

3
4
5 **ИЗВЕШТАЈ О ОЦЕНИ ЗАВРШЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

6
7 **I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ:**

8
9 **1. Датум и назив органа који је именовео комисију:**

10 Наставно научно веће Факултета ветеринарске медицине, 179. седница одржана
11 13.09.2017. године.

12 **2. Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива**
13 **уже научне области за коју је изабран у звање, годином избора у звање и назив**
14 **факултета, установе у којој је члан комисије запослен:**

- 15 1. Др Соња Радојичић, редовни професор, Епизоотиологија, заразне болести
16 животиња и болести пчела и свилопреља, 2011. година, Факултет
17 ветеринарске медицине Универзитета у Београду
- 18 2. Др Мирослав Валчић, редовни професор, Епизоотиологија, заразне болести
19 животиња и болести пчела и свилопреља, 2010. година, Факултет
20 ветеринарске медицине Универзитета у Београду
- 21 3. Др Душан Мишић, ванредни професор, Микробиологија са имунологијом,
22 2014. година, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду
- 23 4. Др Казимир Матовић, научни сарадник, 2014. година, Микробиологија са
24 имунологијом, Ветеринарски специјалистички институт Краљево
- 25 5. Др Лазар Ранин, редовни професор, Микробиологија, 2006. година,
26 Медицински факултет Универзитета у Београду

27
28 **II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:**

29 **1. Име, име једног родитеља, презиме:**

30 Наташа, Обрад, Стевић

31 **2. Датум рођења, општина, Република:**

32 15. 09. 1984. година, Звездара, Београд, Република Србија

33 **3. Датум одбране, место и назив магистарске тезе*:**

34 **4. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука*:**

35 **III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

36 **„Испитивање поузданости серолошких, бактериолошких и молекуларних метода**
37 **у дијагностици бруцелозе паса изазване врстом *Brucella canis*“**

38 **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (навести број страна поглавља, слика,**

39 **шема, графикона и сл.):** Докторска дисертација дипломираног ветеринара Наташе
40 Стевић, написана је на укупно 87 страна компјутерски обрађеног текста и садржи
41 следећа поглавља: Увод (4 стране), Преглед литературе (16 страна), Циљ и задаци
42 истраживања (2 стране), Материјал и методе (13 страна), Резултати (27 страна),
43 Дискусија (13 страна), Закључци (2 стране), Литература (10 страна). На почетку се
44 налази захвалница, кратак садржај на српском и енглеском језику као и садржај
45 докторске дисертације, док се на крају налазе изјаве и биографија кандидата. Рад је
46 документован са 27 табела (по једна у поглављу Преглед литературе и Материјал и
47 методе и 25 табела у поглављу Резултати), 9 графикона и 6 слика. Списак литературе
48 чине 103 библиографске јединице од којих је најстарија публикована 1966. године, а
49 најновија 2016. године.

50
51 **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (дати кратак**

52 **опис сваког поглавља дисертације: увода, прегледа литературе, циља и задатака**
53 **истраживања, материјал и метода, резултата, дискусије, списка референци):** У

54 поглављу **Увод**, кандидат наводи да је бруцелоза изазвана врстом *Brucella canis* (*B.*
55 *canis*) болест превасходно паса, али и људи и да припада класичним
56 антропозоонозама. Као космополитско обољење, бруцелоза паса је регистрована у
57 великом броју земаља широм света, укључујући и Републику Србију. Као слободне од
58 инфекције изазване бактеријом *B. canis* за сада се декларишу само Аустралија и Нови
59 Зеланд. Узрочник бруцелозе паса као и остали чланови рода *Brucella*, факултативно је
60 интрацелуларна бактерија која има тропизам за моноцитно-макрофагни систем, и

1 посебно за репродуктивне органе примарних домаћина. У случају инфекције гравидних
2 животиња, *B. canis* одлази у утерус и плаценту, а до побачаја углавном долази пред
3 крај гравидитета. Из тог разлога, инфициране гравидне животиње су најчешће
4 серолошки негативне све до пред побачај с обзиром на то да се узрочник не задржава у
5 крвотоку, па изостаје стварање специфичних антитела. Код мужјака, главне клиничке
6 манифестације су орхитис и епидидимитис. Код животиња оба пола појављује се
7 лимфаденитис, као и промене на костима и зглобовима, очима и централном нервном
8 систему. Ипак, велики број инфицираних паса не показује видљиве симптоме болести,
9 па чак ни значајније повишење телесне температуре, што олакшава ширење болести и
10 одржавање инфекције код примарних домаћина.

11 За разлику од категорија паса које су под надзором власника и ветеринара,
12 суштински већи проблем представљају невластички пси, о чему говоре и бројна
13 истраживања спроведена у земљама Латинске Америке и Азије у којима је проблем
14 напуштених паса стално нарастајућа и тешко решива препрека. Проблем бројности
15 невластичких паса заједнички је за све економски неразвијене земље у којима са друге
16 стране, живи већина светског становништва. Посматрано из угла јавног здравља, ова
17 врста бруцела има несумњиво много већи значај с обзиром на то да се због лоших
18 услова живота и недостатка адекватне здравствене заштите, већина оболелих људи и
19 не региструје. Мере које се предузимају за контролу и евентуално ерадикацију ове
20 болести, варирају од земље до земље. Уз изабран начин контроле и сузбијања
21 бруцелозе паса, велики проблем представљају и доступне методе дијагностике. Као
22 једина поуздана метода, издваја се изолација бактерија, која се у рутинској
23 дијагностици углавном не спроводи. На ниску осетљивост методе изолације, најчешће
24 утичу квалитет и врста доступних узорака, лабораторијски капацитети, али и искуство и
25 обученост особља као и велики ризик од инфекција лабораторијског особља по којима
26 је рад са културама бруцела познат. Испитивање узорака пореклом од власничких паса
27 често је отежано увођењем антибиотске терапије и пре постављања тачне дијагнозе.
28 Због свега наведеног, у дијагностици ове болести се најчешће користе серолошке
29 методе. За ту сврху, због антигенске специфичности ове врсте, неопходно је користити
30 хомотипски антиген зато што уобичајеним тестовима за детекцију антитела против
31 осталих S врста бруцела није могуће установити серолошки позитивне јединке на *B.*
32 *canis*. Мали „комерцијални“ значај ове болести, условљава да на тржишту
33 дијагностичких тестова готово и нема оних који су намењени дијагностици бруцелозе
34 паса. Такође је важно нагласити да су сви серолошки тестови непоуздани током првих
35 месец дана након инфицирања. Након тога, у серуму се одржава релативно висок титар
36 антитела, који по престанку бактеријемije опада и мерљив је у различито дугом
37 временском периоду.

38 Напредак науке и посебно примена ланчане реакције полимеразе (PCR-
39 *polymerase chain reaction*) на пољу дијагностике инфективних болести су довели до
40 револуционарног напретка, скраћујући време и повећавајући шансу за откривање
41 животиња у раним фазама инфекције. Из тог разлога, у оквиру ове докторске
42 дисертације испитана је и могућност примене Bruce-ladder multiplex PCR методе у
43 тестирању клиничког материјала пореклом од паса.

44 Како погрешно постављена дијагноза, било лажно негативна или лажно
45 позитивна, има значајне последице за псе, али и људе, унапређење дијагностике ове
46 болести је био императив спроведеног испитивања.

47 У поглављу **Преглед литературе**, кандидат у више потпоглавља описује
48 најважније аспекте бруцелозе паса. На почетку, описујући карактеристике рода *Brucella*,
49 указује и на значајан напредак у истраживању бруцелозе, као и карактеристике
50 новооткривених врста: *B. microti*, *B. innopinata*, *B. papionis* и *B. vulpis*, изворе и
51 потенцијалне примарне домаћине. Поред историјата, описане су опште карактеристике
52 бруцелозе паса, начини излучивања бактерија из инфицираног организма као и путеви
53 преношења, патогенеза, имунски одговор, клиничка слика, терапија, патоморфолошке и
54 патохистолошке промене које настају као последица инфекције овом врстом, као и
55 раширеност болести у свету. У овом поглављу, детаљно је обрађена литература која се
56 бави дијагностиком болести. Серолошке методе које се данас најчешће користе су брзи
57 аглутинациони тест са и без 2-меркаптоетанола (2-ME), тест споре аглутинације у
58 епрувети (TAT-*Tube agglutination test*) са и без 2-ME, агар гел имунодифузија (AGID),
59 имуноензимски, ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) тестови као и индиректна
60 имунофлуоресценција. Описане су и методе класичне бактериологије и молекуларне

1 методе. Наводи се да потешкоће у формулацији и тумачењу резултата настају зато што
2 *B. canis* има сличне или идентичне антигенске детерминанте ћелијског зида као и
3 бројне друге Грам негативне бактерије. Такве карактеристике антигенске структуре *B.*
4 *canis* доводе до појаве унакрсне реактивности и појаве лажно позитивних резултата. Уз
5 то, припрема антигена за дијагностичке тестове је сложена и захтевна због изразите
6 мукоидности *B. canis* која се испољава након неколико дана инкубације. Због ове
7 јединствене карактеристике у роду бруцела, бактерије показују особину
8 аутоаглутинације у физиолошком раствору. *B. canis* чврсто адхерира за агар или ствара
9 мукоидни талог у течним подлогама чији је рН нижи од 7,0. Због непостојања
10 стандардизованих тестова и протокола, као ни генералног става о најприкладнијем
11 тесту, лабораторије често дефинишу сопствене критеријуме. Примера ради, Аустралија
12 као земља слободна од ове болести, захтева негативан 2-МЕ ТАТ код увоза паса на
13 своју територију. Из тог разлога, циљ ове докторске дисертације обухватио је
14 унапређење дијагностике применом препоручених и нових, сопствено припремљених
15 тестова.

16 Кандидат посебно наглашава да у Републици Србији постоји законска
17 регулатива која налаже поступање у случајевима дијагностиковања бруцелозе паса.
18 Према члану 9. Правилника о начину спровођења мера за сузбијање и искорењивање
19 бруцелозе говеда, оваца, коза, свиња и паса („Сл. гласник РС“, бр. 36 од 22. априла
20 2005.), „уколико се код паса применом брзих метода и спорог аглутинационог теста са
21 2-меркаптоетанолом или изолацијом узрочника, утврди бруцелоза (*Brucella canis*),
22 обавезна је кастрација односно овариохистеректомија и лечење оболелих животиња“.

23 **Циљ истраживања** ове докторске дисертације је био поређење резултата
24 добијених применом сопствено припремљених серолошких тестова спорог
25 аглутинационог и ELISA теста са резултатима класичног бактериолошког и
26 молекуларног испитивања методом ланчане реакције полимеразе (Bruce-ladder
27 multiplex PCR) у циљу процене осетљивости и специфичности, односно поузданости
28 три дијагностичка протокола које је могуће користити у рутинској дијагностици
29 бруцелозе паса. За остваривање постављених циљева дефинисани су и задаци
30 истраживања:

- 31 1. Прикупљање материјала пореклом од животиња, крв и репродуктивни органи
32 узети након стерилизације невласничких паса.
- 33 2. Обрада прикупљеног материјала-одвајање крвних серума и хомогенизација
34 ткива у апарату Bag Mixer 400 P (*Interscience, France*).
- 35 3. Умножавање референтног соја *B. canis* RM 6/66 у циљу припреме антигена за
36 извођење серолошких реакција.
- 37 4. Припрема и валидација спорог аглутинационог теста у епрувети (ТАТ).
- 38 5. Припрема и валидација индиректног имуноензимског теста-ELISA.
- 39 6. Серолошко испитивање прикупљених крвних серума припремљеним тестовима
40 ТАТ и индиректна ELISA.
- 41 7. Бактериолошко испитивање хомогенизата ткива на специјалном селективном
42 бифазном Кастанеда медијуму у циљу евентуалне изолације *B. canis*.
- 43 8. Испитивање изолата класичним бактериолошким техникама до доступног нивоа
44 идентификације уз извођење теста резистенције на тионин и базни фуксин, по
45 описаној процедури.
- 46 9. Екстракција молекула ДНК из добијених изолата као и суспензије ткива
47 репродуктивних органа.
- 48 10. Извођење Bruce-ladder multiplex PCR методе по описаној процедури са
49 одговарајућим прајмерима.
- 50 11. Статистичка обрада добијених резултата-поређење резултата добијених
51 тестирањем узорак крвних серума и ткива серолошким, бактериолошким и
52 молекуларним методама.

1 У поглављу **Материјал и методе** наводи се да су узорци за испитивање
2 прикупљени приликом спровођења стерилизације паса у оквиру Стратегије решавања
3 проблема невласничких паса и мачака на територији града Београда (Сл. лист града
4 Београда бр. 37/2011). Узорци крви, ткива утеруса и тестиса узимани су у складу са
5 дозволом Управе за ветерину Министарства пољопривреде и заштите животне средине
6 Републике Србије решење број 323-07-03455/2015-05/1. У складу са принципима
7 Стратегије, након стерилизације и опоравка, све животиње су враћене на локације са
8 којих су узете. Сакупљен је материјал од 225 невласничких паса и то 145 женки и 80
9 мужјака. За серолошка испитивања крв је узимана пункцијом *venae cephalicae*
10 *antebrachii*. Након спонтане коагулације, крвни серум је одвајан и чуван до обраде на -
11 20 °C. Крвни серуми су тестирани методом 2-МЕ TAT и индиректним ELISA тестовима.
12 За бактериолошка и молекуларна испитивања прављена је суспензија ткива утеруса и
13 тестиса у физиолошком раствору у односу 1:2. Ткива су хомогенизована у стомахеру
14 Bag Mixer 400 P (*Interscience, France*). Хомогенизован материјал је након филтрације
15 дељен на два дела од којих је један коришћен за бактериолошка, а други за
16 молекуларна испитивања. Материјал је чуван на температури од -20 °C до испитивања.
17 У све дијагностичке процедуре укључене су позитивна и негативна контрола. Као
18 позитивна контрола у серолошким тестовима, коришћен је серум сигурно позитивног
19 пса из кога је изолована *B. canis* што је верификовано у референтној OIE (*World*
20 *Organisation for Animal Health*) лабораторији у Француској (AFSSA-*Agence Française de*
21 *sécurité sanitaire des aliments*). Титар антитела сигурно позитивног серума је након
22 лиофилизације износио 1/3200 (2-МЕ TAT). Као негативне контроле узети су серуми
23 сигурно здравих власничких паса пре полне зрелости, у узрасту од 6 месеци. Као
24 позитивна контрола за изолацију бактерија као и извођење Bruce-ladder multiplex PCR
25 методе, коришћени су референтни сој *B. canis* RM 6/66, изолат *B. canis* SR-1 и изолат *B.*
26 *suis* WS 1 (сви верификовани у OIE лабораторији AFSSA, Француска, 2004.). У
27 припреми антигена за формулацију серолошких тестова коришћен је референтни сој *B.*
28 *canis* RM 6/66. Антиген за 2-МЕ TAT припреман је у складу са препорукама у
29 литератури. За умножавање бактерија коришћене су Roux боце, а након инкубирања и
30 спирања бактеријских колонија, рађен је двоструки систем контроле: контрола
31 стерилности и контрола инактивације након термичке обраде суспензије бактерија на
32 70 °C током једног сата. Бактерије су испирание 3x центрифугирањем на 1000xg 30
33 минута; након подешавања паковане ћелијске запремине, припремљени антиген за
34 извођење теста споре аглутинације чуван је на 4 °C до употребе. Крвни серуми
35 испитани су методом 2-МЕ TAT у разређењима 1/50, 1/100 и 1/200, у складу са
36 препорукама. Разређења су прављена у 3,5% раствору NaCl уз додаток формалин
37 физиолошког раствора са 2-МЕ који као дисулфид редукујући агенс разара IgM и
38 повећава специфичност теста. Реакција се одвијала на температури од 37 °C, а
39 резултати су читавани двократно, после 24 и 48 часова. Као позитивна реакција
40 означавања је она у којој је дошло до потпуног разбистравања течности и формирања
41 талога на дну епрувете у разређењу 1/200.

42 Узгајање бактерија за припрему ELISA теста вршено је на идентичан начин.
43 Колоније бактерија су спирание стерилним физиолошким раствором. Бактеријска
44 суспензија је испрана 3x стерилним физиолошким раствором, центрифугирана на
45 2000xg 30 минута. Један део бактеријског талога је ресуспендован у стерилној
46 дестилованој води и аутоклавиран на 121 °C под притиском од једне атмосфере 30
47 минута, па је тако добијен антиген екстрахован топлотом. Други део бактеријског талога
48 ресуспендован у стерилној дестилованој води је дезинтегрисан уз помоћ ултразвучне
49 сонде апарата Bandelin Sonoplus HD 2070 у току 30 минута (снага 70 W, капацитет 70%).
50 На описани начин добијен је антиген екстрахован ултразвуком. Затим су суспензије оба
51 антигена центрифугиране 30 минута на 10000xg, а потом је добијени супернатант
52 одвајан и дијализован у дестилованој води 48 часова на 4 °C уз константно мешање.
53 Дијализа добијених антигена вршена је у целулозним цревима величине пора 6000 до
54 8000 Da (*ZelluTrans, Roth, Germany*). Концентрација протеина у антигенима
55 припремљеним на описане начине, одређена је спектрофотометријски, методом по
56 Lowry-у (www.ruf.rice.edu) (CECIL CE 2021). За конструисање калибрационе криве
57 коришћен је стандард BSA (*Bovine serum albumine*) концентрације 1 mg/ml, а садржај
58 протеина у узорцима одређен је уз помоћ једначине праве: $y=0,07527+0,46485x$.
59 Електрофоретска анализа антигена изведена је у редуктивним условима на 12,5%
60 полиакриламидном гелу у TRIS-глицинском пуферу у присуству SDS (MINI VE

1 HOFFER, LKB, 2117, *Bromma, Uppsala Sweden*). Електрофореза је извођена у трајању
2 од 30 минута, напону од 80 V, и 60 минута на 200 V. По завршеној електрофорези и
3 фиксирању, гелови су обојени бојом *Coomassie Brilliant blue R250 (Sigma Aldrich, USA)*, а
4 дензитометрија протеинских трака извршена у програмском пакету *TotalLab TI 120 i Sci*
5 *Image 7.0, Origin 6.0*. Резултати су приказани у процентима у односу на укупну
6 концентрацију протеина. У циљу одређивања молекулских маса појединих протеинских
7 фракција, конструисан је баждарни дијаграм зависности логаритма молекулских маса
8 ($\log Mr$) маркера протеина (стандард 10 до 250 kDa) (*Thermo Scientific, USA*) и њихове
9 покретљивости на полиакриламидном гелу. Израчунавање је извршено на основу
10 једначине праве: $y=2,11747-1,15413x$, $r=-0,99304$.

11 Оптимална концентрација антигена за индиректни ELISA тест, разређење
12 сигурно позитивног серума и антипсећих антитела коњугованих пероксидазом (*Anti-dog*
13 *IgG whole molecule-Peroxidase antibody produces in rabbit, Sigma Aldrich, USA*) одређени
14 су шах титрацијом. За оба антигена тестиране су концентрације протеина од 10 $\mu\text{g/ml}$, 1
15 $\mu\text{g/ml}$, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ и 0,01 $\mu\text{g/ml}$, разређења позитивног серума од 1/200, 1/400, 1/800 и
16 1/1600, и коњугованих антитела у разређењу од 1/20000 и 1/25000. Као коначне, узете
17 су оне вредности код којих је очитана највиша вредност оптичке густине OD (*Optical*
18 *density OD_{λ,450}*).

19 Оптимална разређења антигена у карбонат бикарбонатном пуферу pH 9,6
20 (*Sigma Aldrich, USA*) наношена су на полистиренске NUNC (*Nunc-Immuno Plate MaxiSorp*
21 *Surface, Denmark*) плоче са 96 бунарчића и равним дном. Након инкубације преко ноћи
22 на 4 °C, и испирања фосфатним сланим пуфером pH 7,2 са додатком 0,05% Tween 20
23 (*Sigma Aldrich, USA*) (PBS-T), невезана места у бунарчићима су блокирана са 5% BSA
24 (*Bovine serum albumin, Sigma Aldrich, USA*) у PBS-T током ноћи на 4 °C. Тако
25 припремљене плоче су се користиле за тестирање испитујућих серума. Пре
26 испитивања, серуми су третирани са 2-ME преко ноћи. Разређења испитујућих серума
27 од 1/200 прављена су у 1% BSA у PBS-T. Сви серуми су испитани у трипликату. Након
28 инкубације од 60 минута на 37 °C, плоче су испране, а затим је додавано секундарно
29 антитело у разређењу 1/25000 у PBS-T. Након инкубације од једног сата на 37 °C и
30 испирања, додаван је TMB супстрат и после 15 минута инкубације на собној
31 температури и заштићена од светла, реакција је стопирана додавањем 2M H₂SO₄.
32 Реакција, односно оптичка густина, очитавана је на апарату Thermo Scientific на 450 nm
33 (*Thermo Fisher Scientific, USA*). Гранична вредност *cut off* одређивана је на основу збира
34 средње вредности и три стандардне девијације ($cut\ off = \bar{X} + 3SD$, при чему је: \bar{X} -
35 средња вредност оптичке густине 30 негативних серума, SD-стандардна девијација).
36 Коефицијент варијације (CV) израчунат је на основу средње вредности негативног
37 серума тестираног у трипликату кроз седам понављања. Сви узорци који су имали
38 вредност OD у опсегу $cut\ off \pm CV$, поново су тестирани.

39 За изолацију *B. canis* из репродуктивних органа коришћен је бифазни Кастанеда
40 медијум. За изолацију је коришћен триптозни агар и бујон (*Торлак, Србија*) са
41 селективним *Brucella* додатком (*Brucella Selective Supplement, Oxoid, UK*). Подлоге са
42 засејаним узорцима, инкубиране су у аеробним условима на 37 °C (*Thermo Fisher*
43 *Scientific, USA*), у трајању од 10 дана. Изоловане бактерије су идентификоване на
44 основу морфолошких, биохемијских и серолошких карактеристика. За идентификацију
45 су коришћени брза аглутинација на плочици са сигурно позитивним серумом,
46 аглутинација са акрифлавином (*Sigma-Aldrich, USA*), каталаза тест, уреаза тест на
47 Christensen подлози (*Торлак, Србија*), тест резистенције на тионин и базни фуксин
48 (*Sigma-Aldrich, USA*), тест продукције H₂S као и API 20 NE (*bioMerieux, France*).

49 ДНК из хомогенизата ткива утеруса и тестиса као и изолованих бактеријских
50 култура, екстрахована је помоћу комерцијалног кита за екстракцију GeneJET Genomic
51 DNA Purification Kit (*Thermo Scientific, USA*) по упутству произвођача, пакована у
52 Ерпендорф микротубе и чувана на -20 °C до употребе. Коришћен је Bruce-ladder multiplex
53 PCR. Након прелиминарних испитивања, у PCR мешавину је додавана 10x већа
54 количина екстраховане ДНК, а количина укупне PCR мешавине је износила 50 μl .
55 Коришћени прајмери наведени у табели 1 додавани су у PCR смешу у коначној
56 концентрацији од 0,25 pmol/ μl . Финална концентрација dNTP (*Thermo Scientific, USA*)
57 износила је 0,4 mM. Таq полимераза (*Thermo Scientific, USA*) је додавана у количини од
58 0,5 μl . Програм извођења PCR реакције обухватио је: иницијалну денатурацију на 95 °C,
59 7 минута праћену са 25 циклуса денатурације темплата на температурама 95 °C, 35
60 секунди, annealing на 64 °C, 45 секунди и екстензија прајмера на 72 °C, 180 секунди, а

1 затим финална екстензија на 72 °C, 6 минута. Визуализација добијених PCR продуката,
 2 вршена је применом методе хоризонталне електрофорезе у агарозном гелу
 3 концентрације 1% (*Serva, Germany*) са додатком боје Midori Green DNA Stain (*NIPPON*
 4 *Genetics EUROPE GmbH*) у крајњој концентрацији од 1%. Као позитивна контрола,
 5 поред наведених сојева и врста бруцела коришћен је и маркер ДНК Mass ruler DNK 100
 6 bp ladder (*Thermo Scientific, USA*). Позитивним је сматрана појава шест (одсуство траке
 7 дужине 794 bp), односно седам трака следећих дужина: 1682, 1071, 794, 587, 450, 272 и
 8 152 bp.

9 Табела 1. Прајмери коришћени у Bruce-ladder multiplex PCR

Прајмери	Секвенца	Циљни ген
BMEI0998f BMEI0997r	ATC CTA TTG CCC CGA TAA GG GCT TCG CAT TTT CAC TGT AGC	Гликозил трансфераза ген <i>wbo A</i>
BMEI0535f BMEI0536r	GCG CAT TCT TCG GTT ATG AA CGC AGG CGA AAA CAG CTA TAA	Имунодоминантан антиген, ген <i>bp26</i>
BMEII0843f BMEII0844r	TTT ACA CAG GCA ATC CAG CA GCG TCC AGT TGT TGT TGA TG	Протеин спољашње мембране, ген <i>otp31</i>
BMEI1436f BMEI1435r	ACG CAG ACG ACC TTC GGT AT TTT ATC CAT CGC CCT GTC AC	Полисахаридна деацетилаза
BMEII0428f BMEII0428r	GCC GCT ATT ATG TGG ACT GG AAT GAC TTC ACG GTC GTT CG	Ген за катаболизам еритритола ген <i>ery C</i> (<i>Deritruloza-1-</i> <i>fosfatdehidrogenaza</i>)
BR0953f BR0953r	GGA ACA CTA CGC CAC CTT GT GAT GGA GCA AAC GCT GAA G	Протеин који се везује за ABC носач
BMEI0752f BMEI0752r	CAG GCA AAC CCT CAG AAG C GAT GTG GTA ACG CAC ACC AA	Рибозомални S12, ген <i>rps L</i>
BMEII0987f BMEII0987r	CGC AGA CAG TGA CCA TCA AA GTA TTC AGC CCC CGT TAC CT	Регулатор транскрипције, CRP фамилија

1 Добијени резултати су статистички обрађени у програму IBM SPSS Statistics 21.
2 За анализу добијених резултата употребљени су дескриптивни статистички параметри
3 (средња вредност, стандардна девијација, коефицијент варијације). За испитивање
4 усаглашености примењених дијагностичких тестова као и за одређивање
5 специфичности и осетљивости тестова коришћена је Карра статистичка анализа и Mc
6 Nemar тест за интервал поузданости од 95%. Анализа сопствено припремљених
7 индиректних ELISA тестова са два различито припремљена антигена извршена је
8 помоћу ROC (*Receiver operating characteristic curve*) анализе и одређивањем површине
9 испод криве AUC (*Area Under the Curve*).

10 У поглављу **Резултати**, кандидат је приказао добијене резултате табеларно,
11 графички и сликама (25 табела, 9 графика и 6 слика). Добијени резултати су показали
12 да је од укупно 225 испитаних узорака, 33 или 14,67% крвних серума имало мерљив
13 титар антитела у 2-ME TAT. Најнижи испитивани титар од 1/50 имало је 13 крвних
14 серума или 5,78%, код 8 крвних серума установљен је титар од 1/100 или 3,55%, док је
15 титар од 1/200 имало 12 узорака серума или 5,33%. Вредност титра од 1/200
16 оцењивана је као сигурно позитиван налаз, и према овој вредности титра одређивана је
17 осетљивост, специфичност као и сагласност између осталих тестова.
18 Серопреваленција на узорку од 225 серума, уз употребу референтног теста и сигурно
19 позитивног титра антитела износила је 5,33%. Применом класичних бактериолошких
20 метода, *B. canis* је изолована из три узорка (1,33% у односу на укупан број испитаних
21 хомогенизата ткива репродуктивних органа) и то из 2 узорка пореклом од мужјака и
22 једног узорка пореклом од женке. Један изолат је потицао од серолошки негативног
23 пса. Изолати нису продуковали H₂S, били су каталаза позитивни и показивали су
24 својство брзе разградње урее. Као оријентациони тест, коришћен је и API 20 NE; сви
25 испитани изолати показали су профил *Moraxella phenylpyruvica* што указује на *Brucella*
26 spp. У тесту резистенције на различите концентрације тионина и базног фуксина, сви
27 изолати означени као 1, 2 и 3 су били осетљиви на концентрацију базног фуксина од
28 1/50000. Исту осетљивост показао је и референтни сој *B. canis* RM 6/66. Са друге
29 стране, сој *B. canis* SR-1 показао је резистенцију на ову концентрацију базног фуксина.
30 У разређењу од 1/100000 изолати 1, 2, и 3 су показали резистенцију на базни фуксин за
31 разлику од референтног соја *B. canis*. Сви испитани сојеви *B. canis* имали су идентичан
32 профил осетљивости на тионин. Добијени профил осетљивости на базни фуксин може
33 да буде важан маркер у епизоотиолошким испитивањима с обзиром на установљена
34 одступања у односу на референтни, и раније изоловане сојеве са овог подручја. Од 225
35 узорака испитаних Bruce-ladder multiplex PCR методом, позитивна реакција је
36 установљена код два (0,88%). Код позитивних узорака и позитивних контрола (*B. suis* и
37 *B. canis* SR-1) регистровано је 7 ампликона и то 1682, 1071, 794, 587, 450, 272 и 152 bp
38 што одговара профилу *B. suis* и што је познат недостатак методе, јер се неки изолати *B.*
39 *canis* декларишу као *B. suis*. Исти резултати су добијени и са новоизолованим сојевима
40 *B. canis*. Референтни сој *B. canis* RM 6/66 показао је 6 ампликона и одсуство траке од
41 794 bp што се по Bruce-ladder multiplex PCR методи уклапа у профил *B. canis*.

42 Пре формулације индиректног ELISA теста, одређиване су концентрације
43 протеина: у антигену добијеном топлотом установљена је концентрација од 0,606
44 mg/ml, а у антигену добијеном ултразвуком 0,561 mg/ml. Електрофоретска анализа
45 антигена добијених топлотом и ултразвуком као и денситометријска квантификација су
46 показале да је у антигену добијеном топлотом, најзаступљенија фракција молекулске
47 масе 10,95 kDa са учешћем од чак 43,12% која одговара R-LPS-у бруцела. Иста
48 фракција је у антигену добијеном ултразвуком била заступљена са 11,56%, односно у
49 количини која је била 3,7x мања. Протеински састав антигена добијеног применом
50 ултразвука био је значајно богатији, а по квантитативном саставу су доминирали
51 протеини молекулских маса од 30,5, 24,5, 38 и 22 kDa који припадају протеинима
52 спољашње мембране (*Omp-Outer membrane proteins*) и то групама 3 (25 kDa укупно 9%)
53 и 2 (36-38 kDa укупно 12%).

54 Шах титрацијом је установљена оптимална концентрација антигена за оба
55 ELISA теста од 1 µg/ml, оптимално разређење позитивног серума 1/200, а оптимално
56 разређење коњугованог антитела износило је 1/25000. За ELISA тест који је

1 формулисан са антигеном добијеним топлотом, средња вредност OD 30 негативних
2 серума износила је 0,1987, а стандардна девијација 0,06119. Средња вредност оптичке
3 густине негативног серума за овај антиген кроз 7 понављања у трипликату износила је
4 0,1286, стандардна девијација 0,03671, а коефицијент варијације 28,5%. Гранична
5 вредност (*Cut off*) за индиректни ELISA тест формулисан са антигеном добијеним
6 топлотом износила је $0,382 \pm 0,18$, односно кретала се у интервалу од 0,202 до 0,562.
7 Серуми чије су се OD вредности кретале у овом интервалу, поново су тестирани. Они
8 серуми чија је OD била виша од 0,382 означавају се као позитивни. По овом
9 критеријуму, од 225 испитаних серума, 44 односно 19,55% је било позитивно. За ELISA
10 тест са антигеном добијеним ултразвуком, средња вредност OD негативних серума
11 износила је 0,307, а стандардна девијација 0,10245; средња вредност OD негативног
12 серума кроз 7 понављања у трипликату износила је 0,1884, стандардна девијација
13 0,05389, а коефицијент варијације 28,6%. Добијена *cut off* вредност износила је
14 $0,614 \pm 0,30$, односно кретала се у интервалу од 0,314 до 0,914. Серуми чије су се OD
15 вредности кретале у овом интервалу, поново су тестирани. Они серуми чија је вредност
16 била виша од 0,614 означавају се као позитивни. У складу са наведеним критеријумом,
17 од 225 испитаних серума, 37 (16,44%) је било позитивно у индиректном ELISA тесту са
18 антигеном добијеним ултразвуком.

19 За одређивање сагласности између тестова коришћена је Карра статистичка
20 анализа за интервал поузданости од 95%. Осетљивост бактериолошке изолације у
21 односу на референтни тест износила је 16,7%, а специфичност 99,5%. Израчуната
22 Карра вредност износила је 0,251, што је у рангу средње, односно умерене
23 сагласности. Применом McNemar теста установљена је статистички значајна разлика
24 између ова два теста ($p < 0,05$), односно број позитивних узорака је био статистички
25 значајно виши у 2-ME TAT. Осетљивост Bruce-ladder PCR износила је 8,3%, а
26 специфичност 99,5%. Израчуната Карра вредност износила је 0,130 што је у рангу
27 безначајне сагласности. Применом McNemar теста установљена је статистички
28 значајна разлика између ова два теста ($p < 0,05$), односно број позитивних узорака је био
29 статистички значајно виши у 2-ME TAT у односу на Bruce-ladder PCR. Осетљивост
30 индиректног ELISA теста са антигеном добијеним топлотом износила је 66,7%, а
31 специфичност 83,1%. Израчуната Карра вредност износила је 0,220 и била је у рангу
32 средње сагласности. Применом McNemar теста установљена је статистички значајна
33 разлика између ова два теста ($p < 0,05$), односно број позитивних узорака је био
34 статистички значајно виши у индиректном ELISA тесту у односу на 2-ME TAT.
35 Осетљивост индиректног ELISA теста са антигеном добијеним ултразвуком износила је
36 66,7%, а специфичност 86,4%. Израчуната Карра вредност износила је 0,268 и била је у
37 рангу средње сагласности. Применом McNemar теста установљена је статистички
38 значајна разлика између ова два теста ($p < 0,05$), односно број позитивних узорака је био
39 статистички значајно виши у индиректном ELISA тесту у односу на 2-ME TAT.

40 Анализом дијаграма ROC криве уочава се да је ELISA тест са антигеном
41 добијеним ултразвуком бољи дискриминаторни тест зато што се крива налази ближе
42 левој и горњој линији дијаграма у односу на ELISA тест формулисан са антигеном
43 добијеним топлотом. Вредност површине испод криве за ELISA тест у коме је коришћен
44 антиген добијен ултразвуком је већа од вредности површине испод криве за ELISA тест
45 у коме је коришћен антиген добијен топлотом. Вредност површине испод криве (AUC)
46 износи 0,820 што ELISA тест са антигеном добијеним ултразвуком сврстава у добре
47 дијагностичке тестове.

48 У поглављу **Дискусија**, кандидат је критички и свеобухватно анализирао добијене
49 резултате и упоредио их са резултатима испитивања приказаним у цитираној
50 литератури.

51
52
53
54
55
56
57

1 VI **ЗАКЉУЧЦИ ИСТРАЖИВАЊА** (навести закључке који су приказани у докторској
2 дисертацији):
3

4 На основу спроведених испитивања и добијених резултата, могу се извести следећи
5 закључци:

