

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
11 Dana 26.09.2018. godine, 188. sednica Nastavno-naučnog veća Fakulteta
12 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

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

- 17
18 1. **Dr Zoran Kulišić**, redovni profesor, Parazitologija, 2002. godina, Fakultet veterinarske
19 medicine Univerziteta u Beogradu - **mentor**.
20 2. **Dr Sonja Radojčić**, redovni profesor, Epizootologija, zarazne bolesti životinja i bolesti
21 pčela i sviloprelja, 2011. godina, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu -
22 **mentor**.
23 3. **Dr Dušan Mišić**, vanredni profesor, Mikrobiologija sa imunologijom, 2014. godina,
24 Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
25 4. **Dr Tamara Ilić**, vanredni profesor, Parazitologija, 2015. godina, Fakultet veterinarske
26 medicine Univerziteta u Beogradu.
27 5. **Dr Snežana Tomanović**, viši naučni saradnik, Medicinska entomologija, 2013. godina,
28 Institut za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu.

29
30 II PODACI O KANDIDATU:

31
32 1. Ime, ime jednog roditelja, prezime:

33
34 Danica, Ratko, Bogunović

35
36 2. Datum rođenja, opština, Republika:

37
38 08.05.1985. godine, Savski venac, Beograd, Republika Srbija

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 „Molekularna i serološka istraživanja prisustva bakterije *Coxiella burnetii* u
47 tkivima pasa i krpeljima (Acari: Ixodidae) sakupljenim sa ispitivanih životinja.“

48
49 IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broja strana poglavlja, slika, šema,
50 grafikona i sl.):

51
52 Doktorska disertacija kandidata dipl. vet. Danice Bogunović napisana je na 120
53 strana teksta otkucanog na računaru i sadrži sledeća poglavlja: Uvod (3 strane), Pregled
54 literature (26 strana), Cilj i zadaci istraživanja (2 strane), Materijal i metode (18 strana),
55 Rezultati (31 strana), Diskusija (19 strana), Zaključci (3 strane), Literatura (18 strana). Na
56 početku se nalazi Zahvalnica, Kratak sadržaj na srpskom i engleskom jeziku kao i Sadržaj
57 doktorske disertacije, dok se na kraju nalaze Izjava o autorstvu, Izjava o istovetnosti
58 štampane i elektronske verzije rada, Izjava o korišćenju i Biografija kandidata. U okviru
59 doktorske disertacije nalazi se 20 tabela, 13 slika i 11 grafikona.

60

1 **V VREDNOVANJE POJEDINIH DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis**
2 **svakog poglavlja disertacije: uvoda - do 250 reči, pregleda literature - do 500 reči, cilja i**
3 **zadataka istraživanja - nije ograničeno, materijal i metoda – nije ograničeno, rezultata –**
4 **nije ograničeno, diskusije - do 100 reči, spiska referenci - navesti broj referenci u**
5 **doktorskoj disertaciji):**

6
7 U poglavlju **Uvod** navodi se da je pojava najveće epidemije kju groznice u svetu, koja
8 je zabeležena u Holandiji u periodu 2007-2010. godine sa preko 4000 dijagnostikovanih
9 slučajeva, dovela do značajnog porasta interesovanja za istraživanje ovog oboljenja u
10 različitim zemljama. Iako se pojava kju groznice najčešće vezuje za ruralne sredine i kontakt
11 sa inficiranim materijalom poreklom od preživara, u poslednjim decenijama opisane su
12 epidemije nastale kao posledica kontakta sa inficiranim psima. To je naročito značajno u
13 urbanim sredinama, gde ne postoji direktni kontakt sa domaćim preživarima, koji je jedan od
14 najčešće opisanih izvora infekcije za ljude. Kandidat ukazuje na to da su podaci o kliničkoj
15 slici i patogenezu životinja oskudni i da za životinje ne postoje definisani parametri za
16 dijagnostiku, a da se zaključci izvode iz opisanih slučajeva oboljenja ljudi. S obzirom na to da
17 do sada nisu postojali podaci vezani za prisustvo *C. burnetii* kod pasa, a da je kju groznica
18 prisutna u Republici Srbiji, kandidat navodi da je svrha ove doktorske disertacije bila da se
19 ispita prisustvo uzročnika kod nevlasničkih pasa i krpelja koji na njima parazitiraju, radi
20 sticanja uvida u njihovu ulogu kao rezervoara i *sentinel* za *C. burnetii* na teritoriji grada
21 Beograda. Kandidat objašnjava zašto su odabrane metode korišćene u istraživanju, osvrćući
22 se posebno na odsustvo imunoenzimskih testova namenjenih za testiranje pasa. Na kraju
23 poglavlja Uvod objašnjeno je da je za istraživanje odabrana populacija nevlasničkih pasa jer
24 su ove životinje potpuno nezaštićene ektoantiparazitocima, ne primaju hemoprofilaksu, a
25 kreću se slobodno, čime se povećava verovatnoća da će doći u kontakt sa uzročnikom,
26 odnosno krpeljima nosiocima *C. burnetii*.

