavaju se u mlečnoj žlezdi, šire se sa četvrti na četvrt, i sa životinje na
34 životinju uglavnom tokom nehigijenskog i nepravilnog postupka muže. U ovu grupu spada i *S.*
35 *aureus* koji u većini slučajeva dovodi do supkliničkog hroničnog mastitisa praćenog povišenim
36 brojem somatskih ćelija i povremenom manifestacijom kliničke forme bolesti. U trećem
37 potpoglavlju kandidat je izneo podatke iz literature koji se odnose na taksonomiju i osnovne
38 karakteristike *Staphylococcus* spp. uključujući njihovu morfologiju, biohemijske i kulturne
39 osobine. U datom potpoglavlju detaljno su izneti najnovija shvatanja vezana za genom i faktore
40 virulencije. Kandidat je izneo literature podatke koji se odnose na faktore virulencije koji su
41 povezani za ćelijski zid bakterije, egzozime i egzotoksine, i istakao značaj utvrđivanja profila
42 gena virulencije sojeva *S. aureus*. U sledećem potpoglavlju navode se podaci vezani za
43 antimikrobna sredstva i rezistenciju bakterija, mehanizme rezistencije kao i horizontalni transfer
44 gena. Kandidat je u poslednja dva potpoglavlja pregleda literature detaljno izložio podatke o
45 načinu postavljanja pouzdane dijagnoze i savremenim pristupima kontrole stafilokoknih
46 mastitisa na farmama. Veoma detaljno su prezentovane najnovije reference vezane za
47 genotipske metode tipizacije koje se sve više primenjuju zbog njihove tačnosti i velike
48 diskriminatorne moći. Doktorand je sveobuhvatno opisao različite metode utvrđivanja
49 genetskog polimorfizama - genotipizacije stafilokoka uključujući PFGE metodu elektroforeze u
50 pulsnom polju, MLST metodu tipizacije sekvenci većeg broja gena kao i brojnih PCR metoda:
51 RAPD metode nasumičnog umnožavanja DNK), AFLP metode utvrđivanja polimorfizma dužine
52 amplificiranih fragmenata enzimiški isečene DNK uz primenu specifičnih adaptora i RFLP
53 metode utvrđivanja polimorfizma dužine amplificiranih fragmenata uz primenu restrikcioni
54 enzima. Kandidat je kao genotipizacije koje se najčešće kod *S. aureus* primenjuju istakao *spa*
55 metodu tipizacije gena proteina A kao i PCR amplifikaciju intergenskog spajsera operona gena
56 koji kodiraju rRNK ribozoma (RS-PCR metoda). Kako je poslednjih godina drastično pojeftinila
57 metoda sekvenciranja celog genoma (WGS) i ona se sve češće primenjuju u genotipizaciji
58 izolata *S. aureus*.

1 **Cilj istraživanja** doktorske disertacije je bio da se izvrši suptipizacija sojeva *S. aureus*
2 izolovanih iz uzoraka mleka kod mastitisa krava i ustanovi prisustvo najvažnijih faktora
3 virulencije i genotipova. Radi ispunjenja cilja istraživanja realizovani su sledeći **zadaci**:

- 4 1. Utvrđivanje prevalencije mastitisa krava izazvanih koagulaza pozitivnim stafilokokama
5 u Mačvanskom i Kolubarskom okrugu,
- 6 2. Ispitivanje fenotipske i genotipske karakterizacije izolata koagulaza pozitivnih
7 stafilokoka,
- 8 3. Ispitivanje osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka na antimikrobna sredstva,
- 9 4. Ispitivanje prisustva gena virulencije kod *S. aureus* izolovanih iz uzoraka mleka uzetih
10 iz pojedinih četvrti vimena krava u slučajevima mastitisa.

11 **Materijal i metode rada** su detaljno opisani u posebnom poglavlju. Uzorci mleka za
12 bakteriološku izolaciju uzročnika mastitisa prikupljeni su iz pojedinih četvrti vimena krava s
13 povećanim brojem somatskih ćelija. Za izolaciju i ispitivanje sposobnosti stafilokoka da stvaraju
14 hemolizine korišćen je krvni agar. Za umnožavanje izolovanih sojeva korišćen je hranljivi agar,
15 a manitol slani agar je služio za utvrđivanje sposobnosti fermentacije manitola. Tokom
16 identifikacije izolovanih sojeva izvođeni su sledeći testovi: katalaza test, koagulaza test, ONPG
17 test i test fermentacije maltoze. Za ispitivanje osetljivosti koagulaza pozitivnih stafilokoka na
18 antimikrobne lekove disk difuzionom metodom po Kirbi-Baueru korišćen je Mueller-Hinton agar
19 (Oxoid, Velika Britanija) i diskovi antibiotika (Bioanalyse, Turska). Rezultati ispitivanja
20 osetljivosti prema antimikrobnim sredstvima interpretirani su prema standardu (European
21 Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing- EUCAST, 2021) i upustu proizvođača
22 (Bioanalyse, Turska) kao osetljiv (S), intermedijarno osetljiv (I) i rezistentan (R) izolat na
23 pojedine antimikrobne lekove. Ekstrakcija za gene identifikacije i gene faktora virulencije
24 rađena je metodom ključanja prema protokolu Evropske Referentne laboratorije za
25 antimikrobnu rezistenciju (EU Reference Laboratories, EURL). Ekstrakcija za RS-PCR
26 genotipizaciju vršena je po postupku koji je opisao Graber uz upotrebu tris-etilen diamin tetra
27 sirćetnog pufera. Za PCR amplifikaciju korišćen je kit za pripremu reakcione smeše DreamTaq
28 Green PCR Master Mix (ThermoScientific, Litvanija), kit za pripremu reakcione smeše za
29 amplifikaciju 16S-23S rRNK, HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen, Nemačka) i prajmeri
30 (Invitrogen, Velika Britanija). Za vizuelizaciju PCR produkata korišćeni su tris-borna kiselina-
31 EDTA pufer (Invitrogen, Velika Britanija), agarozna Ultra Pure Agarose (Invitrogen, SAD), marker
32 molekulske mase DNK GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Litvanija) i
33 HyperLadde 50bp (Bioline, Velika Britanija), kao i boja za DNK produkte MaestroSafe Nucleic
34 Acid Loading Dye (MaestroGen, Tajvan). Kod genotipizacije korišćen je Agilent DNA7500 Kit
35 (Agilent, SAD). Tokom mikrobioloških ispitivanja korišćena je standardna laboratorijska
36 oprema, a za molekularna istraživanja korišćeni su između ostalog: PCR aparat ProFlex PCR
37 System (Applied Biosystems, SAD), centrifuga Centrifuge 5425 (Eppendorf, Nemačka), mini
38 centrifuga MY SPIN 6 (Thermo Scientific, SAD), vorteks LP Vortex Mixer (Thermo Scientific,
39 SAD), set automatskih pipeta FinnTimer F2 1-10 µL, 10-100 µL i 100-1000 µL (Thermo
40 Scientific, SAD), aparat za elektroforezu sa transluminatorom Mupid- exu (Advance, Japan),
41 držač za čipove (Agilent, SAD), vorteks za čipove (IKA, Velika Britanija) i bioanalizator Agilent
42 2100 Bioanalyzer (Agilent, SAD).

43 Originalni podaci koji su dobijeni u ovoj disertaciji izneti su u poglavlju **Rezultati**, a
44 prikazani su tekstualno, tabelarno, u slikama i grafikonu. Uzorci su prikupljeni u periodu od juna
45 2019. do marta 2021. godine na epizootiološkim područjima Mačvanskog i Kolubarskog okruga.
46 Ukupno je pregledano 288 farmi mlečnih krava. Veličina stada na farmama varirala je od 3 do
47 145 krava, od kojih su od 3 do 112 krava bile u laktaciji. Od ukupno 4484 pregledane krave sa
48 Mačvanskog i Kolubarskog okruga, kod 1673 krave (37,3%) ustanovljen je pozitivan nalaz na
49 CMT testu (Kalifornija mastitis test), a laboratorijskim ispitivanjem ustanovljeno je prisustvo kod
50 242 jedinice (5,4%) koagulaza pozitivnih stafilokoka kao uzročnika mastitisa. Mastitisi izazvani
51 koagulaza pozitivnim stafilokokama su nešto češće dokazani na farmama Kolubarskog okruga
52 (6,1%) nego na farmama Mačvanskog okruga (4,9%). Posmatrajući uzorak mleka kao jedinicu
53 ispitivanja, koagulaza pozitivne stafilokoke su izolovane iz 285 uzoraka mleka sa 128 farmi,
54 tako da je prevalencija koagulaza pozitivnih stafilokoka na nivou četvrti vimena bila 1,6%, dok
55 je na nivou farmi iznosila 44,4%. Najveća prevalencija koagulaza pozitivnih stafilokoka
56 ustanovljena je tokom zime (6,8%), nešto manja tokom proleća (6%) i leta (5,6%), a najmanja
57 tokom jeseni (4,2%). Primenom Hi-kvadratnog testa uočena je znatno veća prevalencija *S.*

1 *aureus* supkliničkih mastitisa na farmama sa manje od 20 krava ($P < 0,001$) i na farmama sa 20
2 do 50 krava ($P < 0,001$) u odnosu na farme sa više od 50 krava. Upotrebom modela binarne
3 logističke regresije, utvrđena je povezanost veličine farme sa pojavom *S. aureus* intramamarnе
4 infekcije. Uzimajući u obzir veliku farmu sa više od 50 krava kao referentnu kategoriju, uočen
5 je četverostruko veći rizik od pojave *S. aureus* intramamarnе infekcije kod krava koje potiču sa
6 malih porodičnih farmi sa manje od 20 grla ($P < 0,0001$). Skoro četverostruka verovatnoća od
7 pojave *S. aureus* mastitisa je utvrđena i kod mlečnih krava poreklom sa srednjih farmi (20-50
8 grla) u odnosu na krave sa velikih farmi (preko 50 grla) ($P < 0,0001$). Kod svih 285 izolata
9 dokazano je prisustvo *nuc* gena i 23S *RNK* gena specifičnih za *S. aureus*. Takođe, kod svih
10 izolata dokazano je prisustvo *coa* gena. Ispitivanjem osetljivosti izolata *S. aureus* disk
11 difuzionom metodom prema 13 antimikrobnih sredstava utvrđen je najviši procenat rezistencije
12 na penicilin 74,7%, a zatim na ampicilin 56,5%, kloksacilin 48,1%, neomicin 42,8%, gentamicin
13 27%, tetraciklin 14,7%, kombinaciju amoksicilina sa klavulanskom kiselinom 14%, linkomicin
14 12,6%, ceftriakson 10,9%, cefaleksin 8,8%, kao i kombinaciju sulfametoksazola i trimetoprima
15 4,9%. Osetljivost prema svim ispitivanim antimikrobnim sredstvima utvrđena je kod 6,3% izolata
16 *S. aureus*, dok je rezistencija prema jednom, dva, odnosno tri i više antimikrobnih sredstava
17 bila prisutna kod 11,2%, 32,3% i 50,2% izolata. PCR analizom intergenskog spajsera između
18 16S i 23S rRNK gena operona gena koji kodiraju rRNA ribozoma (RS-PCR analiza) utvrđena
19 su 33 različita genotipa, od kojih 10 genotipova imalo različite varijante. Otkriveno je ukupno 15
20 novih genotipova (GTCL, GTCM, GTCN, GTCO, GTCP, GTCR, GTCS, GTCT, GTCU, GTCV,
21 GTCY, GTCX, GTCZ, GTCQ i GTDA) i 5 novih varijanti genotipova (GTD^I, GTAF^{II}, GTAS^I,
22 GTCL^I, GTCY^I). Najveći broj izolata *S. aureus* pripadali su CLD (28,1%) i CLR klasteru (28,4%),
23 a u CLOG klaster grupisani su svi drugi genotipovi i varijante genotipova koji se javljali
24 ponaosob u malom procentu (43,5%). Pojedinačno učestalost svih ostalih genotipova koji su
25 svrstani u CLOG klaster bila je manja od 6%. Genotipovi koji pripadaju CLD klasteru nisu bili
26 prisutni kod krava na velikim farmama, a i novi genotipovi i genotipske varijante pretežno su
27 identifikovani kod mlečnih krava poreklom sa malih i srednjih farmi. Ispitivanjem prisustva gena
28 koji kodiraju faktore virulencije dokazano je prisustvo gena koji kodiraju mikrobne površinske
29 adhezine sa ulogom u prepoznavanju i vezivanju za komponente ekstracelularnog matriksa
30 domaćina (MSCRAMM) u visokom procentu. Gen *fnbA* dokazan je kod 278 izolata (97,5%),
31 *clfA* gena kod 252 izolata (88,4%) i *cna* gen kod 243 izolata (85,3%). Gen *spa* koji kodira sintezu
32 proteina A, i koji je bitan za izbegavanje opsonizacije, dokazan je kod svih izolata. Geni *cap5* i
33 *cap8* koji regulišu ekspimiranje kapsularnih polisaharida dokazani su kod 38,25% izolata,
34 odnosno kod 61,8% izolata, a *efb* gen koji kodira ekstracelularni fibrinogen vezujući protein kod
35 126 izolata (44,2%). Geni koji imaju važnu ulogu u formiranju biofilma *icaA* i *icaD* dokazani su
36 u visokom procentu. Gen *icaA* dokazan je kod 94,7% izolata, a gen *icaD* kod 93% izolata. S
37 druge strane gen *bap*, koji kodira biofilm akcesorni protein (*bap*), nije dokazan ni kod jednog
38 izolata. Od 11 istraživanih gena koji kodiraju enterotoksine, *sed* gen je detektovan kod 163
39 izolata (57,2%), *sei* gen kod 136 izolata (47,7%) i *seg* gen kod 29 (10,2%) izolata. Ostali geni
40 za sintezu enterotoksina detektovani su u manjem procentu. Prisustvo gena *ser* i *tsst-1* nije
41 dokazano ni kod jednog izolata. Gen za Panton-Valentin leukocidin, *pvl* dokazan je kod 29
42 (10,2%) izolata. Prisustvo *mecA* gena, koji kodira rezistenciju na meticilin, dokazano je kod 22
43 (7,7%) izolata. Izolati iz CLOG klastera novih genotipova i varijanti bili su jedini koji su nosili *sej*
44 i *sep* gene. To je statistički značajno u odnosu na prethodno opisane genotipove i njihove
45 varijante ($p < 0,001$). Kod CLOG klastera novih genotipova i varijanti genotipova ustanovljena je
46 frekvenciji *sea* gena od 20,4%, *seb* gena od 14,8% i *sec* gena od 14,8%.

47 U poglavlju **Diskusija** kandidat je razmotrio dobijene rezultate i uporedio ih sa
48 dostupnim podacima iz domaće i strane literature.

49 Poglavlje **Literatura** sadrži 299 bibliografskih jedinica uglavnom iz strane literature.

50

51

52

53

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

- 3 1. Na osnovu fenotipskih karakteristika identifikovano je 285 izolata koagulaza pozitivnih
4 stafilokoka, a kod svih izolata dokazano je prisustvo gena specifičnih za *S. aureus*, *nuc*
5 gena koji kodira termostabilnu nukleazu i *23S rRNK* gena, kao i *coa* gena koji kodira
6 enzim koagulazu.
- 7 2. Ispitivanjem osetljivosti izolata *S. aureus* disk difuzionom metodom prema 13
8 antimikrobnih sredstava utvrđen je najviši procenat izolata rezistentnih na penicilin
9 74,7%, a zatim na ampicilin 56,5%, kloksacilin 48,1%, neomicin 42,8%, gentamicin
10 27,0%, tetraciklin 14,7%, kombinaciju amoksicilina sa klavulanskom kiselinom 14%,
11 linkomicin 12,6%, ceftriakson 10,9%, cefaleksin 8,8%, kao i kombinaciju
12 sulfametoksazola i trimetoprima 4,9%.
- 13 3. Osetljivost *S. aureus* prema svim ispitivanim antimikrobnim sredstvima utvrđena je kod
14 6,3% izolata, dok je rezistencija prema jednom, dva, odnosno tri i više antimikrobnih
15 sredstava bila prisutna kod 11,2%, 32,3% i 50,2% izolata.
- 16 4. Prisustvo *mecA* gena koji kodira rezistenciju na meticilin, dokazano je kod 7,7% izolata
17 *S. aureus*, što predstavlja rizik od prenošenja MRSA sojeva na ljude.
- 18 5. PCR analizom intergenskog spajsera između 16S i 23S rRNK gena operona gena koji
19 kodiraju rRNA ribozoma (RS-PCR genotipizacija) utvrđena su 33 različita genotipa *S.*
20 *aureus*, od kojih su 10 genotipova imali različite varijante. Otkriveno je ukupno 15 novih
21 genotipova (GTCL, GTCM, GTCN, GTCO, GTCP, GTCR, GTCS, GTCT, GTCU,
22 GTCV, GTCY, GTCX, GTCZ, GTCQ i GTDA) i 5 novih varijanti genotipova (GTD^I,
23 GTAF^{II}, GTAS^I, GTCL^I, GTCY^I).
- 24 6. Primenom RS-PCR genotipizacije utvrđena su dva dominantna srednje kontagiozna *S.*
25 *aureus* genotipa: GTD (25,3%) i GTR^{VI} (24,2%). Pojedinačno učestalost svih ostalih
26 genotipova koji su svrstani u CLOG klaster bila je manja od 6 %.
- 27 7. Geni koji kodiraju mikrobne površinske adhezine sa ulogom u prepoznavanju i
28 vezivanju za komponente ekstracelularnog matriksa domaćina (MSCRAMM) dokazani
29 su u visokom procentu. Gen *fmbA* (kodira fibronektin vezujući proteina A) dokazan je
30 kod 97,5% izolata, *clfA* gen (kodira klamping faktor A) kod 88,4% izolata, a *cna* gen
31 (kolagen vezujući protein) kod 85,3 % izolata.
- 32 8. Gen *clfA* koji kodira faktor virulencije koji učestvuje u adherenciji detektovan je u manjoj
33 meri (64,8%) kod izolata *S. aureus* koji pripadaju novim genotipovima i varijantama
34 genotipa ($p < 0,001$).
- 35 9. Gen *spa* koji kodira sintezu proteina A dokazan je kod svih izolata.
- 36 10. Geni *cap5* i *cap8* koji regulišu ekspimiranje kapsularnih polisaharida dokazani su kod
37 38,25%, izolata odnosno kod 61,8% izolata, a *efb* gen koji kodira ekstracelularni
38 fibrinogen vezujući protein kod 44,2% izolata.
- 39 11. Geni koji imaju važnu ulogu u formiranju biofilma *icaA* i *icaD* dokazani su u visokom
40 procentu. Gen *icaA* dokazan je kod 94,7% izolata, a gen *icaD* kod 93% izolata. Ni kod
41 jednog izolata nije dokazan *bap* gen koji kodira biofilm akcesorni protein.
- 42 12. Samo kod 6,7% izolata nije dokazano prisustvo gena koji kodiraju stafilokokne
43 enterotoksine. Najčešće dokazani geni koji kodiraju stafilokokne enterotoksine su bili
44 *sed* i *sei* kod 57,2% izolata odnosno 47, 7% izolata. Izolati iz CLOG klastera novih
45 genotipova i varijanti bili su jedini koji su posedovali *sej* i *sep* gene, kao i u većem
46 procentu *sea*, *seb* i *sec* gene ($P < 0,001$).
- 47 13. Gen *tsst-1* koji kodira toksin 1 toksičnog šok sindroma nije ustanovljen ni kod jednog
48 izolata *S. aureus*.
- 49 14. Gen *pvl* koji kodira Panton-Valentin leukocidin dokazan je kod 10,2% izolata.
- 50 15. Genotipizacijom i ispitivanjem prisustva pojedinih faktora virulencije koagulaza
51 pozitivnih stafilokoka uzročnika mastitisa kod krava može se predvideti stepen
52 patogenosti i kontagioznosti izolata. Ustanovljene informacije mogu da pomognu pri
53 donošenju odluka koje mere treba primeniti za prevenciju širenja, terapiju i
54 iskorenjivanje koagulaza pozitivnih stafilokoka iz stada.
- 55

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

4
5 Rezultati istraživanja, koje je u okviru izrade doktorske disertacije sproveo doktorand, su u
6 potpunosti u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja. Dobijeni rezultati prikazani
7 su precizno, logičnim redosledom, pregledno, jasnim i razumljivim stilom, a izvedeni zaključci
8 su jasno formulisani i u skladu sa postavljenim ciljem i proizilaze iz dobijenih rezultata
9 istraživanja.

10
11 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**

12
13 **1. Da li je disertacija napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme?**

14
15 Doktorska disertacija kandidata Slobodana Vujinovića pod naslovom „Ispitivanje virulentnosti i
16 prevalencije genotipova koagulaza pozitivnih uzročnika mastitisa krava“ je napisana u skladu
17 sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme.

18
19 **2. Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?**

20
21 Doktorska disertacija kandidata kandidata Slobodana Vujinovića pod naslovom „Ispitivanje
22 virulentnosti i prevalencije genotipova koagulaza pozitivnih uzročnika mastitisa krava“ sadrži
23 sve bitne elemente u skladu sa zahtevima za završenu doktorsku disertaciju.

24
25 **3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?**

26
27 U okviru doktorske disertacije kandidata Slobodana Vujinovića izvršena je sveobuhvatna
28 genotipizacija i karakterizacija virulentnosti koagulaza pozitivnih stafilokoka uzročnika mastitisa
29 krava na epizootičkim područjima Mačvanskog i Kolubarskog okruga. Dobijeni rezultati su
30 prvi takve vrste u Republici Srbiji i omogućavaju dalja istraživanja prisustva i raširenosti različitih
31 genotipova i faktora virulencije *S. aureus* radi iznalaženja efikasnije i efektivnije borbe protiv
32 pojave i širenja mastitisa krava.

33
34 **IX SPISAK NAUČNIH RADOVA SADRŽINSKI POVEZANIH SA DOKTORSKOM**
35 **DISERTACIJOM U KOJIMA JE DOKTORAND PRVI AUTOR ODNOSNO AUTOR SA**
36 **NAJVEĆIM DOPRINOSOM (napisati imena svih autora, godinu objavljivanja, naslov rada,**
37 **naziv časopisa, impakt faktor i klasifikaciju prema Pravilniku o postupku, načinu**
38 **vrednovanja, i kvantitativnom iskazivanju naučnoistraživačkih rezultata istraživača):**

39 **1. Slobodan Vujinović, Hans Ulrich Graber, Ivan Vičić, Branislav Vejnović, Oliver Stevanović,**
40 **Dejan Krnjaić, Dušan Milivojević, Vera Katić, 2023, Genotypes and virulence factors in**
41 ***Staphylococcus aureus* isolated from dairy cows with subclinical mastitis in Serbia, Comp**
42 **Immunol Microbiol Infect Dis. Vol 101:102056. doi: 10.1016/j.cimid.2023.102056. IF 2.729,**
43 **M21.**
44

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
44

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

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

30.11. 2023. godine

1. Dr Dejan Krnjaić, red.prof.
Fakultet veterinarske medicine
Univerzitet u Beogradu

2. Dr Milan Maletić, van. prof.
Fakultet veterinarske medicine
Univerzitet u Beogradu

3. Dr Dušan Milivojević, naučni
saradnik, Institut za molekularnu
genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerziteta u Beogradu