

IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

I PODACI O KOMISIJI:

1. Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju: 25. 05. 2016. god., Nastavno-naučno veće Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, 168. sednica.

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:

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

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

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

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

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

II PODACI O KANDIDATU:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **Zadaci istraživanja**

S obzirom na cilj istraživanja, postavljeni su sledeći zadaci:

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

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

### **Izolacija i identifikacija uzročnika**

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

### **Određivanje broja somatskih ćelija u mleku (SCC)**

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

## Ekstrakcija DNK iz kulture *Prototheca zopfii*

### Ekstrakcija DNK

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

### PCR

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:**

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

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

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

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

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

Doprinos ove doktorske disertacije je u molekularno genetskoj karakterizaciji izolata *Prototheca zopfii* poreklom iz uzoraka mleka krava uzetih u slučajevima supkliničkih i kliničkih mastitisa na farmama u Republici Srbiji, kao i oceni njihove osetljivosti na antibiotike i antimikotike.

1 IX PREDLOG:

2  
3 Na osnovu ukupne ocene disertacije, komisija predlaže (odabrati jednu od tri  
4 ponuđenih mogućnosti):

5 - da se doktorska disertacija prihvati a kandidatu odobri odbrana

6 - da se doktorska disertacija vrati kandidatu na doradu

7 - da se doktorska disertacija odbije

8  
9  
10 DATUM

11 Beograd, 13.06.2016.

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

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

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

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

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

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