

IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

I PODACI O KOMISIJI:

1. Datum i naziv organa koji je imenovao Komisiju:

Nastavno-naučno veće Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu na 167. sednici održanoj 20.04.2016. godine.

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

1. Dr Zoran Kulišić, redovni profesor, Parazitologija, 2002, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu;

2. Dr Sonja Radojičić, redovni profesor, Epizootiologija, zarazne bolesti životinja i bolesti pčela i sviloprelja, 2011, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu;

3. Dr Vlado Teodorović, redovni profesor, Higijena i tehnologija mesa, 2007, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu;

4. Dr Tamara Ilić, vanredni profesor, Parazitologija, 2015, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu;

5. Dr Aleksandar Džamić, vanredni profesor, Mikrobiologija i imunologija, 2011, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu.

II PODACI O KANDIDATU:

1. Ime, ime jednog roditelja, prezime: Zoran, Radoslav, Debeljak

2. Datum rođenja, opština, Republika: 05.08.1961. Kraljevo, Srbija

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

23. jun 1998. godine, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd „Epizootiološko epidemiološke karakteristike bruceloze na teritoriji Kosova i Metohije“

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

Epizootiologija zaraznih i parazitskih bolesti i zoonoze

III NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:

„Parazitološka i molekularna ispitivanja genotipova i haplotipova metacestoda *Echinococcus granulosus sensu lato* i epizootiološke karakteristike hidatidoze kod različitih vrsta životinja“

IV PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broj strana, poglavlja, slika, šema, grafikona i sl.):

Doktorsku disertaciju koja je napisana na 121 strani čine poglavlja: Uvod, Pregled literature, Cilj i zadaci istraživanja, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci i Spisak literature. U okviru ove doktorske disertacije nalazi se 40 tabela, 29 slika i 7 kartograma.

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

U Uvodu, doktorand iznosi najvažnije podatke o ehinokokoziji/hidatidozi, kosmopolitskoj parazitskoj antropozoonozi koju izaziva više vrsta i genotipova parazita koji pripadaju rodu *Echinococcus*, familiji Taeniidae. U Uvodu se navodi da je na osnovu rezultata filogenetske analize ustanovljeno da rodu *Echinococcus* pripada devet vrsta: *E. granulosus sensu stricto* (s.s.),

1 *E. equinus*, *E. ortleppi*, *E. canadensis*, *E. multilocularis*, *E. shiquicus*, *E. vogeli*, *E. oligarthra* i *E.*
2 *felidis*. Genetska raznovrsnost roda *Echinococcus* ogleda se u većem broju genotipova koji imaju
3 različit stepen adaptacije na pojedine domaćine i nazvani su po dominantnom prelaznom
4 domaćinu. Doktorand iznosi da je ehinokokoza oboljenje više vrsta karnivora – stalnih
5 domaćina (pas, mačka, vuk, lisica, šakal, lav) koji se inficiraju ingestijom fertile hidatidne
6 ciste poreklom iz organa prelaznog domaćina. Odrasli oblici parazita su lokalizovani u
7 njihovom tankom crevu, iz koga se u kontinuitetu eliminišu u spoljašnju sredinu člančici sa
8 jajima. Hidatidoza je infekcija više vrsta domaćih i divljih životinja (ovca, svinja, goveče, koza,
9 bivo, konj, zec, jelenska i srneća divljač i druge) i čoveka koji predstavljaju prelazne domaćine
10 ove infekcije. Larveni razvoj *E. granulosus* odvija se posle ingestije infektivnih jaja u različitim
11 organima prelaznih domaćina. Oboljenje kod prelaznih domaćina poznato je kao hidatidoza,
12 hidatidna bolest ili cistična ehinokokoza. Larveni oblik pantljičare *E. granulosus* naziva se *E.*
13 *polymorphus* syn. *cysticus* (hidatidna cista, ehinokokusna cista, ehinokokus, vodeni mehur,
14 žednjak).

