

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:** 25.06.2014. године, на 148.  
10 седници, Наставно-научно веће Факултета ветеринарске медицине Универзитета у  
11 Београду.

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

16  
17 Др Софија П. Катић-Радивојевић, редовни професор (у пензији), Паразитологија, 2002.  
18 год., Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду.

19  
20 Др Олгица М. Ђурковић-Ђаковић, научни саветник, Паразитологија, 1998. год., Институт  
21 за медицинска истраживања Универзитета у Београду.

22  
23 Др Војислав М. Павловић, редовни професор, Породиљство, стерилитет и вештачко  
24 осемењавање, 2002. год., Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

25  
26 **II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:**

27  
28 1. **Име, име једног родитеља, презиме:** Ивана (Миодраг) Клун

29  
30 2. **Датум рођења, општина, Република:** 18.11.1967. године, Београд, Савски венац,  
31 Р Србија, СФРЈ

32  
33 3. **Датум одбране, место и назив магистарске тезе:** 23.09.2005. године, Факултет  
34 ветеринарске медицине у Београду, "Сероепизоотиолошка студија инфекције копитара и  
35 папкара паразитом *Toxoplasma gondii* у Србији"

36  
37 4. **Научна област из које је стечено академско звање магистра наука:** Паразитологија

38  
39 **III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:** „Сероепизоотиологија и молекуларна  
40 дијагностика инфекције паразитом *Neospora caninum* код говеда“

41  
42 **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

43 Докторска дисертација мр Иване Клун написана је на 109 страна текста и садржи следећа  
44 поглавља: Увод (једна страна), Преглед литературе (25 страна), Циљ и задаци рада  
45 (једна страна), Материјал и метод рада (10 страна), Резултати (21 страна), Дискусија (15  
46 страна), Закључак (три стране) и Литература (25 страна, 287 библиографских навода).  
47 Дисертација садржи шест табела, 23 графикана, две схеме и 10 слика, а на почетку дат је  
48 кратак садржај на српском и енглеском језику.

49  
50 **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

51 У **Уводу** кандидат износи да је неоспороза глобално обољење говеда, које се данас  
52 сматра једним од најважнијих узрока побачаја и рађања мртворођене телади, са  
53 значајним последицама по репродуктивни капацитет стада као и по економски аспект  
54 сточарства. Како нема свеобухватних података о распрострањености ове инфекције у  
55 Србији (осим недавно објављених података о стању на епизоотиолошким подручјима  
56 Војводине) нема ни података о губицима које потенцијално проузрокује у говедарству  
57 Србије. Да би се попунила ова празнина, први корак за процену ризика од настанка  
58 оваквих губитака представља прикупљање валидних података о раширености неоспорозе  
59 код нас и утврђивање фактора ризика путем сероепизоотиолошке студије пресека. Пилот  
60 истраживање на ограниченом узорку крава из целе Србије пре неколико година самог  
61 аутора тезе и сарадника показало је да је ова инфекција присутна, и утврђена је  
62 серопреваленција од 8,6%, док је једно скорашње истраживање ограничено на регион  
63 Панчева показало серопреваленцију од 4,6%. Такође, пошто не постоје довољно брзе,

1 осетљиве и специфичне методе етиолошке дијагностике узрока побачаја код крава које су  
2 стандардизоване и валидиране а истовремено и исплативе, у циљу унапређења  
3 дијагностике овог обољења потребно је размотрити увођење молекуларно-дијагностичких  
4 метода.

5 У поглављу **Преглед литературе**, написаног на основу великог броја библиографских  
6 јединица, изнети су подаци о неоспорози као и о самом узрочнику, почевши од историјата  
7 и таксономске класификације преко пет подпоглавља о животном циклусу, облицима и  
8 морфолошким карактеристикама *N. caninum*, путевима инфекције, инфекцији *N. caninum*  
9 код говеда и патогенетским, имунолошким, эпизоотиолошким и клиничким  
10 карактеристикама обољења, контроли и превенцији неоспорозе говеда, и на крају, о  
11 дијагностици неоспорозе, и то путем директних и индиректних метода.

12 **Циљ** истраживања у оквиру ове докторске дисертације обухватио је:

- 13 - одређивање преваленције инфекције паразитом *Neospora caninum* код говеда у Србији;
- 14 - утврђивање эпизоотиолошких фактора који утичу на настанак инфекције;
- 15 - сагледавање могућности примене мера превенције; и
- 16 - оптимизацију метода молекуларне дијагностике овог обољења и сагледавање  
17 могућности примене молекуларних метода у дијагностици неоспорозе;

18 а остварен је кроз следеће задатке:

- 19 - доказивање присуства IgG антитела специфичних за *N. caninum* у серумима говеда  
20 помоћу серолошког *screening* компетитивног имуноензимског теста (*cELISA*);
- 21 - испитивање повезаности резултата серолошких испитивања са основним  
22 эпизоотиолошким параметрима, како зоографским, тако и зоотехничким и  
23 зоохигијенским чиниоцима који могу бити од значаја за преношење инфекције; и
- 24 - оптимизација метода *PCR*-а у реалном времену на узорцима крви и крвних елемената.

25 У поглављу **Материјал и метод рада** детаљно се описује начин прикупљања биолошког  
26 материјала у узорку од 1496 крава старости  $\geq 24$  месеца из целе Србије. Узорци су  
27 одабрани методом случајног узорка, стратификовани према испитиваном подручју у групе  
28 пропорционалне величине, и тако да већина општина у датом подручју буде заступљена.  
29 Величина узорка је израчуната по *Thrusfield*-у (2005). Од сваке од 1496 јединки узет је по  
30 узорак крви (серума), а код 94 од њих по два (са и без додатка антикоагуланса *EDTA-K2*).  
31 Из 94 узорка са антикоагулансом, издвајање мононуклеарних ћелија вршено је методом  
32 *Ficoll* + натријум диатризоат градијента. Обрада узорка и процесуирање вршени су у  
33 лабораторији Центра за паразитске зоозоозе Института за медицинска истраживања  
34 Универзитета у Београду. Узорковање крви било је праћено прикупљањем  
35 эпизоотиолошких података – о зоографским чиниоцима, као и зоотехничким и  
36 зоохигијенским условима: регион, просечна годишња количина падавина, величина стада,  
37 доминантно заступљена раса, начин гајења, начин држања у штали, употреба силаже у  
38 исхрани, порекло грла за ремонт стада, присуство и број паса, као и појава побачаја у  
39 стаду.

40 Серолошка испитивања тј. доказивање *N. caninum* специфичних антитела је на свих 1496  
41 узорака обављено комерцијалним компетитивним ELISA тестом (*cELISA*), према упутству  
42 произвођача (*VMRD Inc., Pullman, Wa, USA*). Као праг позитивности за испитивану  
43 популацију говеда, уместо 30% колико препоручује произвођач, узет је степен инхибиције  
44 од 40%.

45 Доказивање присуства ДНК протозое *Neospora caninum* у узорцима мононуклеарних  
46 ћелија (из узорака крви са антикоагулансом) и коагулума (из узорака крви без  
47 антикоагуланса) обављено је *real-time PCR* техником („*PCR* у реалном времену“), и то  
48 тако да је амплификација и детекција *N. caninum* Nc5 репетитивног елемента (*GenBank*  
49 приступни број X84238.1) према валидираном протоколу *Constantin* и сар. (2011), вршена  
50 на *Mastercycler ep realplex<sup>4</sup>* апарату (*Eppendorf AG, Hamburg, Germany*), коришћењем  
51 универзалног *Taq*-полимераза мастер микса са урацил N-гликозилазом (*Maxima<sup>®</sup> Probe*  
52 *qPCR Master Mix (2X)*, *Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc.*). Коришћени су прајмери  
53 NeoF (GTG CTC GCT GGG ACT TCA G) и NeoR (CGA TTT ACG ACA TAC GGT GTT CA), и  
54 *Taqman<sup>®</sup>* проба NeoPr1: FAM - CAT CGG AGG ACA TCG CTC ACT GAC TG – BHQ1.  
55 Очекивана дужина секвенце продукта добијеног овим умножавањем је 83 бп (базних  
56 парова), што је проверено на *BLAST* интерактивном алату као и на агар дифузионом гелу.  
57 Циклус амплификације програмиран је на следећи начин: 10 минута на 95°C, 45 циклуса  
58 од по 15 секунди на 95°C и 60 секунди на 60°C. Резултати су сматрани позитивним

