

4 IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

6 I PODACI O KOMISIJI:

8 1. **Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju:** Nastavno-naučno veće Fakulteta
9 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu na 196. sednici od 22. 05. 2019. godine.

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

14 1. dr Milijan Jovanović, redovni profesor u penziji, Patološka morfologija, 1997, Fakultet
15 veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

16 2. dr Dejan Krnjaić, redovni profesor, Mikrobiologija, 2016, Fakultet veterinarske
17 medicine Univerziteta u Beogradu

18 3. dr Branislav Kureljušić, viši naučni saradnik, Patološka morfologija, 2018, Naučni
19 institut za veterinarstvo Srbije, Beograd

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

25 II PODACI O KANDIDATU:

27 1. **Ime, ime jednog roditelja, prezime:** Nemanja, Velibor, Jezdimirović

29 2. **Datum rođenja, opština, Republika:** 01.01. 1981.g. Beograd, Savski Venac, Srbija

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

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

35 III **NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:** „Patomorfološka, mikološka i molekularna
36 ispitivanja organa čurića različitog imunološkog statusa nakon veštačke infekcije
37 sporama *Aspergillus fumigatus*“

39 IV **PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broja strana poglavlja, slika, šema,
40 grafikona i sl.):** Doktorska disertacija je napisana na 152 stranice i sadrži sledeća poglavlja:
41 Uvod (3 stranice), Pregled literature (41 stranica), Cilj i zadaci (1 stranica), Materijal i metode
42 (9 stranica), Rezultati (52 stranice), Diskusija (22 stranice), Zaključci (2 stranice) i Literatura
43 (14 stranica). Disertacija sadrži 64 fotografije, 13 tabela i 15 grafikona. Na početku disertacije
44 se nalazi rezime na srpskom i engleskom jeziku.

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

51 U Uvodu se iznosi da respiratorne bolesti zauzimaju važno mesto u patologiji živine, i
52 da je njihov značaj usko povezan sa intenziviranjem živinarske proizvodnje. Dalje se navodi
53 da od respiratornih oboljenja kod uzgoja čurića od posebne važnosti može biti aspergiloza
54 prouzrokovana gljivicom *Aspergillus fumigatus*. U prirodnim uslovima infekcija nastaje
55 aerogeno, tj. udisanjem velikog broja germinativnih oblika spora *Aspergillus fumigatus* u
56 kratkom vremenskom periodu ili dugotrajnim izlaganjem respiratornog sistema niskoj
57 koncentraciji u kontaminiranom vazduhu. Predisponirajući faktori za nastanak aspergiloze kod
58 čuraka, pored virusnih i bakterijskih infekcija, su: slab imunski status nastao zbog duže
59 primene antibakterijskih lekova; kontinuirano izlaganje stresogenim faktorima (učestala

vakcinacija, loš kvalitet hrane); izlaganje lošim ambijentalnim i zoosanitarnim uslovima uzgoja.

Iako postoji dosta radova o aspergilozi čurića, malo se zna o patogenezi bolesti i patomorfološkim promenama u različitim tkivima kod imunosuprimiranih ptica. Imajući to u vidu, navodi se da je zadatak ovog rada bio da u eksperimentalnim uslovima ispita, zdravstveno stanje, nastanak patomorfoloških promena i diseminaciju *Aspergillus fumigatus* u različitim organima kod imunosuprimiranih i imunokompetentnih čurića.

U poglavlju **Pregled literature** kandidat je izneo sintezu velikog broja radova koji se odnose na osobine *Aspergillus fumigatus*, kao i patogenezu, kliničku sliku, i patološke promene respiratornog sistema kod živine koje prouzorkuje. Takođe, izneti su i radovi koji obrađuju uticaj infekcije *Aspergillus spp.* na hematološke parametre i imunski status živine, ispitivanje kožne bazofilne preosetljivosti (*Cutaneous Basophil Hypersensitivity – CBH*) izazvane fitohemaglutininom (*Phytohaemagglutinin - PHA*) kod živine i primenu molekularne dijagnostike *Aspergillus fumigatus* kod ptica.