15 U poglavlju **Uvod** ističe se da su savremene metode molekularnih proučavanja uzročnika
16 dale značajan doprinos detaljnijem rasvetljavanju epizootioloških i epidemioloških
17 karakteristika bolesti. U okviru roda *Echinococcus* četiri vrste sa 10 genotipova (sojeva)
18 označenih od G1 do G10 formiraju kompleks *E. granulosus sensu lato* (s.l.), i to: *E. granulosus*
19 *sensu stricto* (s.s.) (genotip G1 – ovčiji soj, genotip G1BC – podtip ovčijeg soja, genotip G2 – soj
20 Tasmanijske ovce i genotip G3 – bivolji soj), *E. equinus*, (genotip G4 – soj konja i ekvida), *E.*
21 *ortleppi* (genotip G5 – goveđi soj) i *E. canadensis* (genotip G6 – kamilji soj, genotip G7 – svinjski
22 soj, genotip G8 – soj Severnoameričkih jelena, genotip G9 – soj kod ljudi u Poljskoj i genotip
23 G10 – soj Skandinavskih jelena). Genetska raznovrsnost kompleksa *E. granulosus* s.l. uspešno
24 se determiniše analizom DNK sekvence mitohondrijalnog citohrom C-oksida 1 (*cox1*) gena. Za
25 ova ispitivanja projektovani su specifični prajmeri, a proučavanjem proizvoda sekvenciranja
26 moguće je identifikovati vrstu i genotip parazita. Doktorand iznosi da u okviru *E. granulosus* s.l.
27 kompleksa poseban epidemiološki značaj ima 7 sojeva koji su zoonoznog karaktera: ovčiji soj –
28 G1, soj Tasmanijske ovce – G2, bivolji soj – G3, goveđi soj – G5, kamilji soj – G6, svinjski soj –
29 G7 i jelenski soj – G8. Najvažniji sojevi za infekciju ljudi su: ovčiji – G1 i goveđi soj – G5.
30 Ispitivanja genetskih mikrovarijanti unutar *E. granulosus* s.s. potvrdila su da se radi o genetski
31 veoma varijabilnim genotipovima (G1, G2 i G3) sa većim brojem haplotipova. Definisanjem
32 haplotipova ustanovljavaju se genetske mikrovarijante uočene u okviru *E. granulosus* s.s.,
33 genotipova: G1, G2 i G3. To su geni koji se ne rekombinuju, ali se menjaju mutacijama koje
34 remete redosled nukleotida, a mogu zahvatiti jedan ili više nukleotida. Ova promena
35 nukleotida može, a ne mora, dovesti do promene redosleda aminokiselina. Indeks diverziteta
36 (broj haplotipova, diverzitet haplotipova i nukleotidni diverzitet) utvrđuju se upotrebom
37 namenskih softvera (Arelquin 3.1.). Haplotip identifikacija i crtanje mreže kompjuterizovani su
38 upotrebom TCS 1.21 softvera za obradu podataka, sa ciljem ustanovljavanja povezanosti
39 niskog nivoa odstupanja. Proučavanjem materijala iz hidatidnih cista domaćih životinja i ljudi u
40 različitim regijama i državama ustanovljeno je prisustvo različitog broja i vrsta mitohondrijalnih
41 DNK (mtDNK) haplotipova (u Istočnoj Evropi 23, na Tibetanskoj visoravni 43, u Italiji 7).

42 Kao deo Balkanske regije i Mediteranskog basena, Srbija je sastavni deo endemskog
43 područja hidatidoze. U Balkanskoj regiji poseban značaj ima infekcija sa *E. granulosus* u
44 okviru koje se nalazi veći broj vrsta i genotipova. U Republici Srbiji procenat domaćih životinja
45 kod kojih je ustanovljeno prisustvo *E. polymorphus* značajno varira u odnosu na vrstu, način
46 gajenja, geografsku lokaciju i socio-ekonomske uslove. Hidatidoza je najčešće dijagnostikovana
47 kod ovaca, goveda i svinja.