1 уколико је до детекције сигнала изнад вредности прага (*background*) флуоресценције  
2 дошло током првих 40 циклуса (*Ct-threshold cycle values*). Сви узорци рађени су у  
3 дупликату, а свака реакција укључивала је позитивну контролу (ДНК *Nc*) као и негативне  
4 контроле (вода, и узорци пореклом од серонегативних јединки које су потицале са  
5 серонегативних фарми). Провера очекиване дужине амплификоване секвенце вршена је  
6 електрофорезом *qPCR* продуката (укључујући и позитивну и негативне контроле) на 3%  
7 агар дифузионом гелу, на 90 V током 45 до 60 минута. Гел је прављен у *Tris-Acetate-EDTA*  
8 пуферу (ТАЕ 1X) са додатком агарозе, и бојен етидијум бромидом, а ради одређивања  
9 величине продукта на гел је наносен и "50bp ladder" маркер (*Fermentas*). Гелови су  
10 очитавани, фотографисани и анализирани на УВ трансилуминатору са камером и  
11 софтвером (*Gel Documentation system/CCD, Biometra*).

12 Статистичка обрада резултата обухватила је испитивање утицаја свих појединачних  
13 испитиваних епизоотиолошких фактора као независно променљивих варијабли на  
14 серопреваленцију *N. caninum* (на индивидуалном нивоу) и на присуство инфекције *N.*  
15 *caninum* (на нивоу фарме) као зависно променљивих варијабли путем униваријантне  
16 логистичке регресије. Фактори значајни на нивоу од  $P \leq 0,25$  (*Mickey* и *Greenland*, 1989) са  
17 95% ИП тестирани су на евентуалну колинеарност и затим укључени у моделе  
18 мултиваријантне логистичке регресије. Колинеарност је утврђивана на основу вредности  
19 Крамеровог V-кофицијента ("*Cramer's V*") као мере корелације између два по  
20 претпоставци независна фактора (0–0,33 слаба, 0,34–0,67 умерена и 0,67–1,00 јака  
21 корелација). Тачност финалних регресионих модела испитана је методом *Hosmer-*  
22 *Lemeshow*. За испитивани фактор "регион", за референтну категорију изабран је северни  
23 регион. За све друге испитиване факторе, за референтне категорије узимане су оне са  
24 највећим бројем посматраних случајева. Резултати мултиваријантних модела приказани  
25 су као кориговани односи вероватноћа – OR ("odds ratio") у границама 95% ИП. Границом  
26 статистичке значајности сматрана је вероватноћа од 5% ( $P < 0,05$ ).

27 **Резултати** испитивања су дати у три целине, у складу са задацима рада. У првој целини  
28 приказани су резултати испитивања серопреваленције *N. caninum* специфичних антитела  
29 код говеда у Србији, као и дистрибуција специфичних антитела према степену  
30 инхибиције. Утврђена је стопа инфекције од 7,2% (108/1496), са вредностима степена  
31 инхибиције код серопозитивних јединки у распону од 40,3 – 91,8% (средње вредности 71,9  
32  $\pm$  17,1%), а практично половина серопозитивних крава имала је степен инхибиције од  
33 преко 80% (медијана од 79,9%). Присуство инфекције паразитом *N. caninum* утврђено је  
34 на 10,7% испитиваних фарми (86/800), на целој територији Србије. Степен прокужености  
35 инфекције паразитом *N. caninum* у различитим подручјима Србије износио је од 2,2 до  
36 12% на нивоу јединке, односно 5,9 до 25,9% на нивоу фарми.

37 У другој целини, у два посебна одељка, приказани су резултати испитивања утицаја  
38 епизоотиолошких фактора на инфекцију паразитом *N. caninum*, и то на индивидуалном  
39 нивоу и на нивоу фарме. У финалним моделима мултиваријантне логистичке регресионе  
40 анализе, са веома високим степеном тачности предвиђања (од 92,8% односно 89,9%),  
41 показано је да само начин држања у штали значајно и независно утиче на преваленцију *N.*  
42 *caninum* инфекције на индивидуалном нивоу, и то тако да су говеда која су држана у  
43 шталама са слободним системом била под преко три пута вишим ризиком да буду  
44 инфицирана од говеда која се држе у везном систему; док је на нивоу фарме утврђено да  
45 величина стада и начин држања у штали значајно и независно утичу на присуство *N.*  
46 *caninum* инфекције на фармама, тако да је ризик за присуство инфекције био 24 пута  
47 виши за велике фарме, него за оне које су држале 10 и мање говеда, као и да су фарме  
48 на којима се говеда држе слободно у шталама биле под преко 18 пута вишим ризиком од  
49 присуства инфекције него оне где се говеда држе у везном систему.

50 У трећој целини приказани су резултати оптимизације метода *PCR*-а у реалном времену  
51 на узорцима крви и крвних елемената. Успешном детекцијом 0,3 fg ДНК позитивне  
52 контроле *N. caninum* показана је изузетно велика осетљивост метода ( $\approx$  1 тахизоит/2,5 mL  
53 чистог ДНК елуата, односно приближно еквиваленту ДНК 0,3 тахизоита/mL испитиваног  
54 материјала пре екстракције). У узорцима МН ћелија и коагулума није детектована ДНК *N.*  
55 *caninum*, док је испитивањем спајкованих узорака показана нешто већа осетљивост  
56 метода за детекцију ДНК у узорцима МН ћелија у односу на узорке пуне крви – два пута  
57 већа при садржају ДНК од 10 fg, и 25% већа за 100 fg ДНК.

58 У поглављу **Дискусија** кандидат је детаљно анализирао резултате сопственог рада у  
59 контексту података из литературе.

1 У поглављу **Литература** дато је 287 литературних навода, укључујући и већи број сасвим  
2 нових (од 2010. до данас). Наводи највећим делом потичу из међународне научне  
3 периодике, али су наведена и сва домаћа истраживања проблема обрађеног у раду.

#### 4 5 **VI ЗАКЉУЧЦИ ИСТРАЖИВАЊА:**

6 У поглављу **Закључак**, кандидат је на основу резултата испитивања, јасно и прегледно у  
7 8 тачака, изложила закључке свог рада:

- 8 1) Инфекција *N. caninum* је доказана код говеда на целој територији Србије, са степеном  
9 прокужености од 7,2%. Присутан је низак до умерен степен прокужености у  
10 различитим подручјима Србије (од 2,2 до 12%).
- 11 2) На 10,7% испитаних фарми установљено је присуство бар једне серопозитивне  
12 јединке, што представља релативно ниску стопу инфекције на нивоу фарме и говори  
13 да инфекција *N. caninum* није широко распрострањена на фармама говеда у Србији.
- 14 3) За серолошко испитивање говеда у Србији комерцијалним *sELISA* тестом (*VMRD*)  
15 подизање граничне вредности са 30% колико препоручује произвођач, на 40%  
16 показало се као одговарајуће. Наиме, резултати *sELISA* теста за серопозитивне  
17 јединке, тј. вредности степена инхибиције кретале су се од 40,3 до 91,8% (средња  
18 вредност  $71,9 \pm 17,1\%$ ), са медијаном од 79,9%, што представља двоструко већу  
19 вредност од оне узете као праг позитивности (40%), и потврђује добру резолуцију  
20 теста са овако прилагођеним прагом позитивности.
- 21 4) Једини фактор ризика за инфекцију говеда у Србији на индивидуалном нивоу је  
22 слободан начин држања. На нивоу фарме, факторе ризика представљају величина  
23 стада >100 грла, као и слободан начин држања у односу на држање у везном систему.  
24 С обзиром на ове факторе ризика, за превенцију неоспорозе препоручује се  
25 побољшање зоохигијенских и зоотехничких услова, нарочито на великим фармама, и  
26 фармама где се говеда држе у слободном систему.
- 27 5) Ниска до умерена прокуженост говеда, и релативно ниска стопа инфекције на  
28 фармама, уз високе вредности титра специфичних антитела код половине  
29 серопозитивних јединки, као и одсуство статистички значајне повезаности присуства  
30 паса на фармама и преваленције инфекције, иду у прилог претпоставци да је  
31 доминантни начин преношења инфекције *N. caninum* код говеда у Србији вертикалан.
- 32 6) Уведен је и оптимизован метод молекуларне дијагностике (*PCR* у реалном времену)  
33 за детекцију *N. caninum* изузетно високе осетљивости од 0,3 fg ДНК позитивне  
34 контроле ( $\approx 1$  тахизоит / 2,5 mL чистог ДНК елуата, што је еквивалентно ДНК 0,3  
35 тахизоита / mL испитиваног материјала пре екстракције). Показана је већа осетљивост  
36 метода у детекцији ДНК *N. caninum* у спајкованим узорцима МН ћелија него у  
37 узорцима пуне крви, па се стога у ове сврхе МН ћелије периферне крви и препоручују  
38 као материјал за екстракцију ДНК.
- 39 7) Испитивањем материјала пореклом и од серопозитивних и од серонегативних крава у  
40 овом истраживању ни у једном узорку крви или МН ћелија није утврђена ДНК  
41 паразита, што указује на то да у тренутку узорковања ни у једном случају у  
42 циркулацији није било тахизоита *N. caninum*.
- 43 8) Примењени молекуларно-дијагностички метод може да допринесе прецизној и брзој  
44 етиолошкој дијагностици и може се, у комбинацији са клиничким, патохистолошким и  
45 серолошким налазом, препоручити за дијагностику неоспорозе и етиолошке  
46 дијагностике побачаја код крава као и ради откривања паразитемије након примарне  
47 инфекције или реактивирања латентне инфекције код стеоних крава, и процене и  
48 праћења епизооциолошке ситуације овог обољења код говеда у Србији, посебно на  
49 нивоу специјализованих лабораторија.

#### 50 51 **VII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА:**

52 Кандидаткиња је користила најсавременију и најактуелнију методологију, како у  
53 статистичкој анализи утицаја епизооциолошких фактора на инфекцију *N. caninum* код  
54 говеда у Србији, тако и у оквиру оптимизације метода молекуларне дијагностике  
55 неоспорозе. Резултати спроведених истраживања, поред текстуалног дела,  
56 документовани су са пет табела, 23 графикона и пет слика, и у потпуности су у  
57 сагласности са постављеним циљевима и задацима истраживања. Резултати су тумачени  
58 исправно и критички, а закључци су изведени на основу резултата. Кандидаткиња је рад  
59 написала концизно, јасно и разумљиво, а стилски лепо.

1 **VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

2  
3 **1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави**  
4 **теме?**

5 Дисертација је у потпуности написана у складу са образложењем наведеним у пријави  
6 теме.

7  
8 **2. Да ли дисертација садржи све елементе прописане за завршену докторску**  
9 **дисертацију?**

10 Дисертација садржи све битне елементе завршене докторске дисертације.

11  
12 **3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?**

13 На основу пажљиве анализе завршене докторске дисертације мр Иване Клун Комисија  
14 сматра да дисертација представља значајан и потпуно оригиналан научни допринос  
15 познавању эпизоотиологије неоспорозе говеда, као и значајан допринос унапређењу  
16 дијагностике овог обољења у нашој земљи. Кандидаткиња је за тему свог рада изабрала  
17 веома актуелан проблем који до сада није код нас систематски и свеобухватно  
18 обрађиван. Добро је поставила и у потпуности извршила постављене задатке. За своја  
19 испитивања одабрала је репрезентативан узорак и адекватне методе, а добијене  
20 резултате обрадила најсавременијим статистичким методама, прегледно их изложила и у  
21 дискусији критички размотрила. Резултати дисертације дали су увид у основне  
22 эпизоотиолошке параметре инфекције паразитом *N. caninum* код говеда у нашој средини,  
23 а испитивање прокужености говеда представља прво опсежно сероепизоотиолошко  
24 испитивање неоспорозе на репрезентативном узорку на нивоу целе земље, што овој  
25 дисертацији обезбеђује посебан академски значај. Посебно је занимљива анализа којом  
26 се доказује да је основни пут ширења неоспорозе у нашој земљи вертикалан, а што  
27 говори о релативно недавној интродукцији ове инфекције у нашој средини. Академски  
28 значај је даље наглашен и тиме да је у оквиру ове дисертације извршено и увођење и  
29 оптимизација молекуларне дијагностике неоспорозе у нашој земљи.

30 Међутим, осим академског, ова дисертација има и апликативни значај, јер је утврђивањем  
31 фактора ризика за настанак инфекције, те указивањем на могућности за искључивање  
32 појединих, кандидат поставила научну основу за практични програм мера превенције  
33 неоспорозе говеда у нашој земљи. Други несумњив практичан значај ове дисертације  
34 лежи у оптимизацији молекуларне дијагностике и постављању основе за увођење  
35 молекуларних метода у дијагностику неоспорозе код нас, што ће допринети не само  
36 будућим истраживањима већ и практичном решавању проблема на терену а тиме и  
37 унапређењу нашег сточарства у целини.

38  
39 **IX ПРЕДЛОГ:**

40  
41 **На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже:**

42 - да се докторска дисертација прихвати а кандидату одобри одбрана

43  
44  
45  
46 У Београду,  
47 19.08.2014. године

КОМИСИЈА

48  
49  
50  
51 -----  
52 Др Софија Катић-Радивојевић, ред. проф. ФВМ  
53 у пензији

54  
55  
56 -----  
57 Др Олгица Ђурковић-Ђаковић, н. сав. ИМИ

58  
59  
60 -----  
61 Др Војислав Павловић, ред. проф. ФВМ  
62