Cilj ovih ispitivanja bio je da se kod čurića eksperimentalno inficirani gljivicom *Aspergillus fumigatus* ispita uticaj uzročnika na njihovo zdravstveno stanje, evoluciju patomorfološkog supstrata, imunološki odgovor, kao i propagacija uzročnika u druga tkiva. Postavljeni cilj je realizovan kroz sledeće **zadatke**: 1. Klinička opservacija imunokompetentnih i imunosuprimiranih deksametazonom tretiranih čurića veštački inficiranih sa *Aspergillus fumigatus*. 2. Ispitivanje makroskopskih i mikroskopskih promena u organima (pluća, vazdušne kese, jetra, srce i mozak) veštački inficiranih imunokompetentnih i imunosuprimiranih čurića, korišćenjem standardnih i specijalnih histoloških metoda. 3. Mikološka i molekularna ispitivanja organa imunokompetentnih i imunosuprimiranih inficiranih čurića 4. Ispitivanje stepena čelijskog imunskog odgovora kod veštački inficiranih imunokompetentnih i imunosuprimiranih čurića posle intradermalne aplikacije fitohemaglutinina. 5. Ispitivanje aktivnosti humorалног imunskog odgovora kod imunokompetentnih i imunosuprimiranih čurića posle primene vakcine protiv atipične kuge živine. 6. Hematološka ispitivanja kod veštački inficiranih imunokompetentnih i imunosuprimiranih čurića. 7. Statistička obrada i poređenje rezultata dobijenih kod oglednih i kontrolnih grupa.

U poglavlju **Materijal i metode** kandidat iznosi da su za eksperiment korišćeni jednodnevni čurići poreklom od roditeljskih parova provenijencije „Converter“. Ogled je izveden na ukupno 90 čurića, oba pola, podeljenih u četiri grupe: ogledna grupa 1 (O-1), ogledna grupa 2 (O-2) sa po 30 jedinki, i kontrolna grupa 1 (K-1) i kontrolna grupa 2 (K-2) sa po 15 jedinki u grupi.

Ishrana čurića bila je *ad libitum* sa kompletnom krmnom smešom, a mikroklimatski uslovi su prilagođeni potrebama čurića. Nakon aklimatizacije, sedmog dana starosti čurića sve četiri grupe (O-1, O-2, K-1 i K-2) su vakcinisane protiv atipične kuge živine. La Sota soj (vakcina Lasovak, Vet. zavod Subotica) je aplikovan okulo-nazalno, prema uputstvu proizvođača. Kontrola imunskog odgovora čurića na datu vakcincu obavljena je 21. dana nakon vakcinacije uzorkovanjem krvi iz krilne vene.

Četrnaestog dana starosti čurići ogledne grupe O-1 inficirani su intratrahealno suspenzijom spora referentnog soja *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305 (Microbiologics, USA), u koncentraciji od $5,056 \times 10^7$ spora u zapremini sterilnog fiziološkog rastvora NaCl od 0,3ml po jedinki. Čurići ogledne grupe O-2 inficirani su istog dana, istom koncentracijom spora u istoj zapremini vehikuluma, s tom razlikom što su oni svakodnevno, tokom šest uzastopnih dana pre infekcije tretirani i.m. deksametazonom (u obliku natrijum-fosfata - Dexaveto® 0,2, V.M.D.N.V., Belgija) u dozi od 4mg/kg telesne mase. Čurićima kontrolnih grupa K-1 i K-2 četrnaestog dana starosti je intratrahealno aplikovano po 0,3ml sterilnog fiziološkog rastvora NaCl, a čurićima kontrolne grupe K-2 i deksametazon i.m. u dozi od 4mg/kg telesne mase tokom šest uzastopnih dana pre intratrahealne inokulacije sterilnog fiziološkog rastvora NaCl.

Nakon inokulacije suspenzije spora čurići su svakodnevno, tri puta tokom dana, opservirani u cilju ocene kliničkog stanja. Ogled je trajao 35 dana, a za vreme trajanja nije zabeleženo uginuće, kako čurića oglednih grupa O-1 i O-2, tako i kontrolnih grupa K-1 i K-2. Telesna masa čurića merena je na dan veštačke infekcije, 14. i 21. dana posle infekcije, a potom određen prosečni sedmodnevni prirast.

Za serološko-imunološko ispitivanje, radi kontrole imunskog odgovora (serokonverzija) na aplikovanu vakcincu uzeto je po 10 uzoraka krvi punkcijom krilne vene čurića oglednih i kontrolnih grupa, 21. dana posle vakcinacije. Dvadesetprvog dana od

1 infekcije uzorkovana je krv od po 10 čurića iz svake grupe (obe ogledne i obe kontrolne) za
2 hematološko ispitivanje.

3 U cilju procene patomorfoloških promena, kao i propagacije uzročnika u druga tkiva u
4 određenom vremenskom intervalu od infekcije (1, 3, 7, 14. i 21. dana) žrtvovano je po šest
5 čurića iz oglednih grupa i po tri iz kontrolnih od kojih su uzorkovani organi (pluća i vazdušne
6 kese, srce, jetra, bubreg, mozak, kosna srž) za mikološka, patomorfološka, histopatološka i
7 molekularna ispitivanja.

8 Za histopatološko ispitivanje uzorkovani su tkivni isečci pluća, vazdušnih kesa, srca,
9 jetre, bubrega i mozga, a zatim fiksirani u 10% neutralnom formalinu. Nakon fiksacije tkivo je
10 obrađeno u automatskom tkivnom procesoru (dehidratacija kroz rastuće koncentracije
11 etanola, prosvjetljavanje u ksilolu, impregnacija parafinom) i uklopljeno u parafinske blokove.
12 Parafinski blokovi su isečeni pomoću rotacionog mikrotoma na rezove debljine 5 μ m, a zatim
13 obojeni hematoksilin-eozin, Grocott i PAS metodom.

14 Uzorkovani organi za mikološko ispitivanje (pluća i vazdušne kese, srce, jetra,
15 mozak) su inokulisani na Sabouraud dekstrozni agar i inkubisani na temperaturi od 25°C u
16 aerobnim uslovima u svrhu izolacije infektivnog agensa. Da bi se izbegla bakterijska
17 kontaminacija podlozi su dodavani antibiotici: penicilin G (20 IJ/ml) i streptomicin sulfat (40
18 μ g/ml). Potom, izvršena su makroskopska i mikroskopska ispitivanja izraslih kolonija.

19 Za molekularno ispitivanje uzorkovani su: pluća i vazdušne kese, jetra, srce, mozak,
20 bubreg i kosna srž. Ekstrakcija DNK iz zbirnih uzoraka organa je urađena sa QIAamp DNA
21 Mini kit (Qiagen, Hilden, Nemačka) prema protokolu za ekstrakciju iz tkiva uz određenu
22 modifikaciju. Uzorci ekstrahovane DNK čuvani su na temperaturi od -20°C do izvođenja
23 nested PCR protokola za detekciju *A. fumigatus*.

24 Uzorci krvi iz krilne vene čurića uzimani su na dan uvođenja u ogled i 21. dana posle
25 vakcinacije protiv atipične kuge živine. Dobijeni serumi ispitani su metodom inhibicije
26 hemaglutinacije (HI test) na prisustvo specifičnih antitela protiv virusa atipične kuge živine.

27 Za ocenu T ćelijskog imunskog statusa čurića korišćen je fitohemaglutinin (PHA)
28 proizvođača „INEP“ iz Beograda. Fitohemaglutinin je aplikovan kod 40 čurića (po 10 iz svake
29 ispitivane grupe) starosti od 28 dana, odnosno 21. dana nakon primene vakcine protiv
30 atipične kuge živine. Fitohemaglutinin je davan u dozi od 100 μ g/jedinke intradermalno između
31 3. i 4. prsta desne noge jedinke, dok je sterilan fiziološki rastvor NaCl u istoj dozi aplikovan na
32 istom mestu leve noge. Reakcija na PHA, u vidu zadebljanja kože (DK) merena je posle 6, 12
33 i 24 časa od aplikacije i poređena između oglednih i kontrolnih grupa.

34 Za hematološko ispitivanje uzorkovana je krv punkcijom krilne vene (*v. brachialis*).
35 Ispitivani su sledeći parametri: broj eritrocita, hematokrit, koncentracija hemoglobina i
36 leukogram. Za određivanje broja eritrocita - direktna metoda, korišćene su modifikovane
37 Neubauer komorice za brojanje ćelija, za određivanje hemoglobina hematološki analizator
38 „ADVIA 120“ (Siemens, Nemačka), a za određivanje hematokrita - mikrohematokrit metoda
39 uz korišćenje heparisanih mikrokapilara i centrifuge. Za određivanje broja leukocita, korišćena
40 je indirektna metoda brojanja leukocita, a za određivanje leukocitarne formule - mikroskopska
41 analiza bojenog razmaza krvi - Wrightov rastvor (proizvođač NRK Inžinjering, Beograd).

42 U statističkoj analizi dobijenih rezultata korišćene su osnovne statističke metode,
43 odnosno deskriptivni statistički parametri (aritmetička sredina – \bar{X} , standardna devijacija -
44 SD, standardna greška - SE, minimalna prosečna vrednost - Xmin, maksimalna prosečna
45 vrednost - Xmax i koeficijent varijacije – CV). Prilikom testiranja i utvrđivanja statistički
46 značajnih razlika upotrebljena su dva testa: ANOVA i Tukey test. Signifikantnost razlika je
47 određena na nivou značajnosti od 5% i 1%.