- 6 1. Код невластничких паса пореклом са територије града Београда присутна је
7 бруцелоза изазвана врстом *B. canis*, а установљена серопреваленција износи
8 5,33%. Ова категорија паса представља потенцијални резервоар инфекције.
- 9 2. Свим припремљеним тестовима: 2-МЕ ТАТ, индиректним ELISA тестовима
10 дизајнираним са два различито припремљена антигена, класичном
11 бактериолошком изолацијом и Bruce-ladder multiplex PCR методом
12 дијагностикован је различит број паса позитивних на врсту *B. canis*. Најнижа
13 осетљивост је установљена код Bruce-ladder multiplex PCR, а највиша код
14 ELISA тестова.
- 15 3. Поређењем са 2-МЕ ТАТ осетљивост класичне бактериолошке изолације
16 износила је 16,7%, а специфичност 99,5%. Са друге стране, сагласност између
17 ова два теста износила је 0,251 и кретала се у рангу умерене сагласности.
- 18 4. Код изолованих сојева *B. canis*, установљена су одступања у профилу
19 осетљивости на базни фуксин у односу на референтни и раније изоловане
20 сојеве ове бактерије са нашег подручја, што може да буде значајан маркер у
21 епизоотиолошким испитивањима.
- 22 5. Поређењем са 2-МЕ ТАТ, осетљивост Bruce-ladder multiplex PCR методе је била
23 занемарљива и износила је 8,3%. Такође, сагласност између 2-МЕ ТАТ и
24 Bruce-ladder multiplex PCR износила је 0,130 што указује на занемарљиву
25 сагласност између ових тестова. Добијени резултати су потврдили да се
26 наведени PCR протокол не може користити за испитивање присуства ДНК
27 бруцела у хомогенизатима ткива утеруса и тестиса паса. Уз то, применом
28 Bruce-ladder multiplex PCR методе, није била могућа тачна идентификација
29 сојева *B. canis* изолованих са нашег географског подручја који су давали
30 профил врсте *B. suis*.
- 31 6. SDS-PAGE електрофорезом антигена добијеног топлотом, доказано је
32 доминантно присуство протеина од 10,95 kDa (43,7%) који одговара R-LPS-у *B.*
33 *canis*. Електрофоретски профил антигена добијеног ултразвуком имао је 3,7
34 пута мању количину R-LPS-а, и равномерно учешће протеина спољашње
35 мембране од 24,5, 30,47 и 38 kDa што је утицало на већу специфичност овако
36 припремљеног ELISA теста.
- 37 7. Степен највише сагласности установљен је између 2-МЕ ТАТ и ELISA теста са
38 антигеном добијеним ултразвуком. Добијена вредност од 0,268, се кретала у
39 рангу средње подударности. Осетљивост овако припремљеног ELISA теста
40 износила је 66,7% а специфичност 86,4%. Уз то, AUC вредност од 0,820 га
41 сврстава у добре дијагностичке тестове.
- 42 8. У циљу постављања тачне дијагнозе, за серолошко испитивање, поред 2-МЕ
43 ТАТ, препоручује се и употреба индиректног ELISA теста формулисаног са
44 антигеном добијеним ултразвуком због бољих карактеристика. Код постојања
45 сумњивих резултата серолошких тестова, обавезно је тестирање парних
46 серума и бактериолошко испитивање доступних клиничких узорака, због
47 доказаног постојања лажно негативних резултата.

48
49
50
51
52

1
2 **VII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА**
3 **(навести да ли су добијени резултати у складу са постављеним циљем и**
4 **задацима истраживања, као и да ли закључци произилазе из добијених**
5 **резултата):**
6

7 Презентација, описи, статистичка обрада и тумачење добијених резултата су у складу
8 са постављеним циљевима докторске дисертације. Уз помоћ табела, графика и слика
9 добијени резултати су приказани прегледно и јасно; описи и тумачења резултата су
10 логични, тачни и у складу са најновијим научним ставовима. Изведени закључци
11 произилазе из добијених резултата и јасно су формулисани.
12

13
14 **VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**
15

16 **1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави**
17 **теме?**
18

19 Докторска дисертација кандидата дипломираног ветеринара Наташе Стевић под
20 насловом „Испитивање поузданости серолошких, бактериолошких и
21 молекуларних метода у дијагностици бруцелозе паса изазване врстом *Brucella*
22 *canis*“ је написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.
23
24

25 **2. Да ли дисертација садржи све елементе прописане за завршену докторску**
26 **дисертацију?**
27

28 Докторска дисертација кандидата дипломираног ветеринара Наташе Стевић садржи
29 све елементе и у складу је са прописаним захтевима за завршену докторску
30 дисертацију.
31

32
33 **3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?**
34

35 У докторској дисертацији дипломираног ветеринара Наташе Стевић оригинални
36 допринос науци лежи у систематичном серолошком, бактериолошком и молекуларном
37 испитивању бруцелозе паса изазване врстом *B. canis*. Поред успешне изолације *B.*
38 *canis*, установљено је да се Bruce-ladder multiplex PCR метода не може користити за
39 испитивање клиничког материјала. Веома је важно истаћи да је кандидат током израде
40 докторске дисертације самостално припремио и валидовао све серолошке тестове
41 коришћене у испитивању. Несумњив допринос науци лежи и у формулацији
42 индиректног имуноензимског теста, који се на основу израчунате осетљивости и
43 специфичности, може користити у рутинској серолошкој дијагностици ове болести код
44 паса. Истовремена употреба аглутинационог и ELISA теста са антигеном добијеним
45 ултразвуком, повећава поузданост добијених резултата. То практично значи да циљана
46 примена два теста различитих генерација, може да повећа поузданост серолошких
47 реакција и олакша контролу бруцелозе паса. Допринос ове докторске дисертације лежи
48 и у процени значаја невластничких паса као потенцијалних резервоара у којима се
49 одржава врста *B. canis*.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 IX ПРЕДЛОГ:
2

3 На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже (одабрати једну од
4 три понуђених могућности):
5 - да се докторска дисертација прихвати а кандидату одобри одбрана
6

7
8 ДАТУМ
9

10 10.11. 2017. године
11

12 ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

13
14 1. Др Соња Радојичић, редовни професор
15 Факултет ветеринарске медицине
16 Универзитета у Београду
17

18 _____
19
20 2. Др Мирослав Валчић, редовни професор
21 Факултет ветеринарске медицине
22 Универзитета у Београду
23

24 _____
25
26 3. Др Душан Мишић, ванредни професор
27 Факултет ветеринарске медицине
28 Универзитета у Београду
29

30 _____
31 4. Др Казимир Матовић, научни сарадник
32 Ветеринарски специјалистички институт
33 Краљево
34

35 _____
36
37 5. Др Лазар Ранин, редовни професор
38 Медицински факултет
39 Универзитета у Београду
40

41
42
43
44