48 U **Pregledu literature** citirana su najnovija istraživanja koja su razvrstana u više podpoglavlja
49 poput etiologije, patogeneze, patomorfologije, epizootiologije i epidemiologije hidatidoze. U
50 završnom delu poglavlja **Pregled literature** detaljno je prikazan značaj molekularne
51 epizootiologije i epidemiologije, kao i geografska distribucija pojedinih vrsta i genotipova *E.*
52 *granulosus* s.l. kompleksa.

53 U poglavlju **Cilj i zadaci istraživanja**, doktorand navodi da su ciljevi njegove disertacije bili:

- 54 1. Da u organima poreklom od različitih vrsta životinja različite starosti, ustanovi
55 distribuciju hidatidnih cista, njihov broj, tip, veličinu, količinu hidatidne tečnosti,
56 fertilitet i vijabilnost.
- 57 2. Da identifikuje prisutne genotipove i haplotipove *E. granulosus* s.l. kod ispitivanih vrsta
58 životinja.

3. Da definiše dominantne genotipove po vrstama ispitivanih životinja.
4. Da ustanovi epizootičke karakteristike hidatidoze kod ispitivanih vrsta životinja u Republici Srbiji.

Zadaci istraživanja ove doktorske disertacije su bili:

1. Makroskopski pregled organa životinja zaklanih u klanici, odnosno u toku obdukcije uginulih domaćih ili odstreljenih divljih životinja.
2. Prikupljanje opštih i epizootičkih podataka koji se odnose na životinje kod kojih su ustanovljene hidatidne ciste, u cilju proučavanja epizootičkih karakteristika po vrstama životinja.
3. Uzorkovanje organa sa hidatidnim cistama i dostava u laboratoriju.
4. Ispitivanje hidatidnih cista u cilju utvrđivanja njihove distribucije u organima, broja, tipa i veličine, patomorfološkim i morfometrijskim pregledom.
5. Uzorkovanje sadržaja cista za dalja laboratorijska ispitivanja.
6. Ispitivanje fertilnosti i vijabilnosti cista.
7. Molekularna ispitivanja sadržaja hidatidnih cista u cilju determinacije genotipova i haplotipova u okviru *E. granulosus* s.l. korišćenjem PCR metodologije i sekvenciranja po protokolu MI-05 Evropske referentne laboratorije za parazite u Rimu (EURLP). Poređenje dobijenih proizvoda sekvenciranja sa referentnim nukleotidnim sekvencama za pojedine genotipove koji su registrovani u banci gena (GenBank). Potvrđivanje genotipova i haplotipizacija u Evropskoj referentnoj laboratoriji za parazite u Rimu (EURLP).
8. Statistička obrada dobijenih podataka.
9. Epizootička analitika dobijenih rezultata.