48 U poglavlju **Rezultati** kandidat je tekstualno, tabelarno, grafikonima i fotografijama
49 prikazao rezultate kliničkog, patomorfološkog, mikološkog, molekularnog i serološkog
50 ispitivanja eksperimentalno inficiranih čurića kao i onih koji su služili kao kontrola.

51 Značajno smanjenje ($P<0,05$) vrednosti prosečne telesne mase čurića ogledne grupe
52 O-2 u odnosu na vrednost prosečne telesne mase čurića ogledne grupe O-1 ustanovljeno je
53 14. i 21. dana od inficiranja. Značajno smanjenje ($P<0,05$) vrednosti prosečne telesne mase
54 zapaženo je kod čurića ogledne grupe O-2, 14. i 21. dana od inficiranja u odnosu na telesnu
55 masu čurića kontrolne grupe K-1 i K-2.

56 Tretman deksametazonom 6 dana pre inficiranja i infekcija u oglednoj grupi O-2 su
57 statistički značajno ($P<0,05$) smanjili prirast i to, kako posle druge, tako i posle treće nedelje
58 od inficiranja u poređenju sa posmatranim parametrima kod čurića ogledne grupe O-1 i
59 kontrolnih grupa K-1 i K-2.

1 Prvi klinički znaci aspergiloze uočeni su već drugog dana nakon inficiranja čurića
2 sporama *A. fumigatus*. U oglednoj grupi O-1, kod jedne trećine čurića, a u oglednog grupi O-
3 2, kod dve trećine čurića uočeni su nakostrešenost perja i depresija. Četvrtog dana od
4 infekcije, kod čurića obe ogledne grupe primećuju se prvi znaci poremećene funkcije
5 respiratornog sistema (dispnoja, tahipnoja, disanje otvorenim kljunom i pojava sekreta iz
6 nosnica koja je praćena povremenim otresanjem glave). Navedeni klinički simptomi zapaženi
7 tokom prva četiri dana od infekcije postepeno su slabili ili nestajali tokom narednog perioda
8 trajanja ogleda kod čurića obe ogledne grupe. Kod čurića kontrolnih grupa, tokom ogleda,
9 nisu zapaženi klinički znaci koji bi ukazivali na promjenjeno opšte zdravstveno stanje.

10 Makroskopskim pregledom 6 žrtvovanih čurića ogledne grupe O-1 prvog dana od
11 infekcije kod 3 čureta ustanovljena je umerena hiperemija kaudalnog dela traheje kao i
12 hiperemija i edem oba plućna krila. Trećeg dana od infekcije od 6 žrtvovanih čurića kod 4 je
13 ustanovljeno difuzno bilateralno zamućenje zidova abdominalnih kesa. Sedmog dana nakon
14 infekcije kod 3 od ukupno 6 žrtvovanih čurića uočeno je zamućenje i umereno zadebljanje
15 zidova abdominalnih i kaudalnih torakalnih vazdušnih kesa. Četrnaestog dana od inficiranja
16 nađene su makroskopski vidljive promene na vazdušnim kesama i plućima kod 3 od ukupno 6
17 žrtvovanih čurića. Na zidovima abdominalnih, kaudalnih i kranijalnih torakalnih vazdušnih
18 kesa zapažene su promene u vidu jasno lokalizovanih malih belih zadebljanja, bez prisustva
19 intraluminalnog sadržaja. Na visceralnoj površini pluća kod 2 čureta ističu se mnogobrojni
20 solitarni ili konfluentni sivo - žuti milijski noduli, a kod 1 čureta unilateralno. Dvadesetprvog
21 dana od infekcije kod 5 čurića od ukupno 6 žrtvovanih uočene su makroskopske promene na
22 vazdušnim kesama i plućima.

23 Mikroskopski, prvog dana posle infekcije kod čurića ogledne grupe O-1 uočeno je
24 zadebljanje pleure usled edema i infiltracije velikim brojem heterofila i manjim brojem
25 makrofaga i limfocita. Plućni parenhim je bio hiperemičan, takođe infiltrovan heterofilima,
26 makrofagama i limfocitima. U alveolama pojedinih područja moglo se zapaziti nakupljanje
27 homogenog, eozinofilnog supstrata. Trećeg dana posle infekcije, u plućima čelijski infiltrat
28 formira jasne noduse, granulome sačinjene od makrofaga, limfocita i heterofila. U samim
29 nodusima ili njihovoj neposrednoj okolini moglo su se uočiti 1 do 2 sitnije multinuklearne
30 džinovske ćelije. U ovoj fazi na granulomima nisu zapažene regresivne promene. Sedmog
31 dana posle infekcije u plućima su se zapažali mnogobrojni granulomi koji se u pojedinim
32 područjima i stapaju - konfluuišu zahvatajući široka područja plućnog parenhima. Centralni deo
33 granuloma činile su epiteloidne i džinovske ćelije dok se na periferiji nalaze više limfociti i
34 heterofili. Izuzev pojedinačnih slučajeva na džinovskim ćelijama, nekrotične promene se u
35 ovoj fazi razvoja oboljenja kod ove grupe životinja ne uočavaju. Granulomi istovetne građe
36 uočeni su u mukozi bronhiola i na vazdušnim kesama. Četrnaestog dana u plućima je
37 zapažen veći broj granuloma kao i difuzna infiltracija heterofilima, makrofagama i limfocitima.
38 Na većini granuloma uočene su nekrotične promene u centralnom delu. Nekrotična područja
39 bila su okružena vencem od multinuklearnih džinovskih ćelija, a prema periferiji širio se
40 intenzivan infiltrat od makrofaga, heterofila i limfocita. U neposrednoj blizini ovakvih promena
41 zapaženo je područje intenzivne hiperemije. Regresivne promene uočene su i na
42 granulomima koji su se nalazili na vazdušnim kesama. Dvadesetprvog dana, promene u
43 plućima i vazdušnim kesama bile su po intenzitetu i karakteru slične već prethodno opisanim,
44 izuzev nekrotičnih promena koje su u većini slučajeva bile izraženije. Nekrotična područja
45 zauzimala su veći deo granuloma, takođe su bila centralno situirana i po pravilu ovičena
46 mnogobrojnim multijedarnim džinovskim ćelijama poređanim u vidu venca. Na periferiji
47 granuloma bilo je moguće uočiti formiranje, odnosno prisustvo mreže vezivnotkivnih vlakana.

48 Gljivični elementi u vidu hifa i konidija bili su prisutni i uočljivi u promjenjenim
49 područjima pluća i vazdušnih kesa. Prisustvo gljivica, naročito hifa, moglo se uočiti i rutinskim
50 bojenjem HE metodom, ali je još očiglednije bilo u isećcima bojenim PAS i Grocott
51 metodama. Najveći broj razvojnih oblika gljivica bio je lociran u promjenjenim plućima čurića
52 žrtvovanih 7. i 14. dana od inficiranja. One su zauzimale centralni deo granuloma, a naročito
53 su bile prisutne u području nekroze. Takođe, bile su prisutne i u multinuklearnim džinovskim
54 ćelijama. U citoplazmi ovih ćelija gljivice se vide kao filamentozne izdužene strukture ili kao
55 zrnasti do prašinasti ostaci posle razlaganja. Zastupljenost gljivica u makrofagama naročito je
56 bila izražena u starijim opsežnim granulomima kod jedinki žrtvovanih 21. dana.

57 Makroskopski i histopatološki nalaz na respiratornim organima kod čurića druge
58 eksperimentalne grupe O-2 su po karakteru slične onima kod O-1 grupe, uz izvesne razlike u
59 evoluciji i intenzitetu uočenih promena. Promene nastale u respiratornim organima kod
60 inficiranih i deksametazonom tretiranih čurića nastaju ranije i jačeg su intenziteta. Takođe, i

1 regresivne promene su obimnije i ranije nastaju u poređenju sa promenama uočenim kod
2 čurića koji su samo inficirani sporama *A. fumigatus*.

3 Na drugim ispitivanim organima (mozak, srce, jetra i bubreg) ni u jednoj oglednoj
4 grupi, nisu uočene histopatološke promene.

5 Na osnovu rezultata mikoloških ispitivanja dobijenih uzorkovanjem pluća i vazdušnih
6 kesa od po 6 inficiranih čurića za svaki dan žrtvovanja, ustanovljeno je da je *A. fumigatus*
7 izolovan iz respiratornih organa već prvog i trećeg dana od infekcije kod 4 od 12 inficiranih
8 jedinki (33,33 %). Sedmog dana uzročnik je izolovan kod 50 % inficiranih jedinki, četrnaestog
9 kod 83,33 % čurića i dvedesetprvog dana od infekcije kod svih inficiranih čurića (100%).
10 Ustanovljeno je da se od sedmog, četrnaestog i dvadesetprvog dana od infekcije povećava
11 broj izolata *A. fumigatus* iz organa čurića O-2 grupe u odnosu na čuriće O-1 grupe. U grupi O-
12 izolacija iz organa 1. i 3. dana posle infekcije je bila ista kao u grupi O-1, dok se 7, 14. i 21.
13 dana posle infekcije broj izolata *A. fumigatus* povećao u poređenju sa grupom O-1.
14 *Aspergillus fumigatus* nije izolovan ni iz jednog uzorka organa čurića kontrolnih grupa.

15 PCR metodom, prvog dana od veštačkog inficiranja u zbirnom uzorku pluća,
16 vazdušnih kesa i jetre čurića ogledne grupe O-1 dokazano je prisustvo DNK *A. fumigatus*.
17 Trećeg dana od veštačkog inficiranja, u zbirnom uzorku pluća, vazdušnih kesa čurića i
18 bubrega detektovana je DNK *A. fumigatus*. U zbirnom uzorku srca, jetre, mozga i kosne srži
19 nije utvrđeno prisustvo DNK *A. fumigatus*. Sedmog dana od veštačkog inficiranja pozitivan
20 PCR produkt je vizuelizovan u zbirnom uzorku pluća i vazdušnih kesa, srca i mozga, a zbirni
21 uzorak jetre, bubrega i kosne srži bio je negativan. Četrnaestog dana od veštačkog inficiranja
22 u zbirnom uzorku pluća i vazdušnih kesa, srca jetre i mozga detektovan je genom *A.
23 fumigatus*, a u zbirnom uzorku bubrega i kosne srži nalaz je bio negativan. Dvadesetprvog
24 dana od veštačkog inficiranja čurića kod svih ispitivanih zbirnih uzoraka organa (pluća i
25 vazdušne kese, srce, jetra, mozak, bubreg i kostna srž) vizuelizovana je pozitivna reakcija na
26 prisustvo *A. fumigatus*. Kod čurića O-2 grupe već prvog dana od infekcije dokazano je
27 prisustvo DNK *A. fumigatus* u zbirnom uzorku pluća, vazdušnih kesa i mozga, dok je 14. i 21
28 dana reakcija bila pozitivna u svim ispitivanim organima. U zbirnim uzorcima ispitivanih
29 organa čurića kontrolnih grupa K-1 i K-2 PCR reakcija je bila negativa posle bilo kog vremena
30 žrtvovanja.

31 Prosečne vrednosti DK kod čurića oglednih grupa O-1 i O-2 i čurića kontrolnih grupa
32 dobijene posle 6, 12 i 24 časa od aplikacije PHA i sterilnog fiziološkog rastvora NaCl nisu bile
33 statistički značajne u funkciji vremena. Prosečne vrednosti DK inficiranih čurića dobijene u
34 funkciji vremena od aplikacije PHA (upoređivane između 6. i 12. i 12. i 24. časa) ne pokazuju
35 statističku značajnost. Najveća prosečna vrednost DK ustanovljena je posle 24 časa od
36 aplikacije PHA ($2,50 \pm 0,28$ mm). Dobijeni rezultati prosečne vrednosti DK čurića ogledne
37 grupe O-2 i kontrolne grupe K-2 posle 6, 12 i 24 časa od aplikacije sterilnog fiziološkog
38 rastvora nisu bili statistički značajno različiti. Posle 6 sati od aplikacije PHA prosečna vrednost
39 debljine kože kod čurića grupe O-1 iznosila je $2,452 \pm 0,32$ mm, a kod čurića grupe O-2 bila je
40 $1,82 \pm 0,16$ mm. Prosečna vrednost DK kod čurića grupe O-2, u ovom periodu merenja, bila je
41 statistički značajno manja ($P < 0,001$) u odnosu na prosečnu vrednost DK kod čurića grupe O-
42 1. Dvanaest sati nakon aplikacije PHA ustanovljena prosečna vrednost DK kod čurića grupe
43 O-2 nije se statistički značajno razlikovala u poređenju sa vrednošću DK kod čurića grupe O-
44 1. Dvadesetčetiri sata od aplikacije PHA prosečna vrednost DK kod čurića ogledne grupe O-2
45 bila je statistički veoma značajno manja ($P < 0,001$) u odnosu na prosečnu vrednost DK kod
46 čurića ogledne grupe O-1.

47 Dvadesetprvog dana nakon vakcinacije čurića kontrolne grupe K-1 titar antitela bio je:
48 1:16 (1); 1:32 (2); 1:128 (5); 1:256 (2), a kod čurića kontrolne grupe K-2, titar antitela bio je
49 značajno niži i iznosi je: 1:8 (2); 1:16 (5); 1:32 (3). Rezultati ispitivanja visine titra antitela
50 dobijeni 21. dana od vakcinacije protiv atipične kuge živine kod čurića ogledne grupe O-1 bili
51 su: 1:4 (3); 1:8 (7), a kod ogledne grupe O-2 titar antitela iznosio je: 1:2 (6); 1:4 (4).

52 Rezultati hematoloških ispitivanja pokazali su da je infekcija *A. fumigatus*
53 prouzrokovala slabu anemiju, leukocitozu, limfocitozu i heterofiliju, posle druge i treće nedelje
54 od inficiranja čurića.

55 U **Diskusiji** kandidat rezultate do kojih je došao tokom ovih ispitivanja kritički
56 razmatra i poredi između eksperimentalnih grupa kao i sa rezultatima sličnih ispitivanja drugih
57 autora.

58 U poglavlju **Spisak literature** navedeno je 265 referenci.

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

- 5 1. Intratrahealna aplikacija spora *A. fumigatus* u koncentraciji od $5,056 \times 10^7$ izazvala je
6 plućnu aspergilozu kod 75% čurića ogledne inficirane grupe i ogledne grupe
7 deksametazonom tretiranih i inficiranih čurića.
- 8 2. Tretman deksametazonom 6 dana pre inficiranja i infekcija sa *A. fumigatus* su
9 statistički značajno ($P<0,05$) smanjili prirast i prosečnu telesnu masu čurića kako 14.,
10 tako i 21. dana od inficiranja u poređenju sa posmatranim parametrima kod čurića
11 inficiranih sa *A. fumigatus* i kontrolnih grupa.
- 12 3. Prethodno izazvana imunosupresija deksametazonom uticala je na intenziviranje
13 kliničke slike i patomorfoloških promena u poređenju sa oglednom grupom čurića
14 inficiranih sa *A. fumigatus*.
- 15 4. Klinički simptomi infekcije uočeni su već drugog dana od inficiranja kod dve trećine
16 deksametazonom tretiranih i inficiranih čurića i jedne trećine čurića inficiranih sa *A.*
17 *fumigatus*. U prva tri dana kod čurića obe ogledne grupe dominirali su opšti simptomi
18 (sommolentnost, opuštenost krila, nakostrešenost perja, skupljanje u grupe), a od
19 četvrtog dana kod obe ogledne grupe čurića nastupili su respiratorni simptomi.
- 20 5. Makroskopski, prvog dana posle infekcije u grupi deksametazonom tretiranih i
21 inficiranih čurića ustanovljeni su hiperemija i edem pluća. Difuzna inflamacija
22 vazdušnih kesa i granulomatozna pneumonija su najpre ustanovljeni u toj grupi
23 trećeg dana od inficiranja, dok su iste promene ustanovljene u grupi inficiranih čurića
24 sa *A. fumigatus* nakon 14 dana od infekcije.
- 25 6. Histopatološki, zapažene su promene već prvog dana posle infekcije u obe ogledne
26 grupe u vidu hiperemije i edema pluća uz početnu fokalnu ili difuznu ćelijsku
27 infiltraciju. Od 3. pa do 21. dana posle infekcije dominirala je granulomatozna
28 pneumonija različitog obima i intenziteta. Patološke promene u grupi
29 deksametazonom tretiranih i inficiranih čurića jačeg su intenziteta i obima, a
30 regresivne promene u patomorfološkom supstratu su takođe obimnije i ranije nastaju.
- 31 7. *Aspergillus fumigatus* je izolovan iz respiratornih organa već prvog i trećeg dana od
32 infekcije kod 4 od 12 inficiranih jedinki (33%) u obe ogledne grupe. Sedmog i
33 četrnaestog dana od infekcije povećava se broj respiratornih organa iz kojih je
34 izolovan *A. fumigatus* u grupi deksametazonom tretiranih i inficiranih čurića u odnosu
35 na oglednu grupu inficiranih čurića.
- 36 8. Analizom rezultata dobijenih metodom nested PCR i njihovim poređenjem između
37 oglednih grupa ustanovljen je veći broj pozitivnih uzoraka na prisustvo DNK *A.*
38 *fumigatus* u oglednoj grupi deksametazonom tretiranih i inficiranih čurića.
- 39 9. Dvadesetčetiri sata od aplikacije fitohemaglutinina prosečna vrednost debljine kože
40 kod ogledne grupe deksametazonom tretiranih i inficiranih čurića bila je statistički
41 veoma značajno manja ($p<0,001$) u odnosu na prosečnu vrednost debljine kože kod
42 ogledne grupe inficiranih čurića sa *A. fumigatus*.
- 43 10. Titar antitela 21. dana od vakcinacije protiv atipične kuge živine u oglednoj grupi
44 deksametazonom tretiranih i inficiranih čurića bio je dvostruko niži u poređenju sa
45 grupom inficiranih čurića sa *A. fumigatus* i višestruko niži u poređenju sa kontrolnom
46 grupom.
- 47 11. Rezultati hematoloških ispitivanja pokazali su da je infekcija sa *A. fumigatus*
48 prouzrokovala slabu anemiju, leukocitozu, limfocitozu i heterofiliju, posle 14. i 21.
49 dana od inficiranja čurića kod oglednih grupa inficiranih i deksametazonom tretiranih i
50 inficiranih čurića.

51
52 VII OCENA NAČINA PRIKAZA I TUMAČENJA REZULTATA ISTRAŽIVANJA (navesti da li
53 su dobijeni rezultati u skladu sa postavnjеним ciljem i zadacima istraživanja, kao i da li
54 zaključci proizilaze iz dobijenih rezultata):

55 Kandidat je koristio savremenu i aktuelnu metodologiju za procenu patomorfoloških promena,
56 identifikaciju gljivica, imunološka, i hematološka ispitivanja. Rezultati sprovedenih istraživanja
57
58
59

1 u potpunosti su u saglasnosti sa postavljenim ciljem i zadacima istraživanja. Rezultati su
2 pored tekstualnog prikaza dokumentovani sa 64 fotografije, 13 tabela i 15 grafikona. Tekst je
3 napisan koncizno, jasnim i razumljivim stilom. Rezultati su pravilno i kritički tumačeni.
4 Zaključci su pravilno izvedeni.

5

6 **VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**

7

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

9 Da

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

11 Da

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

13 Pažljivom analizom dostavljenog rukopisa Komisija je mišljenja da je kandidat odabrao
14 aktuelnu i veoma značajnu problematiku za svoju disertaciju. Postavljeni zadaci u potpunosti
15 su izvršeni, korišćene su savremene metode koje obezbeđuju pouzdanost i reproducibilnost,
16 a rezultati do kojih je došao predstavljaju originalan doprinos u rasvetljavanju uticaja
17 *Aspergillus fumigatus* na zdravstveno stanje i proizvodne rezultate. Ova disertacija je
18 pokazala da imunosupresija značajno utiče na širenje i invazivnost prouzrokovala
19 aspergiloze kao i na težinu kliničke slike i patomorfoloških promena kod inficiranih čurića.

20

21 **4. Da li je mentor tokom provere originalnosti disertacije utvrdio neoopravdano
22 preklapanje teksta sa drugim publikacijama (odgovoriti sa da ili ne): Ne**

23

24 **IX SPISAK NAUČNIH RADOVA SADRŽINSKI POVEZANIH SA DOKTORSKOM
25 DISERTACIJOM U KOJIMA JE DOKTORAND PRVI AUTOR ODNOŠNO AUTOR SA
26 NAJVEĆIM DOPRINOSOM (napisati imena svih autora, godinu objavlјivanja, naslov
27 rada, naziv časopisa, impakt faktor i klasifikaciju prema Pravilniku o postupku, načinu
28 vrednovanja, i kvantitativnom iskazivanju naučnoistraživačkih rezultata istraživača):**

29

30 **Nemanja Jezdimirović**, Branislav Kureljušić, Vojin Ivetić, Dejan Krnjaić, Oliver Radanović,
31 Jadranka Žutić, Ljiljana Spalević, Miljan Jovanović (2019): **Comparative
32 pathomorphological, mycological and molecular examination of turkey pouls with
33 different immunological status experimentally infected with *Aspergillus fumigatus*,**
34 Acta Veterinaria Beograd, 69(2), DOI 102478/acve-2019-0016
35 IF (2017): 0,604
36 M23

37

38 **X PREDLOG:**

39 **Na osnovu ukupne ocene disertacije, komisija predlaže (odabrat jednu od tri
40 ponuđenih mogućnosti):**

41 - da se doktorska disertacija prihvati a kandidatu odobri odbrana

42 DATUM

43 03.06.2019.

44 POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

45 1. dr Miljan Jovanović, redovni profesor u penziji,
46 Fakultet veterinarske medicine,
47 Univerzitet u Beogradu

48 2. dr Dejan Krnjaić, redovni profesor,
49 Fakultet veterinarske medicine,
50 Univerzitet u Beogradu

51 3. dr Branislav Kureljušić, viši naučni saradnik,
52 Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd