

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: 25. 05. 2016. god., Nastavno-naučno
10 veće Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, 168. sednica.

11
12 2. Sastav komisije sa naznakom imena i prezimena svakog člana, zvanja, naziva uže
13 naučne oblasti za koju je izabran u zvanje, godinom izbora u zvanje i naziv fakulteta,
14 ustanove u kojoj je član komisije zaposlen:

15
16 dr Slobodanka Vakanjac, vanredni profesor, Ginekologija sa andrologijom, 2011. god.,
17 Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

18
19 dr Jevrosima Stevanović, vanredni profesor, Biologija, 2015. god., Fakultet veterinarske
20 medicine Univerziteta u Beogradu

21
22 dr Vera Katić, redovni profesor, Higijena i tehnologija mleka, 1996. god., Fakultet veterinarske
23 medicine Beograd Univerziteta u Beogradu

24
25 dr Vojislav Pavlović, redovni profesor u penziji, Ginekologija sa andrologijom, 2002. god.,
26 Fakultet veterinarske medicine Beograd

27
28 dr Stanko Boboš, redovni profesor u penziji, Bolesti životinja i higijena animalnih proizvoda,
29 2006. god., Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet Novi Sad

30
31 II PODACI O KANDIDATU:

32
33 1. Ime, ime jednog roditelja, prezime: Božidar, Milan, Đukić

34
35 2. Datum rođenja, opština, Republika: 20. 09. 1974, Beograd, Srbija

36
37 3. Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze*: 29. 06. 2007, Beograd, „Izolacija i
38 karakterizacija antigena *Toxoplasma gondii* i njihova primena u razvijanju ELISA testa za
39 detekciju specifičnih antitela kod svinja”

40
41 4. Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka*: Patologija i
42 terapija domaćih životinja

43
44
45 III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE: "Molekularno-genetska karakterizacija
46 *Prototheca zopfii* kao uzročnika mastitisa krava u Srbiji"

47
48 IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broja strana poglavlja, slika, šema,
49 grafikona i sl.):

50 Doktorska disertacija je napisana na 80 strana i sadrži sledeća poglavlja: Uvod (3 strane),
51 Pregled literature (26 strana), Cilj i zadaci istraživanja (1 strana), Materijal i metode rada (11
52 strana), Rezultati istraživanja (15 strana), Diskusija (6 strana), Zaključci (1 strana), spisak
53 literature (17 strana). Doktorska disertacija je dokumentovana sa 17 tabela, 3 grafikona i 14
54 slika. Na početku disertacije se nalazi kratak sadržaj na srpskom i engleskom jeziku.

55
56 V VREDNOVANJE POJEDINIH DELOVA DOKTORSKE DISERTACIJE (dati kratak opis
57 svakog poglavlja disertacije: uvoda, pregleda literature, cilja i zadataka istraživanja,
58 materijal i metoda, rezultata, diskusije, spiska referenci):

59

1 U **Uvodu** kandidat daje kratak opis jednoćelijske alge *Prototheca* spp. i njen značaj u
2 veterinarskoj i humanoj medicini. Alge iz roda *Prototheca* vode poreklo od zelenih algi roda
3 *Chlorella* sa kojima su svrstane u istu familiju *Chlorellaceae*. Međutim, alge iz roda *Prototheca*
4 su bezbojne jer su tokom evolucije izgubile hlorofil, a samim tim i sposobnost fotosinteze,
5 tako da su prešle na heterotrofni saprobn način ishrane nalik gljivama. Ove ubikvitarne
6 mikroalge se mogu naći u različitim tipovima staništa, ali najčešće su na mestima koje
7 odlikuje velika vlažnost i prisustvo organske materije (otpadne vode, zemljište, stajsko
8 đubrivo). Infekcije koje izazivaju alge iz roda *Prototheca* nazivaju se prototekoze. Među
9 životinjama, prototekoze se najčešće javljaju kod goveda i pasa a veoma retko kod mačaka.
10 Najznačajnija i najčešća klinička manifestacija infekcije algama *Prototheca* spp. je hronični
11 mastitis goveda jer izaziva nepovratno smanjenje proizvodnje mleka, što je zabeleženo u
12 mnogim zemljama. Zahvaljujući sposobnosti da inficiraju i opstaju u makrofagama i invadiraju
13 tkivo mlečne žlezde, patogeni mogu izazvati perzistentnu infekciju sa povremenim recidivima
14 bolesti. Prototekalni mastitis goveda u najvećem broju slučajeva izaziva vrsta *Prototheca*
15 *zopfii* (*P. zopfii*) genotip 2, a znatno ređe vrsta *Prototheca blaschkeae* (*P. blaschkeae*).

16
17 Poglavlje **Pregled literature** podeljeno je na šest podpoglavlja. U *prvom podpoglavlju*
18 kandidat opisuje patogeni potencijal alge *Prototheca* spp. kod domaćih životinja i ljudi. Alge iz
19 roda *Prototheca* mogu da izazovu infekcije kod različitih životinja iz klase sisara, kao i kod
20 ljudi. Infekcije navedenim algama zovu se prototekoze i među životinjama se najčešće javljaju
21 kod goveda i praćene su akutnim do hroničnim granulomatoznim mastitisom. Mastitis izazvan
22 algama iz roda *Prototheca* naziva je prototekalni mastitis i praćen je smanjenjem proizvodnje
23 mleka i često naknadnom atrofijom inficirane četvrti. U *drugom podpoglavlju* kandidat detaljno
24 opisuje morfološke i biohemijske karakteristike alge *Prototheca* spp. Vrste iz roda *Prototheca*
25 mogu da se razmnožavaju u aerobnim i mikroaerofilnim uslovima na nekoliko standardnih
26 medijuma kao što su Columbia agar sa dodatkom 5% ovčije krvi, Sabouraud dekstrozni agar i
27 Brain heart infusion bujon. Na čvrstim podlogama ove alge uglavnom rastu kao bele do sive,
28 mutne, nehemolitične kolonije koje podsećaju na kolonije kvasaca dijametra 0,5 cm do 1 cm,
29 nakon 24-72 h inkubacije na temperturi od 25-37 °C. Razlika između vrsta prototeka jeste u
30 izgledu kolonija, morfologiji ćelija, sposobnosti razgradnje različitih šećera i alkohola, kao i
31 osetljivosti na klotrimazol i druge preparate. U *trećem podpoglavlju* kandidat opisuje kliničke
32 oblike prototekalnog mastitisa goveda, koji se najčešće javljaju u vidu hroničnog supkliničkog
33 ili umerenog kliničkog zapaljenskog procesa. Kod najčešćeg, hroničnog prototekalnog
34 mastitisa, nema promene opšteg stanja krave, slabo su izraženi simptomi mastitisa, ali je
35 izrazito povećan broj somatskih ćelija u mleku i smanjen procenat mlečne masti. Akutne
36 mastitise obično prati prisustvo gnoja, veliki broj algi, epitelnih ćelija i makrofaga u mleku.
37 Akutni mastitisi izazvani algama prelaze najčešće u hroničnu formu mastitisa. Krave obolele
38 od ovih mastitisa ne reaguju na antibiotsku terapiju, mleko nije uvek promenjeno, a broj
39 somatskih ćelija prelazi milion u mililitru mleka. Mastitisi izazvani *Prototheca* spp. dovode do
40 lokalnog i sistemskog imunskog odgovora koji zavisi od faze infekcije. Kod krava sa akutnom
41 infekcijom u mleku i krvnom serumu se može utvrditi visok nivo specifičnih imunoglobulina
42 IgG klase. U *četvrtom podpoglavlju* kandidat navodi etiološku podelu, odnosno podelu prema
43 uzročniku koji izaziva zapaljenje mlečne žlezde. Kontagiozne mastitise izazivaju
44 *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* i *Mycoplasma* spp. Kontagiozni karakter
45 mogu da imaju i infekcije izazvane sa *Trueperella pyogenes* (ređe se javljaju) i
46 *Corynebacterium bovis*, ali i infekcije koagulaza negativnim vrstama iz roda *Staphylococcus*.
47 Uzročnici poreklom iz životnog okruženja su brojne druge vrste bakterija iz roda
48 *Streptococcus*, zatim *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Serratia*
49 spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia asteroides*, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia*
50 *haemolytica*, *Bacillus cereus* i neke druge vrste mikroorganizama kao što su gljivice (*Candida*
51 *albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*) i alge iz roda *Prototheca*.
52 Zapaljenje mlečne žlezde ili mastitis krava, je oboljenje koje već jako dugo predstavlja jedan
53 od većih problema u intenzivnoj proizvodnji mleka i dovodi do značajnih ekonomskih gubitaka
54 u govedarstvu. Ekonomski gubici, nastali kao posledica mastitisa, izračunati po kravi, kreću
55 se oko 6000 dinara u slučaju supkliničkog mastitisa do oko 30000 dinara u slučaju kliničkog
56 mastitisa. Najveći gubici zabeleženi su u slučajevima kliničkih mastitisa nastalih tokom rane
57 laktacije i supkliničkih mastitisa nastalih tokom kasne laktacije. U *petom podpoglavlju*
58 kandidat navodi osnovne prirodne mehanizme odbrane mlečne žlezde od infekcija. U *šestom*
59 *podpoglavlju* prikazani su podaci iz literature o epizootiologiji i patogenezi mastitisa krava,
60 izazvanih algama iz roda *Prototheca*, koje predstavljaju problem u savremenom načinu

1 držanja mlečnih krava. Alge iz roda *Prototheca* se nalaze u okruženju mlečnih krava, pa
2 nastanak mastitisa zavisi od mnogobrojnih predisponirajućih faktora, kao što su uslovi
3 smeštaja, vlažnost u objektima, prisustvo organskih materija, nedovoljna higijena muže.
4 Infekcija se prenosi direktno sa krave na kravu tokom procesa muže, aparatima za mužu i
5 peko ruku mužača. Povećani rizik od nastanka prototekalnih mastitisa imaju krave, koje su
6 neuspešno lečene antibioticima u slučaju akutnog mastitisa izazvanog bakterijama. Dalje
7 kandidat navodi da alge iz roda *Prototheca* mogu da budu široko rasprostranjene u okruženju
8 farme muznih krava i da su visoko rezistentne na većinu antimikrobnih preparata. Zbog svega
9 navedenog, u cilju smanjenja incidencije mastitisa izazvanih algama iz roda *Prototheca* veliku
10 pažnju treba usmeriti na poboljšanje preventivnih i kontrolnih mera na nivou stada, edukaciju
11 kliničara da prepoznaju bolest i upotrebu različitih dijagnostičkih metoda u postavljenju
12 dijagnoze ovog mastitisa.

13
14
15 U poglavlju **Cilj i zadaci istraživanja** kandidat navodi da je osnovni cilj istraživanja
16 ove doktorske disertacije bio da se ispita raširenost mastitisa krava izazvanih sa *Prototheca*
17 *zopfii* i izvrši genotipizacija *P. zopfii* izolovanih u slučajevima mastitisa.

18 19 20 **Zadaci istraživanja**

21 S obzirom na cilj istraživanja, postavljeni su sledeći zadaci:

- 22
- 23
- 24 - na osnovu anamneze o neefikasnoj dugotrajnoj antibiotskoj terapiji i rezultata mastitis
- 25 testa izvršiti odabir krava od kojih će se uzimati uzorci mleka za analize;
- 26 - uzorkovanje mleka ispitivanih krava sa različitih lokacija u Vojvodini i centralnoj Srbiji,
- 27 - mikrobiološko ispitivanje uzoraka mleka i određivanje broja somatskih ćelija u
- 28 uzorcima mleka;
- 29 - identifikacija izolata *Prototheca* spp. primenom PCR tehnike i genotipizacija izolata;
- 30 - ispitivanje osetljivosti izolovanih sojeva *Prototheca* spp. na antibiotike i antimikotike
- 31 disk difuzionom metodom
- 32 - statistička analiza dobijenih rezultata
- 33 -
- 34

35 U poglavlju **Materijal i metode istraživanja** kandidat detaljno opisuje sve etape i metode
36 planiranih istraživanja. Ogljed je obuhvatao 494 mlečne krave holštajn-frizijske rase (HF) sa
37 pet farmi (A, B, C, D i E) na farmama u Vojvodini i centralnoj Srbiji. Krave su odabrane na
38 osnovu pozitivnog kalifornija mastitis testa (CMT). Ogljed je izveden u periodu od septembra
39 2015. do februara 2016.godine. Sve krave su držane u sličnim zoohigijenskim i zotehničkim
40 uslovima slobodnog i vezanog sistema gajenja. Takođe, sve krave su dobijale sličan obrok u
41 zavisnosti od proizvodne kategorije. Mužene su mašinski dva puta dnevno.

42 43 44 **Izolacija i identifikacija uzročnika**

45 Za izolovanje uzročnika mastitisa uzorci mleka zasejavani su na krvni agar (7% ovčije krvi) i
46 na Sabouraud dekstrozni agar, koji je zatim inkubisan 2-4 dana na temperaturi od 37°C.
47 Identifikacija algi rađena je na osnovu morfološkog izgleda kolonija, izgleda na
48 mikroskopskom preparatu i biohemijskog niza.

49 50 51 **Određivanje broja somatskih ćelija u mleku (SCC)**

52 Broj somatskih ćelija, u uzorcima mleka uzetim iz četvrti vimena krava, određen je primenom
53 referentne metode: Mleko- Određivanje broja somatskih ćelija: 1. deo Mikroskopska metoda
54 (SRPS EN ISO 13366-1:2010).

1 Ekstrakcija DNK iz kulture *Prototheca zopfii*

3 Ekstrakcija DNK

6 Za potrebe ekstrakcije DNK koristili su se izolati *P. zopfii* dobijeni nakon inkubacije
7 48 sati pri temperaturi od 37°C na Sabouraud dekstroznom agaru. Po završenoj inkubaciji 2-4
8 kolonije su prenete u 500 µl destilovane vode a zatim su homogenizovane na vorteks
9 mešalici. Iz dobijenog homogenog materijala izolovana je genomski DNK pomoću seta
10 Dneasy® Plant Mini Kit (Qiagen). Purifikovana DNK u nerazređenoj formi predstavljala je
11 uzorke za PCR amplifikaciju.

15 PCR

17 Za diferencijaciju različitih genotipova *P. zopfii* korišćena su tri para prajmera (Roesler i sar.,
18 2006):

- 19 - Proto 18-4f (5'-GAC ATG GCG AGG ATT GAC AGA-3'), i PZ GT 3/r (5'-GCC AAG
20 GCC CCC CGA AAG -3') za genotip 1;
- 21 - Proto 18-4f (5'-GAC ATG GCG AGG ATT GAC AGA-3') i PZ GT 2/r (5'-GTC GGC
22 GGG GCA AAA GC-3') za genotip 2;
- 23 - PZ 3-IK 3/F (5'-CAG GGT TCG ATT CCG GAG AG-3') i PZ GT 3/r (5'-GTT GGC
24 CCG GCA TCG CT-3') za genotip 3.

25 Smeša za PCR reakciju (25 µL): 12,5 µL KAPA 2G Robust HotStart ReadyMix (Kapa
26 Biosystems), po 1.25 µL svakog prajmera i 10 µL izolovane DNK. Uzorci su obrađeni u
27 PCR uređaju Multi-Gene Gradient (Labnet International Inc.). Temperaturni protokol:
28 inicijalna denaturacija na 95°C u trajanju od 5 minuta, zatim kroz 37 ciklusa smenjivali su
29 se procesi denaturacije na 95°C u trajanju od 30 sekundi, hibridizacija prajmera na 58°C
30 u trajanju od 30 sekundi (genotip 1 i 2) i 63°C za genotip 3. Elongacija prajmera u
31 trajanju od 40 sekundi na 72°C. Finalna elongacija odvijala se na 72°C poslednjih 8
32 minuta.

35 **Analiza Polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata (Restriction Fragments Length 36 Polymorphism- RFLP)**

38 Identifikacija sva tri genotipa *Prototheca* rađena je primenom RFLP tehnike nakon digestije
39 PCR produkata pomoću restrikcionih enzima. RFLP analizom otkriveni su aleli koji se
40 razlikuju po prisustvu, odnosno odsustvu restrikcionih mesta za primenjene enzime. RFLP
41 analiza, odnosno digestija PCR produkata rađena je prema preporuci proizvođača
42 restrikcionih enzima *Kpn* 21 (genotip 1), *Sma* I (genotip 2) i *Bcn* I (genotip 3). Digestovani
43 fragmenati obrađeni su elektroforetski u 2 % agaroznom gelu (Sigma-Aldrich, Nemačka) sa
44 TBE puferom u trajanju od 60 minuta. Vizuelizacija dobijenih fragmenata izvršena je pomoću
45 UV lampe nakon potapanja gela u etidijum-bromid. Dužina fragmenata je analizirana
46 primenom komercijalnih DNA markera O'RangeRuler™ 50bp i 100 bp DNA.

49 **Ispitivanje osetljivosti izolata *Prototheca* spp. na antibiotike i antimikotike disk 50 difuzionom metodom**

51 Osetljivosti izolata *P. zopfii* genotip 1 i 2 na antibiotike i antimikotike je ispitana disk
52 difuzionom metodom. Inokulum je pripremljen od nekoliko kolonija *P. zopfii*, izraslih posle
53 inkubacije 24h pri 37°C na Sabouraud dekstroznom agaru, suspenzovanih u fiziološkom
54 rastvoru do gustine 0,5 McFarland standarda. Po 0,5 ml suspenzije *P. zopfii* je ravnomerno
55 raspoređeno na površini Sabouraud dekstroznog agara i Mueller Hinton agara. Na površinu
56 Sabouraud dekstroznog agara postavljeni su diskovi antimikotika, amfotericin B (20 mcg,
57 Abtek, UK), mikonazol (10 mcg, Abtek, UK), nistatin (100 IU, Abtek, UK), ketokonazol (10
58 mcg, Abtek, UK) i griseofulvin (10 mcg, Abtek, UK), a na površinu Mueller Hinton agara
59 postavljeni su diskovi antibiotika marbofloksacin (5µg, Abtek, UK), gentamicin (10mcg,

1 Abtek, UK), kanamicin (30µg, Torlak, Srbija), oksitetraciklin (10 mcg, Abtek, UK),
2 streptomycin (30µg, Torlak, Srbija) i ceftazidim (30µg, Torlak, Srbija. Primremljene
3 antibiogram i antimikogram ploče su inkubirane 24h na 37°C (Lassa 2007). Kao kontrola
4 rasta upotrebljena je kultura referentnog soja *Candidae albicans* ATCC 10231.

5

6 U poglavlju **Rezultati istraživanja** kandidat je prikazao rezultate u tri podpoglavlja. U *prvom*
7 *podpoglavlju* prikazani su rezultati izolacije i identifikacije alge iz roda *Prototheca* i broja
8 somatskih ćelija u mleku. Od 494 četvrti vimena krava, odabranih na osnovu pozitivnog CMT
9 testa, u 460 uzoraka mleka uzetih iz odabranih četvrti vimena krava broj somatskih ćelija
10 iznad 500.000 u mililitru je utvrđen primenom mikroskopske metode. Alge iz roda *Prototheca*
11 su izolovane iz 32 uzorka mleka uzetih iz četvrti vimena krava u slučaju subkliničkih mastitisa
12 i 7 uzoraka sekreta mlečne žlezde uzetih iz četvrti vimena krava sa kliničkim mastitisom. Kod
13 krava sa znacima kliničkog mastitisa mleko je bilo promenjeno sa primesama krpica. Nije
14 zapažen poremećaj opšteg stanja, a apetit je bio očuvan. Promene u mleku kod kliničkog
15 mastitisa bile su prisutne samo u jednoj četvrti. Na osnovu makroskopskog pregleda kolonija,
16 izraslih na Sabouraud dekstroznom agaru, mikroskopskog nalaza i biohemijskih osobina,
17 identifikovana su alge iz roda *Prototheca* spp. Alge iz roda *Prototheca* spp. nisu izolovane iz
18 30 uzoraka vode kojom su napajane životinje, 8 briseva uzetih sa podova, 5 briseva uzetih
19 sa opreme za mužu i 24 brisa uzetih sa pojilica. Od ukupno 39 izolata *Prototheca* spp
20 poreklom iz uzoraka mleka krava sa supkliničkim i kliničkim mastitisima, 17 (43%) je
21 izolovano na farmi B, 12 (31%) na farmi C i 10 (26%) na farmi D.

22 Ni iz jednog od ispitanih uzoraka mleka, sa brojem somatskih ćelija iznad 500.000 u mililitru,
23 uzetih iz četvrti vimena krava na farmi A i farmi E nisu izolovane alge iz roda *Prototheca*. Na
24 farmi B je ispitano 148 uzoraka mleka, od kojih je u 98 uzoraka broj somatskih ćelija bio
25 iznad 500.000 u mililitru, *Prototheca* spp. su izolovane iz 13 uzoraka mleka uzetih iz četvrti
26 vimena krava sa supkliničkim mastitisom i 4 uzorka sekereta mlečne žlezde uzeta u
27 slučajevima kliničkih mastitisa. Sa farme C ispitano je 142 uzorka mleka uzetih iz četvrti
28 vimena krava, od kojih je u 128 uzoraka broj somatskih ćelija bio iznad 500.000 u mililitru.
29 *Prototheca* spp. su izolovane iz 10 uzoraka mleka uzetih u slučajevima supkliničkog i 2
30 uzorka sekreta mlečne žlezde uzeta u slučajevima kliničkog mastitisa. Broj somatskih ćelija
31 iznad 500.000 po mililitru je utvrđen u 83 uzorka mleka od 93 ispitana poreklom sa farme D.
32 *Prototheca* spp. su izolovane iz 9 uzoraka mleka uzetih iz četvrti vimena krava u slučajevima
33 supkliničkih mastitisa i iz jednog uzorka sekreta mlečne žlezde uzetog u slučaju kliničkog
34 mastitisa.

35 U najvećem broju uzoraka mleka 52 (74,28%), uzetih iz četvrti vimena krava na farmi A, broj
36 somatskih ćelija je bio iznad 500.000 u mililitru, a manji od 1.000.000 u mililitru, zatim od
37 1.000.000 do 2.000.000 u 17 uzoraka (24,28%), a samo u jednom uzorku (1,44%) broj
38 somatskih ćelija je bio iznad 2.000.000.

39 U 33 (25,19%) od 131 uzorka mleka, uzetih iz četvrti vimena krava na farmi B broj somatskih
40 ćelija je bio ispod 500.000 u mlilitru. U najvećem broju uzoraka mleka 32 (24,42%), uzetih iz
41 pojedinih četvrti vimena krava na farmi B, broj somatskih ćelija je bio između 500.000 do
42 milion, zatim između milion i dva miliona 32 (24,42%), između 2 i 3 miliona u 11 (8,39%)
43 uzoraka, između 3 i 4 miliona u 11 (8,39%) uzoraka, preko 4 miliona u 3 (2,29%) uzorka i u 9
44 (6,87 %) uzoraka preko 5 miliona u mililitru mleka.

45 Broj somatskih ćelija manji od 5.000.000 u mililitru mleka je utvrđen u 2 (1,53%) od 130
46 ispitanih uzoraka mleka uzetih iz četvrti vimena krava na farmi C. U najvećem broju 91
47 (70,00%) uzoraka mleka uzetih iz četvrti vimena krava na farmi C broj somatskih ćelija je bio
48 iznad 500.000 u mililitru, zatim od milion do dva miliona u 29 (22,31%) uzoraka, od dva do tri
49 miliona u 4 (3,07%) uzorka, od 3 do 4 miliona u 3 (2,30%) uzorka, između 4 i 5 miliona u 1
50 (0,76%) uzorku i preko pet miliona u dva (1,53%) uzorka.

51 U najvećem broju uzoraka mleka 41 (49,39%) uzetih iz četvrti vimena krava na farmi D broj
52 somatskih ćelija je bio iznad 500.000 do milion u mililitru, zatim od milion do dva miliona u 29
53 (34,93 %) uzoraka, od dva do tri miliona u 7 (8,43%) uzoraka, od 3 do 4 miliona u 4 (4,82%)
54 uzorka, između 4 i 5 miliona u 2 (2,41%) uzorka i preko pet miliona u jednom (1,21%) uzorku.

55 U najvećem broju uzoraka mleka 28 (68,29%) uzetih iz četvrti vimena krava na farmi E broj
56 somatskih ćelija je bio iznad 500.000 u mililitru a manji od 1.000.000 u mililitru, zatim od
57 1.000.000 do 2.000.000 u 13 uzoraka (31,71%).

1 Analizom je ustanovljeno da su prosečne vrednosti broja somatskih ćelija u uzorcima mleka iz
2 četvrti vimena krava poreklom sa farme D bile najveće (1096,00 sa IQR 999,50), dok je
3 najmanji broj somatskih ćelija zabeležen u uzorcima mleka poreklom sa farme A (830,00 sa
4 IQR 725,00). Kako podaci o broju somatskih ćelija nisu normalno distribuirani testiranje je
5 urađeno neparametrijskim statističkim metodama i nisu ustanovljene signifikantne razlike
6 ($p > 0,05$). Na osnovu koeficijenta korelacije ustanovljeno je veliko variranje podataka u
7 ispitivanim serijama koje se kretalo od 36,45% u farmi E do 130,27% u farmi B. Kako podaci
8 nisu bili normalno distribuirani analiza dobijenih rezultata urađena je pomoću medijane (Me) i
9 inerkvartilne razlike (IQR).

10 Analizirajući prosečne vrednosti broja somatskih ćelija krava sa kliničkim i supkliničkim
11 mastitisom ustanovljeno je da su u uzorcima mleka poreklom sa farme B najveće prosečne
12 vrednosti broja somatskih ćelija (2985,00 sa IQR od 5877,00), dok je najmanji broj somatskih
13 ćelija zabeležen u uzorcima mleka iz četvrti vimena krava poreklom sa farme D (1344,00 sa
14 IQR od 959,20). Kako podaci o broju somatskih ćelija nisu normalno distribuirani
15 testiranje je urađeno neparametrijskim statističkim metodama i nisu ustanovljene signifikantne
16 razlike ($p > 0,05$). Na osnovu koeficijenta korelacije ustanovljeno je veliko variranje podataka u
17 ispitivanim serijama koje se kretalo od 80,20% u grupi C do 96,12% u farmi D. Kako podaci
18 nisu bili normalno distribuirani analiza dobijenih rezultata urađena je pomoću medijane (Me) i
19 inerkvartilne razlike (IQR).

20 U *drugom podpoglavlju* prikazani su rezultati identifikacije algi iz roda *Prototheca* PCR
21 tehnikom. Od 39 izolata, 37 (94,87%) je identifikovano kao *Prototheca zopfii* genotip 2, samo
22 dva odnosno 5,13% izolata je identifikovano kao *Prototheca zopfii* genotip 1. Rezultati PCR
23 analize pokazuju prisustvo fragmenata dužine 233 bp koji je zajednički za sve genotipove *P.*
24 *zopfii*. Specifični replikon dužine 163 bp koji ogovara *P. zopfii* genotip 2 detektovan je kod 37
25 izolata, dok je kod dva izolata detektovan replikon dužine 150 bp koji odgovara *P. zopfii*
26 genotip 1.

27 U *trećem podpoglavlju* prikazani su rezultati ispitivanja osetljivosti izolata *Prototheca zopfii* na
28 odabrane antibiotike i antimikotike. Ukupno je ispitano 37 izolata *P. zopfii* genotip 2, dva
29 izolata *P. zopfii* genotip 1. Referentni soj *Candida albicans* ATCC 10231 je bio rezistentan na
30 sve ispitivane antibiotike, a od antimikotika na mikonazol i griseofulvin. Intermedijarnu
31 osetljivost referentni soj je pokazao na amfotericin B, a osetljiv je bio na nistatin i ketokonazol.
32 Svi izolati *P. zopfii* (100%) bili su rezistentni na oksitetraciklin i ceftazidim. Dva izolata (5,12%)
33 *P. zopfii* su bila osetljiva, a 37 (94,88%) izolata je bilo rezistentno na marbofloksacin. Uzorci
34 *P. zopfii* su bili osetljivi na gentamicin u malom procentu, svega 6 izolata (15,38%),
35 intermedijarna osetljivost je utvrđena kod 12 (30,76%) izolata i 21 (53,86%) izolat je bio
36 rezistentan. Rezultati osetljivosti uzoraka *P. zopfii* na kanamicin su pokazali da je 9 (23,07%)
37 izolata bilo osetljivo, 7 (17,93) izolata intermedijarno osetljivo i 23 (58,97%) izolata su bila
38 rezistentna. Najveći broj izolata *P. zopfii* 16 (41,03%) je bilo osetljivo na streptomycin, 10
39 (25,64%) je pokazalo intermedijarnu osetljivost, a 13 (33,33%) je bilo rezistentno. Svi izolati
40 *P. zopfii* (100%) su bili rezistentni na mikonazol i griseofulvin. Intermedijarna osetljivost je
41 utvrđena na amfotericin B kod 16 (41,03%) izolata, a 23 (58,97%) izolata *P. zopfii* je bilo
42 rezistentno na navedeni antimikotik. Ispitivanjem osetljivosti na nistatin utvrđeno je da je
43 najveći broj izolata *P. zopfii* 25 (64,11%) bio osetljiv, zatim intermedijarno osetljiv 6 (15,38%)
44 izolata, a 8 (20,51%) izolata je bilo rezistentno. Intermedijarnu osetljivost na ketokonazol je
45 pokazalo 5 (12,82%) izolata, a 34 (87,18%) je bilo rezistentno. Ni jedan od ispitanih izolata *P.*
46 *zopfii* nije bio osetljiv na amfotericin B i ketokonazol. Osetljivost *P. zopfii* genotip 1 na
47 antibiotike i antimikotike nije se razlikovala od *P. zopfii* genotip 2.

48
49 U poglavlju **Diskusija** dobijeni rezultati su razmatrani sa svih aspekata od značaja za
50 izabranu temu i istovremeno upoređivani sa rezultatima velikog broja drugih autora koji su
51 objavljeni u domaćim i stranim časopisima.

52
53 U poglavlju **Spisak literature** citirano je 133 relevantne reference.

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

3
4 Na osnovu rezultata postignutih u radu mogu da se izvedu sledeći zaključci:

- 5
6 1. Od ukupno 494 uzoraka mleka, uzetih iz četvrti vimena krava sa pet farmi u Republici
7 Srbiji, alga *P. zopfii* je izolovana iz 39 uzoraka, od kojih su 32 uzorka bila poreklom od
8 krava sa supkliničkim mastitisima, a 7 uzoraka od krava sa kliničkim mastitisom.
9 2. Prosečan broj somatskih ćelija je bio povećan u uzorcima mleka, uzetim iz četvrti
10 vimena krava sa supkliničkim mastitisom, poreklom sa farmi na kojima je izolovana
11 alga *P. zopfii*.
12 3. *Prototheca* spp. je najčešće izolovana iz uzoraka mleka uzetih iz četvrti vimena krava
13 na farmi B iz 17 (43%) uzoraka, zatim na farmi C iz 12 (31%) uzoraka i farmi D iz 10
14 (26%) uzoraka. Iz uzoraka mleka uzetih iz četvrti vimena krava poreklom sa farmi A i
15 E nisu izolovane alge iz roda *Prototheca*.
16 4. Primenom mikrobioloških metoda i PCR tehnike je izolovano i identifikovano 39
17 izolata *Prototheca* spp. Najveći broj izolata *Prototheca* spp. 37 (94,87%) je
18 identifikovan kao *Prototheca zopfii* genotip 2, a samo dva izolata (5,13%) su
19 identifikovana kao *Prototheca zopfii* genotip 1.
20 5. *Prototheca* spp. nije izolovana iz uzoraka vode za napajanje krava i briseva uzetih sa
21 podova štala, opreme za mužu i pojilica.
22 6. Svi izolati oba genotipa su bili rezistentni na antibiotike oksitetraciklin i ceftazidim, i
23 antimikotike mikonazol i griseofulvin.
24 7. Ukupno 25 (64,11%) izolata *P. zopfii* je bilo osetljivo na nistatin, 16 (41,03%) izolata
25 na streptomycin, 9 (23,07%) na kanamicin i 6 (15,38%) na gentamicin, na osnovu
26 čega se nistatin i aminoglikozidni preparati mogu preporučiti u terapiji prototekalnog
27 mastitisa u Republici Srbiji.
28
29

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

33
34 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**

35
36 **1. Da li je disertacija napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme?**

37 Doktorska disertacija mr Božidara Đukića pod nazivom "Molekularno-genetska
38 karakterizacija *Prototheca zopfii* kao uzročnika mastitisa krava u Srbiji" je napisana u skladu
39 sa obrazloženjem navedenim u prijavi.
40

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

42 Doktorska disertacija sadrži sve elemente koji se zahtevaju za završenu doktorsku disertaciju
43

44 **3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?**

45 Doprinos ove doktorske disertacije je u molekularno genetskoj karakterizaciji izolata
46 *Prototheca zopfii* poreklom iz uzoraka mleka krava uzetih u slučajevima supkliničkih i kliničkih
47 mastitisa na farmama u Republici Srbiji, kao i oceni njihove osetljivosti na antibiotike i
48 antimikotike.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 **IX PREDLOG:**

2
3 **Na osnovu ukupne ocene disertacije, komisija predlaže (odabrati jednu od tri**
4 **ponuđenih 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 **DATUM**

11 Beograd, 13.06.2016.

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

12
13 dr Slobodanka Vakanjac, vanredni profesor, Fakultet
14 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

15
16 dr Jevrosima Stevanović, vanredni profesor, Fakultet
17 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

18
19 dr Vera Katić, redovni profesor, Fakultet veterinarske
20 medicine Univerziteta u Beogradu

21
22
23 dr Vojislav Pavlović, redovni profesor u penziji,
24 Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u
25 Beogradu

26
27
28 dr Stanko Boboš, redovni profesor u penziji,
29 Departman za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni
30 fakultet Novi Sad

31
32