27
28 Poglavlje **Pregled literature** je podeljeno u 11 potpoglavlja. U prvom
29 potpoglavlju opisan je kratak istorijat saznanja o kju groznici. U drugom potpoglavlju
30 opisane su morfološke karakteristike *C. burnetii*, otpornost uzročnika u spoljašnjoj
31 sredini, patogenezu i mehanizmi rezistencije. U trećem potpoglavlju predstavljeni su
32 filogenetski i genomske aspekti *C. burnetii*, sa posebnim osvrtom na saznanja o
33 prisustvu endosimbionata krpelja sličnih *C. burnetii*. U četvrtom potpoglavlju kandidat
34 opisuje koje životinjske vrste mogu biti rezervoari uzročnika u prirodi i koji je njihov
35 značaj u epizootologiji, kao i značaj krpelja kao rezervoara uzročnika u prirodi. U petom
36 potpoglavlju opisani su najčešći putevi infekcije uzročnikom kju groznice. U šestom
37 potpoglavlju navedeni su faktori rizika za nastanak infekcije, shodno do sada opisanim
38 pojavama epidemija u svetu. U sedmom potpoglavlju su opisane karakteristike kliničke
39 slike kod ljudi i novija saznanja koja nameću potrebu da se redefinišu kliničke forme
40 oboljenja kod ljudi, kao i klinički simptomi koji su opisani kod određenih vrsta životinja.
41 U osmom potpoglavlju opisana je trenutna rasprostranjenost kju groznice u svetu i
42 navedene su zemlje u kojima je oboljenje prisutno u enzooskoj i epizootskoj formi. U
43 devetom potpoglavlju opisane su dijagnostičke procedure koje se koriste kod životinja i
44 ljudi, kao i njihove prednosti i nedostaci. U desetom potpoglavlju navedena je terapija
45 oboljenja, a u jedanaestom potpoglavlju opisane su preventivne mere koje se koriste u
46 suzbijanju pojave oboljenja.

47
48 U poglavlju **Cilj i zadaci istraživanja** kandidat navodi da je cilj istraživanja ove
49 doktorske disertacije obuhvatao (1) morfološku identifikaciju i determinaciju iksodidnih krpelja
50 skinutih sa nevlasničkih pasa sa teritorije grada Beograda; (2) ispitivanje prisustva *C. burnetii*
51 u krpeljima i reproduktivnim tkivima nevlasničkih pasa sa teritorije grada Beograda; (3) i
52 utvrđivanje seroprevalencije kod ispitivanih pasa ELISA testom, nastale kao posledica
53 kontakta sa uzročnikom Kju groznice.

54 Za ostvarivanje postavljenih ciljeva definisani su sledeći zadaci istraživanja:

- 55 1. Sakupljanje uzoraka krvi, materica, jajnika i semenika pri hiruškoj intervenciji (sterilizacija,
56 odnosno kastracija) nevlasničkih pasa obuhvaćenih programom sterilizacije, odnosno
57 kastracije u sklopu Strategije rešavanja problema nevlasničkih pasa i mačaka na teritoriji
58 grada Beograda i Programa kontrole i smanjenja populacije napuštenih pasa i mačaka na
59 teritoriji grada Beograda, proisteklog u okviru Strategije („*Službeni list grada Beograda*“
60 *br. 37/11*).

- 1 2. Sakupljanje krpelja sa nevlasničkih pasa podvrgnutih prethodno pomenutim hirurškim
2 intervencijama.
- 3 3. Obrada uzoraka za ispitivanje - odvajanje krvnih seruma, homogenizacija reproduktivnih
4 tkiva, pakovanje i čuvanje do dalje obrade.
- 5 4. Identifikacija i determinacija vrste, razvojnog stadijuma i pola krpelja, ispiranje krpelja u
6 opadajućim koncentracijama etanola, mehanička homogenizacija u fosfatnom puferu,
7 pakovanje i čuvanje do dalje obrade.
- 8 5. Ekstrakcija DNK iz uzoraka reproduktivnih tkiva pasa i krpelja pomoću komercijalnog kita
9 za ekstrakciju.
- 10 6. Molekularna detekcija prisustva DNK *C. burnetii* u ekstrahovanoj DNK iz uzoraka krpelja i
11 reproduktivnih tkiva pasa.
- 12 7. Prečišćavanje dobijenih nukleotidnih sekvenci pomoću komercijalnog kita za
13 prečišćavanje.
- 14 8. Određivanje redosleda nukleotida umnoženih sekvenci, obrada sekvenci i upoređivanje
15 sa analognim sekvencama deponovanim u Banci gena u cilju utvrđivanja sličnosti i razlika
16 između njih.
- 17 9. Serološka ispitivanja krvnih seruma pasa ELISA testom radi otkrivanja prisustva antitela
18 protiv *C. burnetii* kod ispitivanih pasa.
- 19 10. Statistička obrada dobijenih rezultata.

20
21 U poglavlju **Materijal i metode** detaljno je opisan način sakupljanja uzoraka,
22 metode rada primenjene u istraživanju, kao i oprema koja je korišćena. Uzorci su
23 prikupljeni na Katedri za hirurgiju, ortopediju i oftalmologiju i Katedri za porodiljstvo,
24 sterilitet i veštačko osemenjavanje Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u
25 Beogradu, prilikom sprovođenja programa sterilizacije, odnosno kastracije nevlasničkih
26 pasa u sklopu Strategije rešavanja problema nevlasničkih pasa i mačaka na teritoriji
27 grada Beograda i Programa kontrole i smanjenja populacije napuštenih pasa i mačaka
28 na teritoriji grada Beograda. Uzorci su sakupljeni u periodu od aprila do novembra.
29 Nakon sterilizacije i kastracije pasa, a tokom trajanja anestezije, od ispitivanih životinja
30 prikupljeni su uzorci krvi i reproduktivna tkiva – materice, jajnici i semenici. U
31 istraživanju je sakupljeno 105 uzoraka krvi i reproduktivnih tkiva poreklom od polno
32 zrelih pasa (31 mužjak i 74 ženke), dok su krpelji uzorkovani sa 51 psa (11 mužjaka i 40
33 ženki) u okviru grupe ispitivanih jedinki. Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne
34 sredine - Uprava za veterinu, shodno Zakonu o dobrobiti životinja, Zakonu o opštem
35 upravnom postupku i Zakonu o državnoj upravi, donelo je rešenje broj 323-07-
36 00364/2017-05/3 od 13.07.2017. godine kojim je odobreno ovo istraživanje. Iz uzoraka
37 krvi namenjenih za serološka ispitivanja izdvojeni su serumi, koji su alikvotirani i čuvani
38 na temperaturi -20 °C do dalje obrade. Reproductivna tkiva (materice, jajnici i semenici)
39 pasa uzorkovana su nakon hirurške intervencije sterilizacije, odnosno kastracije
40 i pakovana u sterilne plastične kese. Krpelji sa životinja su pažljivo skinuti pomoću
41 pincete i stavljeni u zasebne staklene bočice sa dodatkom 70% etanola. Svi uzorci (krv,
42 reproduktivna tkiva i krpelji) su propisno obeleženi, shodno životinji od koje potiču i
43 istog dana u ručnom frižideru transportovani u laboratorije.

44 Homogenizacija reproduktivnih tkiva pasa vršena je u aparatu *Bag Mixer 400 P*
45 (*Interscience*, Francuska). Ovaj metod je odabran iz razloga što je sprečeno prolivanje
46 uzorka i kontaminacija okoline; ovakvim načinom obrade maksimalno se smanjuje rizik
47 stvaranja aerosola i mogućnost nastanka laboratorijskih infekcija, a takođe i rizik
48 unakrsne kontaminacije uzoraka, uz garantovanu optimalnu ekstrakciju bakterija u
49 obrađenim uzorcima. Homogenizovani uzorci poreklom od mužjaka sačinjeni su od tkiva
50 semenika, a homogenizovani uzorci poreklom od ženki sačinjeni su od tkiva materica i
51 jajnika. Reproductivna tkiva pasa su usitnjena pomoću sterilnih makazica i skalpela, a
52 potom razređena sterilnim fiziološkim rastvorom u razmeri 1:1 u kesama sa filterom *Bag*
53 *Filter P* (*Interscience*, Francuska) poroznosti <250 µm, koje su kompatibilne s aparatom
54 *Bag Mixer 400 P*. Za homogenizaciju korišćen je program od 8 udaraca/s u trajanju 210
55 s. Nakon izvršene homogenizacije, filtrirani materijal je alikvotiran u sterilne
56 mikroeprovete i čuvan na temperaturi -20 °C do dalje obrade. Nukleinska kiselina iz
57 homogenizata reproduktivnih tkiva ekstrahovana je pomoću komercijalnog kita za
58 ekstrakciju *GeneJET Genomic DNA Purification Kit 250 preps* (*Thermo Fisher Scientific*,
59 SAD), prema uputstvu proizvođača, a ekstrahovana DNK dobijena ovim postupkom je
60 alikvotirana u sterilne mikroeprovete i čuvana na temperaturi -20 °C do dalje upotrebe.

1 Morfološka identifikacija i determinacija krpelja izvršena je pomoću stereomikroskopa
2 (*Carl Zeiss*, Jena, Nemačka), prema standardnom taksonomskom ključu. Krpelji su grupisani
3 prema životinji sa koje potiču, prema vrsti, razvojnom stadijumu i polu i čuvani na temperaturi
4 -20 °C do ekstrakcije nukleinske kiseline. Pojedinačni uzorci krpelja su najpre ispirani u seriji
5 rastvora opadajućih koncentracija etanola i nakon konačnog ispiranja u sterilnoj destilovanoj
6 vodi, osušeni na sterilnom filter papiru. Svaki krpelj je u zasebnoj sterilnoj epruveti usitnjen
7 pomoću sterilnog metalnog sečiva, a zatim je pomešan sa sterilnim fosfatnim puferom u
8 odnosu 1:1. Krpelji su potom mehanički usitnjeni i homogenizovani pomoću sterilnog
9 metalnog štapića. Homogenizovani materijal je čuvan na temperaturi -20 °C do dalje obrade.
10 Na osnovu vrste, razvojnog stadijuma i pola krpelja, kao i psa sa kog potiču, formirani su
11 zbirni uzorci (pulovi) krpelja koji su obuhvatali od 3-10 uzoraka, u zavisnosti od veličine
12 krpelja (zbirne uzorke sa više od pet krpelja su činile lutke ili larve krpelja). Prvobitno je
13 izvršena ekstrakcija nukleinske kiseline zbirnih uzoraka pomoću komercijalnog kita za
14 ekstrakciju nukleinske kiseline. Nakon izvođenja lančane reakcije polimeraze sa zbirnim
15 uzorcima i dobijanjem pozitivnih uzoraka, pristupilo se ekstrakciji nukleinske kiseline iz
16 pojedinačnih uzoraka krpelja, koji su se nalazili u okviru pozitivnih zbirnih uzoraka. Nukleinska
17 kiselina iz zbirnih uzoraka i pojedinačnih uzoraka krpelja ekstrahovana je takođe pomoću
18 komercijalnog kita za ekstrakciju *GeneJET Genomic DNA Purification Kit 250 preps* (*Thermo*
19 *Fisher Scientific*, SAD), prema uputstvu proizvođača. Ekstrahovana DNK dobijena ovim
20 postupkom je alikvotirana u sterilne mikroeprove i čuvana na temperaturi -20 °C do dalje
21 upotrebe.

22 Molekularna identifikacija *C. burnetii* u ekstrahovanoj DNK iz uzoraka organa pasa i
23 krpelja vršena je primenom metode *Trans-PCR* (*touchdown PCR*) kojom se umnožava IS1111
24 fragment ponavljajućeg regiona sličnog transpozonu. U svakoj *Trans-PCR* reakciji korišćene
25 su pozitivna i negativna kontrola. Kao pozitivna kontrola korišćena je DNK *C. burnetii*
26 ekstrahovana iz celih ćelija faze I *C. burnetii*, a kao negativna kontrola u PCR smešu je
27 dodata sterilna destilovana voda umesto nukleinske kiseline. Najpre je izvršeno ispitivanje
28 zbirnih uzoraka krpelja, a kada su dobijene trake odgovarajuće veličine izvršeno je ispitivanje
29 prisustva DNK *C. burnetii* i u pojedinačnim uzorcima krpelja, koji su se nalazili u okviru
30 pozitivnih zbirnih uzoraka U reakciji su korišćeni prajmeri – oligonukleotidne sekvence *Trans-*
31 *1* (5'-TAT GTA TCC ACC GTA GCC AGT C-3') i *Trans-2* (5'-CCC AAC AAC ACC TCC TTA
32 TTC-3'), koje daju specifičan fragment dužine 687 bp. Da bi se verifikovala ponovljivost
33 rezultata PCR reakcije su izvođene dva puta na svakom uzorku. Vizuelizacija dobijenih PCR
34 proizvoda vršena je primenom metode horizontalne elektroforeze u agaroznom gelu. Za
35 vizuelizaciju molekula DNK korišćena je boja *Midori Green DNA Stain* (*NIPPON Genetics*
36 *EUROPE GmbH*, Nemačka) koja je dodata direktno u gel. U početne bunarčiće unesena su 2
37 µl masenog DNK markera *Mass ruler DNK 100 bp ladder* (*Thermo Scientific*, SAD).
38 Elektroforeza je izvršena pri naponu 100 V, u trajanju 40 min. Umnožene sekvence su
39 vizuelno identifikovane kao trake definisane dužine 687 bp i fotografisane. Umnožene
40 sekvence prečišćene su pomoću komercijalnog kita za prečišćavanje *GeneJET™ PCR*
41 *Purification Kit* (*Thermo Fisher Scientific*, SAD) prema uputstvu proizvođača. Sekvenciranje je
42 izvršeno u oba smera korišćenjem usluga komercijalnog servisa za sekvenciranje (*MacroGen*,
43 *Europe*). Za sekvenciranje su korišćene prethodno navedene oligonukleotidne sekvence za
44 izvođenje *Trans-PCR* reakcije. Dobijene sekvence su obrađene i analizirane korišćenjem
45 softvera *BioEdit* i *MEGA 7.0* i upoređene sa odgovarajućim analognim sekvencama
46 deponovanim u Banci gena (*GeneBank*), korišćenjem osnovnog pretraživača za upoređivanje
47 sekvenci (*Basic Local Alignment Search Tool - BLAST*) u cilju utvrđivanja stepena sličnosti
48 između njih.

49 Za utvrđivanje prisustva antitela protiv *C. burnetii* u serumu ispitanih pasa korišćen je
50 komercijalni ELISA kit namenjen za dijagnostiku kju groznice preživara (*PrioCHECK™*
51 *Ruminant Q fever Ab Plate Kit, LSIVet™*, Francuska), koji se zasniva na principu indirektno
52 imunoenzimske metode. Kao pozitivna kontrola u serološkom testiranju korišćen je serum psa
53 pozitivnog na prisustvo antitela protiv *C. burnetii* dobijen iz *Agence nationale de sécurité*
54 *sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail - Anses, Laboratoire de Sophia*
55 *Antipolis* (Francuska). Kao negativna kontrola korišćen je serum sigurno zdravog vlasničkog
56 psa pre polne zrelosti, starosti šest meseci. Optimalno razređenje seruma i anti-antitela
57 konjugovanih peroksidazom (*Anti-dog IgG whole molecule - Peroxidase antibody produces in*
58 *rabbit, Sigma Aldrich*, SAD) određeni su šah titracijom. Ispitivani serumi, pozitivna i negativna
59 kontrola razređeni su rastvorom za razređenje seruma u konačnom odnosu 1/200, a anti-
60 antitela su razređena rastvorom za konjugat iz kita u konačnom odnosu 1/25.000. Svi ostali

1 koraci su rađeni prema uputstvu proizvođača, sa hemikalijama obezbeđenim u okviru
2 komercijalnog kita. Svi uzorci, kao i pozitivna i negativna kontrola su rađeni u duplikatu.
3 Reakcija, odnosno optička gustina (*optical density - OD*) je očitavana na talasnoj dužini 450
4 nm na aparatu *Multiskan Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific, SAD)* u roku od 5 min
5 od zaustavljanja reakcije.

6 Obrada uzoraka krvi, reproduktivnih tkiva poreklom od nevlasničkih pasa, zatim
7 ekstrakcija nukleinske kiseline iz uzoraka reproduktivnih tkiva i krpelja poreklom od
8 nevlasničkih pasa, kao i serološka ispitivanja sprovedeni su u laboratoriji Katedre za zarazne
9 bolesti životinja i bolesti pčela Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
10 Morfološka identifikacija i determinacija krpelja, kao i obrada krpelja i priprema za ekstrakciju
11 nukleinske kiseline izvršena je u laboratoriji Katedre za parazitologiju Fakulteta veterinarske
12 medicine Univerziteta u Beogradu. Molekularna istraživanja, sprovedena su u laboratoriji
13 Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.
14 Sekvenciranje umnoženih DNK sekvenci obavljeno je u komercijalnom servisu za
15 sekvenciranje – *Macrogen, Europe*.

16 Rezultati su statistički obrađeni u programu *IBM SPSS Statistics 21*. Za analizu
17 dobijenih rezultata upotrebljene su deskriptivne statističke metode, *Pearson-ov χ^2 test* i *Kappa*
18 statistička analiza. Rezultati su predstavljani tabelarno, slikama i grafikonima.

19
20 Poglavlje **Rezultati** podeljeno je na šest potpoglavlja. U prvom potpoglavlju
21 predstavljeni su rezultati morfološke identifikacije i determinacije krpelja poreklom sa
22 ispitivanih pasa. Identifikovane su tri vrste krpelja poreklom sa nevlasničkih pasa:
23 *Rhipicephalus sanguineus* (braon pseći krpelj), *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*.
24 U okviru vrste *R. sanguineus* ustanovljeni su adulti (mužjaci i ženke), lutke i larve.
25 Uzorci su imali morfološke karakteristike koje odgovaraju vrsti. Ustanovljeno je 228
26 krpelja vrste *R. sanguineus* od toga 40 ženki, 51 mužjak, 130 lutki i 7 larvi. Svi krpelji
27 vrste *R. sanguineus* bili su delimično ili potpuno nasisani. U okviru vrste *I. ricinus*
28 ustanovljeni su adulti (mužjaci i ženke) i lutke. Uzorci su imali morfološke karakteristike
29 koje odgovaraju vrsti. Ustanovljeno je 87 krpelja vrste *I. ricinus* i to 33 ženke, 44
30 mužjaka i 10 lutki. Svi krpelji vrste *I. ricinus* bili su delimično ili potpuno nasisani. U
31 okviru vrste *D. reticulatus* ustanovljen je samo jedan mužjak. Uzorak je imao morfološke
32 karakteristike koje odgovaraju vrsti. U drugom potpoglavlju predstavljeni su rezultati
33 distribucije krpelja poreklom sa ispitivanih pasa. Krpelji su sakupljeni sa 51
34 nevlasničkog psa (40 ženki i 11 mužjaka) od ukupno 105 ispitivanih pasa. Primenom
35 *Pearson-ovog χ^2 testa nezavisnosti* ustanovljeno je da nema statističke značajnosti
36 između pola pasa i prisustva krpelja na njima ($\chi^2=3,106$, $df=1$, $p=0,082$; $p>0,05$). U
37 istraživanju je sakupljeno ukupno 316 krpelja, a broj krpelja po životinji iznosio je od 1-
38 42. Najviše krpelja je sakupljeno u oktobru i to čak 49,68% (157/316), a najmanje u
39 junu, svega 0,63% (2/316). Od ukupno 316 sakupljenih krpelja 72,15% (228/316)
40 pripadalo je vrsti *R. sanguineus*, 27,53% (87/316) vrsti *I. ricinus*, a 0,32% (1/316) vrsti
41 *D. reticulatus*. U trećem potpoglavlju predstavljeni su rezultati molekularnih ispitivanja
42 prisustva DNK *C. burnetii* u krpeljima poreklom sa ispitivanih pasa. Svi uzorci krpelja
43 ispitani su na prisustvo IS1111 regiona *C. burnetii* primenom *Trans-PCR* metode.
44 Prvobitno je izvršeno ispitivanje zbirnih uzoraka krpelja. Nakon dobijanja umnoženih
45 sekvenci u zbirnim uzorcima krpelja, pristupilo se analizi svih pojedinačnih krpelja koji
46 su se nalazili u okviru pozitivnih zbirnih uzoraka. Umnožene specifične sekvence
47 vizuelizovane su na agaroznom gelu kao trake dužine ~687 bp. Od ukupno 316 uzoraka
48 krpelja, umnožena su 24 proizvoda poreklom iz krpelja vrste *R. sanguineus*. Umnožena
49 DNK 24 uzorka poreklom iz krpelja je prečišćena i izvršeno je sekvenciranje u oba
50 smera. Zbog prisustva IS1111 regiona u endosimbiontima krpelja koji su slični *C.*
51 *burnetii*, svi umnoženi prooizvodi su sekvencirani da bi se ustanovilo da li je umnoženi
52 fragment poreklom od endosimbionata ili od *C. burnetii*. Nakon obrade i analize
53 sekvenci dužine 653 bp ustanovljeno je da su sve sekvence poreklom iz krpelja,
54 dobijene u ovom istraživanju, međusobno identične (100% sličnosti). Zbog toga je
55 odabrana jedna sekvenca, kao reprezentativna i upoređena sa odgovarajućim
56 analognim sekvencama IS1111 regiona *C. burnetii* deponovanim u Banci gena.
57 Poređenje sekvenci pomoću osnovnog pretraživača za upoređivanje sekvenci - BLAST,
58 vršeno je i sa objavljenim sekvencama IS1111 regiona koje odgovaraju
59 endosimbiontima sličnim *C. burnetii*, da bi se isključilo prisustvo endosimbionata sličnim
60 *C. burnetii* u ispitanim uzorcima. Poređenjem sekvenci, ustanovljeno je da sekvence

1 poreklom iz krpelja dobijene u ovom istraživanju poseduju 99-100% sličnosti sa
2 sekvencama IS1111 regiona *C. burnetii* kompletne referentne sekvence M80806, zatim
3 sa sekvencama iz krpelja, životinja i ljudi poreklom iz različitih zemalja. Na taj način je
4 potvrđeno da je u ispitanim uzorcima krpelja prisutna DNK *C. burnetii* i isključeno
5 prisustvo endosimbionata. DNK *C. burnetii* ustanovljena je samo u *R. sanguineus* vrsti
6 krpelja, sa ukupnom prevalencijom od 10,53% (24/228). Najveća prevalencija je
7 zabeležena među ženka krpelja, zatim u lutkama i mužjacima ove vrste. Krpelji
8 pozitivni na prisustvo DNK *C. burnetii* poticali su sa jednog mužjaka i šest ženki
9 ispitivanih pasa. Psi sa kojih su uklonjeni krpelji pozitivni na prisustvo DNK *C. burnetii*
10 na sebi su imali od 1-36 krpelja. Od sedam pasa koji su imali pozitivne krpelje na *C.*
11 *burnetii*, sa pet su krpelji uzorkovani u aprilu, a u junu i septembru su krpelji uzorkovani
12 sa po jednog psa. Krpelji uzorkovani sa pasa u maju, oktobru i novembru nisu bili
13 pozitivni na prisustvo DNK *C. burnetii*. U četvrtom potpoglavlju predstavljani su rezultati
14 molekularnih ispitivanja prisustva DNK *C. burnetii* u reproduktivnim tkivima ispitivanih
15 pasa. Reproductivna tkiva pasa – materice i jajnici ženki, uklonjeni nakon hirurške
16 intervencije sterilizacije, odnosno semenici uklonjeni nakon kastracije mužjaka,
17 sakupljena su od ukupno 105 pasa - 74 ženke (70,48%) i 31 mužjaka (29,52%). Svi
18 uzorci tkiva ispitani su na prisustvo IS1111 regiona *C. burnetii* primenom lančane
19 reakcije polimeraze, a umnožene specifične sekvence vizuelizovane su na agaroznom
20 gelu kao trake dužine ~687 bp. Dokazivanje prisustva IS1111 regiona u uzorcima
21 poreklom od ljudi i životinja našlo je široku primenu u istraživanjima jer je specifično za
22 *C. burnetii*, s obzirom na to da nije moguće razmnožavanje endosimbionata sličnim *C.*
23 *burnetii* u kičmenjacima. U ovom istraživanju umnožene su ukupno 22 sekvence
24 poreklom iz reproduktivnih tkiva pasa, a jedna sekvenca je prečišćena i izvršeno je
25 njeno sekvenciranje radi provere dobijenog proizvoda. Poređenjem sekvence iz
26 reproduktivnih tkiva i sekvence iz krpelja dobijene u ovom istraživanju, ustanovljeno je
27 da su međusobno identične. Sekvenca je, takođe, upoređena sa odgovarajućim
28 analognim sekvencama IS1111 regiona *C. burnetii* deponovanim u Banci gena
29 poreklom od ljudi, životinja i krpelja i ustanovljena je sličnost od 99-100% sa datim
30 sekvencama. DNK *C. burnetii* ustanovljena je kod 20,95% (22/105) pasa. Od 31
31 mužjaka, DNK *C. burnetii* je otkrivena u 16,13% (5/31) uzoraka semenika. Od 74 uzorka
32 materica i jajnika uklonjenih nakon sterilizacije ženki, DNK *C. burnetii* je ustanovljena u
33 22,97% (17/74) uzoraka. Primenom *Pearson*-ovog χ^2 testa nezavisnosti ustanovljeno je
34 da nema statističke značajnosti između pola pasa i prisustva *C. burnetii* u
35 reproduktivnim tkivima ($\chi^2=0,618$, $df=1$, $p=0,432$; $p>0,05$). Od 22 psa koji u čijim je
36 reproduktivnim tkivima ustanovljeno prisustvo DNK *C. burnetii*, uzorci šest pasa su
37 sakupljeni u aprilu, dva u maju, 12 u oktobru i dva u novembru. U junu i septembru nije
38 bilo pozitivnih uzoraka reproduktivnih tkiva ispitivanih pasa. U petom potpoglavlju
39 prikazani su rezultati ispitivanja seruma pasa na prisustvo antitela protiv *C. burnetii*
40 primenom modifikovanog komercijalnog ELISA metode. Optimizacija ELISA metode za
41 testiranje seruma pasa izvršena je šah titracijom razređenja pozitivnog seruma i anti-
42 antitela konjugovanih peroksidazom (*Anti-dog IgG whole molecule - Peroxidase*
43 *antibody produces in rabbit, Sigma Aldrich*, SAD. Šah titracija je izvršena testiranjem
44 pozitivnog i negativnog seruma u razređenjima 1/100, 1/200 i 1/400, a konjugovana
45 anti-antitela su testirana u razređenjima 1/10.000, 1/20.000 i 1/25.000. Kao optimalne
46 vrednosti uzete su one kod kojih je odnos srednje vrednosti očitanih optičkih gustina
47 (*optical density - OD*) pozitivne i negativne kontrole >2 , pri čemu je OD pozitivne
48 kontrole $>0,400$. Dobijene optimalne vrednosti za razređenje seruma su iznosile 1/200,
49 a za razređenje konjugata 1/25.000. Svi serumi pasa su ispitani u duplikatu, a rezultati
50 su očitavani prema sledećoj formuli: $S/P = [OD_{uzorka} - OD_{NC}] / [OD_{PC} - OD_{NC}]$, gde je Titar
51 = $S/P \times 100$ (S/P – odnos uzorka i pozitivne kontrole; NC – negativna kontrola; PC –
52 pozitivna kontrola). Test je validan ukoliko je $OD_{PC} > 0,400$, a $OD_{PC}/OD_{NC} > 2$. Kao
53 negativni uzorci smatrani su svi uzorci čija je izračunata vrednost $S/P \times 100 \leq 40$.
54 Pozitivnim uzorcima smatrani su svi uzorci kod kojih je $S/P \times 100 > 40$. Srednja vrednost
55 očitanih OD pozitivne kontrole iznosila je 2.856, a srednja vrednost očitanih OD
56 negativne kontrole 1,388. Vrednosti OD ispitivanih seruma kretale su se u intervalu od
57 0,762 do 3,423. Od ukupno 105 ispitanih seruma, kod 29,52% (31/105) pasa je
58 ustanovljeno prisustvo specifičnih antitela protiv *C. burnetii*. Od 31 mužjaka
59 seropozitivno je bilo 32,26% (10/31), a od 74 ispitane ženke pozitivno je bilo 28,38%
60 (21/74). Primenom *Pearson*-ovog χ^2 testa nezavisnosti ustanovljeno je da nema

1 statističke značajnosti između pola pasa i prisustva specifičnog serološkog odgovora
2 protiv *C. burnetii* u serumima ispitivanih pasa ($\chi^2=0,158$, $df=1$, $p=0,691$; $p>0,05$). Od 31
3 seropozitivnog psa, po devet je uzorkovano u aprilu i oktobru, šest u maju, pet u
4 septembru i dva u novembru, dok u junu nisu ustanovljeni seropozitivni psi. U šestom
5 poglavlju predstavljen je uporedni prikaz rezultata dobijenih molekularnim i serološkim
6 metodama. Od 105 ispitanih pasa pozitivno barem jednim testom bilo je 43,81%
7 (46/105) jedinki. Kod sedam pasa (jedan mužjak i šest ženki) je ustanovljeno i prisustvo
8 DNK *C. burnetii* u reproduktivnim tkivima kao i specifična antitela u serumu. Od ovih
9 pasa jedan mužjak i jedna ženka su na sebi imali i krpelje u kojima je ustanovljeno
10 prisustvo DNK *C. burnetii*. Kod 15 seronegativnih pasa (četiri mužjaka i 11 ženki)
11 ustanovljeno je prisustvo DNK *C. burnetii* u reproduktivnim tkivima, a nije ustanovljeno
12 kod 24 seropozitivna psa (devet mužjaka i 15 ženki). Od sedam pasa koji su na sebi
13 imali krpelje u kojima je ustanovljeno prisustvo DNK *C. burnetii*, dva psa su bila
14 pozitivna primenom oba testa (ELISA i PCR), dok kod pet pasa nije ustanovljeno ni
15 prisustvo DNK *C. burnetii* u tkivima, ni specifična antitela u serumu. Usaglašenost
16 između PCR i ELISA testova primenjenih kod pasa ispitana je primenom *Kappa*
17 statističke analize. Ustanovljena je osetljivost primenjenog ELISA testa od 31,8%, dok
18 je specifičnost iznosila 71,1%. Dobijena *Kappa* vrednost iznosi 0,025 što ukazuje na
19 beznačajnu saglasnost između PCR i ELISA metode.

20
21 U poglavlju **Diskusija** kandidat je sveobuhvatno i kritički rezultate svojih istraživanja
22 upoređivao sa rezultatima sličnih studija drugih autora. Analizirani su rezultati dobijeni
23 molekularnim i serološkim ispitivanjima. Takođe, diskutovan je značaj prisustva DNK *C.*
24 *burentii* u *R. sanguineus* vrsti krpelja poreklom sa pasa.

25
26 U poglavlju **Literatura** naveden je spisak od 192 reference stranih i domaćih autora.

27 28 VI ZAKLJUČCI ISTRAŽIVANJA (navesti zaključke koji su prikazani u doktorskoj 29 disertaciji):

30
31 Na osnovu rezultata dobijenih u istraživanjima sprovedenim u okviru ove doktorske
32 disertacije, izvedeni su sledeći zaključci:

- 33
34 1. Na ispitanim nevlasničkim psima sa teritorije grada Beograda nađene su tri vrste krpelja:
35 *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*. Najzastupljenija vrsta
36 bila je *R. sanguineus*.
- 37 2. DNK *C. burnetii* otkrivena je samo u uzorcima *R. sanguineus* (u adultima i lutkama) i to
38 kod 10,53% uzoraka, poreklom sa sedam pasa.
- 39 3. U uzorcima reproduktivnih tkiva pasa primenom *Trans*-PCR metode ustanovljena je DNK
40 *C. burnetii* kod 20,95% uzoraka, odnosno kod 22 jedinke. Nisu ustanovljene statistički
41 značajne razlike u prevalenciji između ispitanih mužjaka i ženki.
- 42 4. Primenom modifikovanog komercijalnog ELISA testa, ustanovljeno je prisustvo specifičnih
43 antitela protiv *C. burnetii* u uzorcima seruma poreklom od 29,52% pasa, odnosno kod 31
44 jedinke. Nisu ustanovljene statistički značajne razike u prevalenciji između ispitanih
45 mužjaka i ženki.
- 46 5. Od svih ispitanih pasa 43,81%, odnosno 46 jedinki, je bilo pozitivno na prisustvo *C.*
47 *burnetii* primenom barem jedne metode (ELISA ili *Trans*-PCR). Kod dva psa koja su bila
48 pozitivna primenom obe metode ustanovljeno je i prisustvo krpelja pozitivnih na prisustvo
49 DNK *C. burnetii*, dok je pet pasa sa krpeljima pozitivnim na prisustvo DNK *C. burnetii* bilo
50 negativno primenom obe metode.
- 51 6. Primenom obe metode bilo je pozitivno sedam pasa, prisustvo uzročnika uz odsustvo
52 imunološkog odgovora zabeleženo je kod 15 pasa, dok uzročnik nije ustanovljen u
53 tkivima kod 24 seropozitivna pasa.
- 54 7. Metoda *Trans*-PCR kojom se otkriva ponavljajući IS 1111 region *C. burnetii* pogodna je za
55 otkrivanje prisustva DNK uzročnika u tkivima pasa i krpeljima, a sekvence IS 1111 regiona
56 dobijene u ovom istraživanju poseduju 99-100% sličnosti sa drugim sekvencama
57 poreklom iz ljudi, životinja i krpelja, deponovanih u Banci gena. Nisu ustanovljeni
58 endosimbionti krpelja slični *C. burnetii*.
- 59 8. Utvrđivanje prisustva DNK *C. burnetii* u vrsti *R. sanguineus*, koja je prvenstveno parazit
60 pasa, kao i nalaz pozitivnih krpelja na psima koji su bili pozitivni primenom *Trans*-PCR I

- 1 ELISA metode, ukazuje na to da nevlasnički psi mogu imati ulogu u ciklusu održavanja
2 uzročnika kju groznice na teritoriji grada Beograda.
- 3 9. Utvrđivanje prisustva *C. burnetii* kod klinički zdravih pasa primenom *Trans*-PCR i ELISA
4 metode, kao i dokaz prisustva uzročnika kod seronegativnih pasa, odnosno prisustvo
5 serološkog odgovora kod pasa kod kojih nije dokazan uzročnik u tkivima, sugeriše na to
6 da psi mogu biti asimptomatski nosioci *C. burnetii*.
- 7 10. Visoka seroprevalencija i prisustvo uzročnika u tkivima pasa ukazuju na to da ova vrsta
8 životinja može da bude *sentinel* za kju groznicu u Srbiji, što je značajno u slučajevima
9 pojave epidemija i epizootija, kada se isključe drugi izvori infekcije.

10
11 **VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li**
12 **su dobijeni rezultati u skladu sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li**
13 **zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):**
14

15 Svi dobijeni rezultati prikazani u okviru doktorske disertacije kandidata dipl. vet.
16 Danice Bogunović, pod naslovom „Molekularna i serološka istraživanja prisustva bakterije
17 *Coxiella burnetii* u tkivima pasa i krpeljima (Acari: Ixodidae) sakupljenim sa ispitivanih
18 životinja“, u skladu su sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja, a svi izvedeni zaključci
19 proizilaze iz dobijenih rezultata.

20
21 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**
22

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

24
25 Da.

- 26
27 2. Da li disertacija sadrži sve elemente propisane za završenu doktorsku disertaciju?

28
29 Da.

- 30
31 3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?
32

33 Mada je teritorija Republike Srbije enzoosko i endemsko područje za kju
34 groznicu, do sada nisu rađena ispitivanja prisustva *C. burnetii* kod pasa, kao i krpelja
35 koji parazitiraju na ovoj vrsti životinja. Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske
36 disertacije pružaju podatke koji ukazuju na značaj slobodnih, klinički zdravih pasa kao
37 mogućih rezervoara *C. burnetii* na području grada Beograda. Takođe, prisustvo
38 uzročnika u adultnim i preadultnim stadijumima *R. sanguineus* vrste krpelja, koji je
39 primarno parazit pasa, dodatno potvrđuje značaj ove vrste životinja u lancu održavanja
40 kju groznice u prirodi. Istraživanje sprovedeno u okviru ove doktorske disertacije je
41 inovativno, dobro osmišljeno i originalno, a tema je veoma aktuelna i značajna za
42 veterinarsku i posebno za humanu medicinu.
43

44 Doktorska disertacija je realizovana u okviru projekta „Razvoj i standardizacija
45 molekularnih i imunskih metoda u dijagnostici bakterijskih zoonoza“ (ev. br. TR 31088),
46 čiji je rukovodilac prof. dr Sonja Radojičić, a koji je finansiran od strane Ministarstva
47 prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.
48

49 **IX SPISAK NAUČNIH RADOVA SADRŽINSKI POVEZANIH SA DOKTORSKOM**
50 **DISERTACIJOM U KOJIMA JE DOKTORAND PRVI AUTOR ODNOSNO AUTOR SA**
51 **NAJVEĆIM DOPRINOSOM (napisati imena svih autora, godinu objavljivanja, naslov**
52 **rada, naziv časopisa, impakt faktor i klasifikaciju prema Pravilniku o postupku, načinu**
53 **vrednovanja, i kvantitativnom iskazivanju naučnoistraživačkih rezultata istraživača):**
54

- 55 ▪ Bogunović Danica, Stević Nataša, Sidi-Boumedine Karim, Mišić Dušan, Tomanović
56 Snežana, Kulišić Zoran, Magaš Vladimir, Radojičić Sonja (2018). Molecular
57 evidence of Q fever agent *Coxiella burnetii* in ixodid ticks collected from stray dogs
58 in Belgrade (Serbia). Acta veterinaria – Beograd, 68(3): 257-268. DOI:
59 10.2478/acve-2018-0023 (IF – 0,604, časopis međunarodnog značaja - M23)
60

1 X PREDLOG:

2

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

5 - da se doktorska disertacija prihvati a kandidatu odobri odbrana

6 - ~~da se doktorska disertacija vrati kandidatu na doradu~~

7 - ~~da se doktorska disertacija odbije~~

8

9

10

11 DATUM

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

12

13 28.09.2018.

14

15

Dr Zoran Kulišić, redovni profesor - mentor
Fakultet veterinarske medicine
Univerziteta u Beogradu

16

17

18

19

20

21

Dr Sonja Radojičić, redovni profesor - mentor
Fakultet veterinarske medicine
Univerziteta u Beogradu

22

23

24

25

26

27

Dr Dušan Mišić, vanredni profesor
Fakultet veterinarske medicine
Univerziteta u Beogradu

28

29

30

31

32

33

Dr Tamara Ilić, vanredni profesor
Fakultet veterinarske medicine
Univerziteta u Beogradu

34

35

36

37

38

39

Dr Snežana Tomanović, viši naučni saradnik
Institut za medicinska istraživanja
Univerziteta u Beogradu

40

41

42

43

44