U poglavlju **Materijal i metode** detaljno se navode podaci koji se odnose na vrste materijala i metode uzorkovanja organa za ispitivanja, broj i način uzimanja i čuvanja uzoraka, vrstu stočarske proizvodnje u zaptima iz kojih potiču uzorci, kao i podaci o njihovoj geografskoj distribuciji i epizootičkim karakteristikama. Nakon toga navode se metode koje su korišćene za patomorfološka, morfometrijska i parazitološka ispitivanja, kao i ekstrakciju DNK i pripremu PCR proizvoda, amplifikaciju, identifikaciju i prečišćavanje PCR proizvoda, sekvenciranje sa tumačenjem rezultata sekvenciranja i haplotipizacije, kao i statističke i epizootičke metode korišćene za obradu rezultata. Navodi se da su organi sa hidatidnim cistama domaćih i divljih svinja, goveda i ovaca uzorkovani u periodu od marta 2012. do marta 2014. godine, sa teritorije 21 opštine, različitih epizootičkih područja u Republici Srbiji. Ukupno je uzorkovan materijal od 97 životinja, i to od: 21 ovce, 25 goveda, 49 domaćih i 2 divlje svinje. Za svaku životinju kod koje je ustanovljeno prisustvo hidatidnih cista na nekom od organa i koji je uzorkovan za ispitivanja, prikupljeni su epizootički podaci od značaja u analizi epizootičke situacije. Pored opštih podataka koji se odnose na poreklo i identifikaciju životinja, prikupljeni su podaci o starosti, polu, načinu gajenja i stanju uhranjenosti. Podaci su prikupljeni i evidentirani na jedinstven način, popunjavanjem anketnog lista koji je namenski osmišljen za ovu svrhu. Organi u kojima su ustanovljene hidatidne ciste čuvani su na temperaturi +4 °C i u toku narednih 24-48 sati transportovani u laboratoriju. U slučaju nemogućnosti transporta u ovom periodu, materijal je zamrzavan na -18 °C. Makroskopskim i morfometrijskim ispitivanjem pregledano je ukupno 80 uzoraka jetre (od 10 ovaca, 19 goveda, 49 domaćih svinja i 2 divlje svinje), 26 uzoraka pluća (od 13 ovaca i 13 goveda) i 1 uzorak srca poreklom od 1 domaće svinje. Iz svakog organa koji je dostavljen za morfometrijsko ispitivanje uzorkovano je 3-5 hidatidnih cista za parazitološko ispitivanje. S obzirom na to da je isti materijal korišćen za parazitološka i molekularna ispitivanja, uzorkovanje je rađeno uz poštovanje principa aseptičnog uzorkovanja. Spoljašnji deo organa u kome se nalazila cista/e tretiran je 75% etil alkoholom. Iz hidatidne ciste uz pomoć brizgalice i igle aspiriran je celokupni tečni sadržaj ciste u aseptičnim uslovima. Uz pomoć makaza i pincete rasecan je spoljašnji zid ciste i uzorkovana čitava ili deo germinativne membrane. Tečni sadržaj hidatidnih cista korišćen je kao uzorak za parazitološko ispitivanje fertilnosti i vijabilnosti. Materijal za molekularna ispitivanja uzorkovan je od 54 životinje, i to od: 16 goveda (21 uzorak), 17 domaćih svinja (19 uzoraka), 19 ovaca (22 uzorka) i 2 divlje svinje (2 uzorka). Za molekularna ispitivanja uzorkovan je sadržaj ciste i germinativna membrana, pri čemu je deo sadržaja ciste korišćen za prethodna parazitološka ispitivanja. Od pojedinih životinja uzorkovane su ciste iz različitih organa, kao i više cista iz istog organa. Kao

materijal za molekularna ispitivanja, korišćena je suspenzija dobijena mešanjem tečnog sadržaja ciste sa germinativnom membranom koja je prethodno usitnjena sterilnim priborom. Ovako pripremljena suspenzija je u toku 4 ciklusa centrifugirana, uz odlivanje tečne faze – supernatanta, nakon čega je dodavana sterilna dejonizovana voda i vršena resuspenzija vorteks aparatom. Priprema je završavana izdvajanjem 500 µl uzorka koji je smrzavan na -18 °C do molekularnog ispitivanja. Molekularno ispitivanje: identifikacija vrste, genotipa i haplotipa metacestoda *E. granulosus* s.l. u materijalu iz hidatidnih cista rađeno je analizom DNK sekvence mitohondrijalnog citohrom C-oksidge 1 (cox1) gena. U radu je korišćen protokol MI-05 Evropske referentne laboratorije za parazite u Rimu. Ekstrakcija DNK iz sadržaja hidatidne ciste rađena je na uređaju *Kingfisher ml*, *Thermo Scientific*, uz korišćenje komercijano dostupnog kita, *MagVet* (*LSI*, *Francuska*). U okviru pripreme MasterMiks-a, u PCR MasterMiks (proizvođač *Fermentas* *Litvanija*), dodavani su specifični prajmeri – oligonukleotidne sekvence mitohondrijalnog markera CO1 (citohrom C-oksidge 1 (cox1) gena):

CO1.F = 5'-TTT.TTT.GGC.CAT.CCT.GAG.GTT.TAT-3' i

CO1.R = 5'-TAA.CGA.CAT.AAC.ATA.ATG.AAA.ATG-3', (*Invitrogen*, (*SAD*)). U ovako pripremljenu smešu dodavana je ekstrahovana DNK ispitujućih uzoraka. Umnožavanje specifičnih fragmenata DNK vršeno je u PCR uređaju (*2720 Applied Biosystems*, *SAD*) u toku 40 ciklusa, sa početnom denaturacijom na 94 °C u toku 3 minuta, amplifikacijom (30 sek./94 °C; 30 sek./55 °C; 30 sek./72 °C) i završnom denaturacijom na 72 °C u toku 7 minuta. Posle 40 ciklusa dobijeni proizvodi amplifikacije su podvrgavani elektroforezi. Nakon izvođenja elektroforeze i bojenja, umnožene sekvence su pod UV svetlošću u transiluminatoru (*GelDoc XR*, *Bio Rad*, *SAD*) vizuelno identifikovane na gelu kao trake definisane dužine (460 bp). U nastavku je vršena njihova ekstrakcija i prečišćavanje dobijenog PCR proizvoda, u cilju oslobađanja od gela, za šta je korišćen *QIAquick gel extraction kit* (*Quagen*). Posle druge elektroforeze i vizuelizacije u cilju ustanovljavanja uspešnosti prečišćavanja, u toku sekvenciranja kapilarnom elektroforezom je određivan redosled nukleotida u dobijenom i prečišćenom DNK proizvodu. Kapilarna elektroforeza je rađena u uređaju *3130 Genetic Analyzer*, *4 chanel* (*Applied Biosystems*, *SAD*), uz korišćenje optičke mikrotitracione ploče sa uzorcima za elektroforezu, istog proizvođača. U toku rada korišćene su četiri kapilare, kao i polimer POP-7 (*Applied Biosystems*, *SAD*). Dobijeni rezultati obrađeni su korišćenjem „SeqScape“ programa (*Applied Biosystems*, *SAD*). Dve dobijene nukleotidne sekvence svakog uzorka (u oba pravca) najpre su međusobno poravnavane čime je dobijana konsenzus sekvenca, koja je bila predmet dalje analitike. Određivanje genotipa vršeno je korišćenjem analitičkog dela metode EURLP MI-05. Za generisanje ovog dela metode korišćene su referentne sekvence pojedinih genotipova: (G1)AB033407; (G1BC)AY686565; (G2)M84662; (G3)M84663; (G4)M84664; (G5)AB235846; (G6)AB208063; (G7)AB235847; (G8)AB235848; (G10)AF525457. U produktu sekvenciranja ispitivanog uzorka analizirani su kodoni: 16, 18, 20, 84 i 87, a zatim identifikovane aminokiseline koje su kodirane navedenim tripletima. Na osnovu kombinacije definisanih aminokiselina od strane navedenih 5 kodona, identifikovana je vrsta i genotip *E. granulosus* s.l. u ispitivanom uzorku. Takođe, dobijene nukleotidne sekvence ispitivanih uzoraka upoređene su pomoću „BLAST“ pretraživača sa registrovanim sekvencama u Banci gena (*GenBank*). Nukleotidne sekvence genotipova *E. granulosus* s.s. (G1, G2 i G3) analizirane su u cilju ustanovljavanja haplotipova. Patomorfološko, morfometrijsko, parazitološko i molekularno ispitivanje u cilju definisanja genotipova realizovano je u laboratoriji Veterinarskog specijalističkog instituta u Kraljevu, a potvrdna genotipizacija i haplotipizacija u Evropskoj referentnoj laboratoriji za parazite (EURLP) u Rimu.

U poglavlju **Rezultati** navodi se da je patomorološkim i parazitološkim pregledom hidatidoza ustanovljena kod 96 životinja, i to kod: 49 domaćih svinja, 2 divlje svinje, 25 goveda i 20 ovaca, poreklom sa teritorije 20 opština različitih epizootioloških područja u Republici Srbiji. Navodi se da su morfometrijske karakteristike ustanovljenih hidatidnih cista u potpunosti odgovarale načinu gajenja i starosti pregledanih životinja. Kod domaćih i divljih svinja - dominirale su promene u jetri (97,9% životinja), a ustanovljene su i promene u srcu (2,1% domaćih svinja). Kod goveda su dominirale promene u jetri (48,0% životinja), u plućima su bile zastupljene sa 25,0%, a istovremeno u jetri i plućima kod 28,0% životinja. Kod ovaca su preovladavale promene u plućima (52,4% životinja), u jetri (38,1%) i istovremeno u jetri i plućima (9,5% životinja). U **Rezultatima** se navodi da je parazitološkim ispitivanjima najveći procenat fertilnih cista ustanovljen kod ovaca (61,9%), zatim svinja (22,4%) i najmanji kod goveda (8,0%), a vijabilnost je ustanovljena kod 90,9% fertilnih cista domaćih svinja, kod 100% fertilnih cista goveda i kod 61,6% ovaca. Degenerativne ciste su ustanovljene kod svinja i ovaca, a kalcifikovane samo kod ovaca. U poglavlju **Rezultati** navodi se da je u toku

molekularnih ispitivanja analizom DNK sekvence mitohondrijalnog citohrom C-oksidge 1 (cox1) gena, uz korišćenje protokola MI-05 Evropske referentne laboratorije za parazite, u okviru *E. granulosus* s.l. determinisano 2 vrste: *E. granulosus* s.s. i *E. canadensis*, 4 genotipa (G1, G2, G3 i G7) i 7 haplotipova (Hap 1 – Hap 7). Kod domaćih svinja ustanovljen je *E. canadensis*, genotip G7. Kod goveda je determinisano 2 genotipa *E. granulosus* s.s., (G1 i G3). Analizom nukleotidnih sekvenci determinisanih genotipova kod goveda (G1 i G3), ustanovljeno je 5 haplotipova (Hap 1, Hap 2, Hap 4, Hap 5 i Hap 6). U okviru genotipa G1 determinisana su 3 haplotipa: Hap 4 kod 1 životinje (6,7%), Hap 5 kod 7 životinja (46,7%) i Hap 6 kod 1 životinje (6,7%). U okviru genotipa G3 determinisana su 2 haplotipa: Hap 1 kod 2 životinje (13,3%) i Hap 2 kod 4 životinje (26,6%). Kod ovaca je ustanovljeno prisustvo sva tri genotipa *E. granulosus* s.s., (G1, G2 i G3). Analizom nukleotidnih sekvenci determinisanih genotipova ovaca (G1, G2 i G3) ustanovljena su 4 haplotipa (Hap 2, Hap 3, Hap 5 i Hap 7). U okviru genotipa G1 determinisana su 2 haplotipa: Hap 5 kod 22,3% i Hap 7 kod 11,1% životinja. U okviru genotipa G2 determinisan je Hap 3 kod 22,3%, a u okviru genotipa G3 determinisan je Hap 2 kod 33,3% životinja. Kod 2 životinje ustanovljena je mešovita infekcija i genotipova i haplotipova. Kod jedne životinje (5,5%) ustanovljeni su: u plućima genotip G1 (Hap 5) i u jetri G2 (Hap 3). Kod druge životinje (5,5%) ustanovljeni su: u plućima genotip G3 (Hap 2) i u jetri G2 (Hap 3). Kod goveda dva ustanovljena genotipa pokazuju veću genetsku raznovrsnost u okviru 5 haplotipova (71,4%) nego kod ovaca, kod kojih se u okviru tri determinisana genotipa izražava genetska raznovrsnost u okviru 4 haplotipa (57,1%). Od 7 ustanovljenih haplotipova (Hap 1 - Hap 7), dva haplotipa (Hap 2 i Hap 5) su dominantni i ustanovljeni kod 40,4% životinja. Istovremeno, oni su i zajednički haplotipovi kod goveda i ovaca. Sekvence koje su dobijene kod goveda i ovaca, koje pripadaju haplotipu 5 (genotip G1), 100% su identične sa haplotipom koji je globalne svetske rasprostranjenosti. Statistički značajna razlika u zastupljenosti determinisanih haplotipova u okviru pojedinih životinjskih vrsta i genotipova, ustanovljena je jedino kod goveda, u okviru genotipa G1 (Hap 4, Hap 5 i Hap 6), $P=0,0183$ ($p<0,05$).

U poglavlju **Diskusija**, dobijeni rezultati koji se odnose na patomorfološke, morfometrijske i parazitološke karakteristike ispitanih materijala iz hidatidnih cista, ustanovljene genotipove i haplotipove, kao i epizootološke karakteristike hidatidoze kod domaćih i divljih svinja, goveda i ovaca, protumačeni su i poređeni sa rezultatima drugih istraživača koji su se bavili sličnom problematikom.

U poglavlju **Spisak literature** navedene su 132 reference koje su citirane u poglavljima Uvod, Pregled literature, Materijal i metode i Diskusija, a od značaja su za doktorsku disertaciju.

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

1. Patomorfološkim, morfometrijskim i parazitološkim pregledom uzorkovanog materijala hidatidoza je ustanovljena kod 96 životinja (49 domaćih svinja, 2 divlje svinje, 25 goveda i 20 ovaca), poreklom sa teritorije 20 opština iz različitih epizootoloških područja Republike Srbije.
2. Hidatidne promene su dominantno bile lokalizovane u jetri domaćih i divljih svinja (97,9%), u jetri goveda (48,0%) i u plućima ovaca (52,4%).
3. Najveći procenat fertilnih cista dijagnostikovao je kod ovaca (61,9%), degenerativnih cista kod svinja (20,5%), dok su kalcifikovane ciste ustanovljene samo kod ovaca (9,5%). Samo kod goveda sve fertilne ciste (100%) su bile vijabilne, dok je kod domaćih svinja vijabilnost fertilnih cista utvrđena u 90,9%, a kod ovaca u 61,6% slučajeva.
4. Molekularnim ispitivanjima materijala iz hidatidnih cista, poreklom od 52 životinje (15 goveda, 18 ovaca, 17 domaćih i 2 divlje svinje), u okviru *E. granulosus* s.l., determinisane su: 2 vrste (*E. granulosus* s.s. i *E. canadensis*), 4 genotipa (G1, G2, G3 i G7) i 7 haplotipova (Hap 1 - Hap 7).

5. Kod domaćih svinja na teritoriji 6 opština (Nova Crnja, Kikinda, Sremska Mitrovica, Šabac, Vladimirci i Kraljevo) i kod divljih svinja na teritoriji 2 opštine (Bajina Bašta i Kraljevo) ustanovljen je *E. canadensis*, genotip G7.
6. Kod goveda na teritoriji 7 opština (Priboj, Prijepolje, Čajetina, Nova Varoš, Ivanjica, Aleksandrovac i Niš) determinisana su 2 genotipa *E. granulosus* s.s., (G1 - kod 60% i G3 - kod 40% životinja) i 5 haplotipova (Hap 1, Hap 2, Hap 4, Hap 5 i Hap 6).
7. Kod ovaca na teritoriji jugozapadne (Prijepolje i Tutin) i istočne Srbije (Svrljig i Niš) ustanovljeno je prisustvo sva tri genotipa *E. granulosus* s.s. (G1- kod 33,3%, G2 - kod 22,4% i G3 - kod 33,3% životinja) i 4 haplotipa (Hap 2, Hap 3, Hap 5 i Hap 7). Kod 2 ovce na teritoriji opštine Prijepolje ustanovljeno je postojanje mešovite infekcije, na nivou genotipa i haplotipa (genotip G2 - Hap 3 u jetri obe životinje, genotip G1 – Hap 5 u plućima jedne životinje i genotip G3 - Hap 2 kod druge).
8. Dva genotipa ustanovljena kod goveda, pokazuju veći nukleotidni diverzitet i genetsku raznovrsnost (5 haplotipova) u poređenju sa 3 determinisana genotipa kod ovaca, u kojima su zastupljena 4 haplotipa.
9. Od 7 ustanovljenih haplotipova, dva haplotipa (Hap 2 i Hap 5) su dominantni kod 40,4% životinja i zajednički su za goveda i ovce.
10. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u zastupljenosti determinisanih haplotipova u okviru pojedinih životinjskih vrsta i genotipova, ustanovljena je jedino kod goveda, u okviru genotipa G1 (Hap 4, Hap 5 i Hap 6).
11. Sekvence dobijene kod goveda i ovaca koje pripadaju haplotipu 5 (genotip G1), 100% su identične sa haplotipom koji je globalno rasprostranjen u svetu.

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

Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije potpuno su u skladu sa postavljenim ciljevima i zadacima istraživanja, a zaključci koji proizilaze iz dobijenih rezultata postavljeni su pravilno.

VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:

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

Doktorska disertacija je u potpunosti napisana u skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme.

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

Doktorska disertacija sadrži sve bitne elemente i predstavlja originalni naučni rad, čija je tema aktuelna i naučno opravdana.

3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?

Istraživanja sprovedena u okviru doktorske disertacije mr Zorana Debeljaka pružila su značajne podatke o genetskoj varijabilnosti metacestoda *E. granulosus* s.l. u Srbiji, postojećim genotipovima i haplotipovima, njihovoj zastupljenosti kod ispitivanih vrsta životinja i geografskoj distribuciji. Po prvi put u Srbiji su ispitani i determinisani genotipovi kod divljih svinja. U ovoj doktorskoj disertaciji u materijalima iz hidatidnih cista poreklom od goveda i ovaca po prvi put su determinisani haplotipovi u okviru vrste *E. granulosus* s.s. Ustanovljena je njihova zastupljenost kod ispitanih životinjskih vrsta, međusobni odnos, kao i geografska distribucija. Ustanovljeni su zajednički haplotipovi kod goveda i ovaca, kao i njihova podudarnost sa haplotipovima koji su determinisani u različitim delovima sveta. Kod ispitivanih životinja za identifikaciju genotipova metacestoda *E. granulosus* s.l. uspešno su primenjene molekularne metode: lančana reakcija polimeraze i sekvenciranje, po metodologiji EU referentne laboratorije za parazite (MI-05). Originalnost dobijenih rezultata potvrđena je objavljivanjem rada u međunarodnom časopisu kategorije M21.

1 IX PREDLOG:
2

3 Na osnovu ukupne ocene disertacije, Komisija predlaže da se doktorska
4 disertacija prihvati, a kandidatu mr Zoranu Debeljaku odobri odbrana.
5

6
7 DATUM

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

8
9 11.05.2016.

10 1. Dr Zoran Kulišić, redovni profesor,
11 Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
12

13
14 2. Dr Sonja Radojičić, redovni profesor,
15 Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
16

17
18 3. Dr Vlado Teodorović, redovni profesor,
19 Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
20

21
22 4. Dr Tamara Ilić, vanredni profesor,
23 Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
24

25
26 5. Dr Aleksandar Džamić, vanredni profesor,
27 Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu