

IZVEŠTAJ O OCENI ZAVRŠENE DOKTORSKE DISERTACIJE

I PODACI O KOMISIJI:

1. **Datum i naziv organa koji je imenovao komisiju:** 25. V 2016. godina, 168. Sednica Nastavno naučnog veća Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

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

2. Dr Dušan Mišić, vanredni profesor, Mikrobiologija sa imunologijom, 2014. godina, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

3. Dr Dušan Lalošević, redovni profesor, 2010. godina, Histologija i embriologija, Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu

4. Dr Igor Stojanov, viši naučni saradnik, Mikrobiologija sa imunologijom, 2012. godina, Naučni institut za veterinarstvo Novi Sad

II PODACI O KANDIDATU:

1. **Ime, ime jednog roditelja, prezime:** Ivan Miroslav Pušić

2. **Datum rođenja, opština, Republika:** 28. XII 1970, Zrenjanin, Republika Srbija

3. **Datum odbrane, mesto i naziv magistarske teze*:** 29. XII 2005. godine, Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela Veterinarski fakultet u Beogradu „**Epizootiološke karakteristike Morbus Aujeszky (MA) na području Vojvodine i pojava bolesti kod mesojeda**”

4. **Naučna oblast iz koje je stečeno akademsko zvanje magistra nauka*:** Zarazne bolesti životinja, epizootiologija

III **NASLOV DOKTORSKE DISERTACIJE:** „**Izolacija, identifikacija i molekularna karakterizacija uzročnika tuberkuloze goveda u Vojvodini**“

IV **PREGLED DOKTORSKE DISERTACIJE (navesti broja strana poglavlja, slika, šema, grafikona i sl.):** Doktorska disertacija magistra Ivana Pušića napisana je na ukupno 192 strane kompjuterski obrađenog teksta i sadrži sledeća poglavlja: Uvod (3 strane), Pregled literature (68 strana), Cilj i zadaci istraživanja (2 strane), Materijal i metode (12 strana), Rezultati (45 strana), Diskusija (24 strane), Zaključci (2 strane), Literatura (25 strana). Na početku disertacije dat je karatak sadržaj na srpskom i engleskom jeziku kao i sadržaj doktorske disertacije, a na kraju se nalazi prilog foto dokumentacije, biografija i izjave. Rad je dokumentovan sa 39 tabela, 12 grafikona i 11 kartograma. Spisak literature čini 248 bibliografskih jedinica od kojih je najstarija publikovana 1947. godine, a najnovija 2016. godine.

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 navodi da pojam „tuberkuloza“ označava kliničku ili patološku dijagnozu koja se po prihvaćenim kriterijumima odnosi na klinički manifestne promene i lezije koje izazivaju bakterije iz kompleksa *Mycobacterium tuberculosis* (MTB-kompleks). Kandidat ukazuje da su dva

1 najpoznatija i najznačajnija člana ovog kompleksa *M. bovis* i *M. tuberculosis*, koji iako
2 genetski skoro identični (99,95% podudarnosti), poseduju i značajne biološke razlike. Kao
3 univerzalni patogen među mikobakterijama, *M. bovis* ima najširi spektar prijemljivih vrsta
4 životinja, uključujući i ljude, kod kojih dovodi do hronične progresivne bolesti. Gotovo čitav vek
5 organizovano i sistematsko suzbijanje tuberkuloze goveda predstavlja cilj stručnjaka različitih
6 specijalnosti kao i državnih oragana u čitavom svetu. Bez obzira na uložene napore i
7 izdvajanje znatnih finansijskih sredstava, eradicacija tuberkuloze kod goveda u velikom broju
8 zemalja se pokazala kao teško dostižan cilj. Tako i danas, u mnogim zemljama širom sveta,
9 tuberkuloza goveda, koza i farmški gajenih jelena nanosi velike ekonomske gubitke, a
10 poslednjih godina, prevalencija bolesti kod goveda u Evropi pokazuje tendenciju rasta.

11 Tuberkuloza goveda i danas ima veliki socio-ekonomski značaj zato što ugrožava javno
12 zdravlje, angažuje značajne materijalne resurse za dijagnostikovanje i iskorenjivanje, ometa i
13 ograničava slobodnu trgovinu životinjama i animalnim proizvodima. Nedostatak podataka o
14 prevalenciji *M.bovis*, *M.caprae* i drugih zoonoznih mikobakterija kod obolelih ljudi umanjuje
15 mogućnost pouzdane procene antropozoonoznog rizika, naročito u zemljama u razvoju.
16 Veruje se da je pre široke primene pasterezacije mleka, između 20-40% slučajeva tuberkuloze
17 ljudi bilo posledica infekcije vrstom *M.bovis*, najčešće kao posledica konzumacije termički
18 neobrađenog mleka i mlečnih proizvoda. Mnogi pokazatelji ukazuju da će zbog HIV infekcije i
19 drugih hroničnih bolesti sa elementima pandemije, tuberkuloza predstavljati sve veću pretnju
20 za zdravlje ljudi, naročito u delovima sveta gde je enzootski prisutna kod domaćih ili divljih
21 životinja, koje su u bliskom kontaktu sa ljudima. Poseban problem predstavlja razvoj
22 multirezistentnih sojeva, otpornih na veliki broj antituberkuloznih antibiotika, što je naročito
23 karakteristično za *M.bovis* izolovanu iz obolelih ljudi.

25 Tuberkuloza goveda postaje ponovo aktuelna, pre svega zbog porasta incidencije i
26 prevalencije infekcije u pojedinim razvijenim zemljama, kao i zbog trenda povećanja broja
27 ljudi obolelih od tuberkuloze širom sveta. Ovo je dovelo do novih otkrića u oblasti molekularne
28 epizootologije i epidemiologije, etiologije i patogeneze ovog oboljenja. Primenom različitih
29 molekularnih metoda dijagnostike i kreiranjem međunarodnih baza podataka, danas je
30 moguće pratiti globalnu filogeografiju MTB-kompleksa, analizirati međusobnu povezanost
31 pojedinih žarišta i puteve intra i interspecijskog širenja infekcije i porediti podatke na
32 evolutivnom filogenetskom stablu. Iako je epizootiološka situacija tuberkuloze goveda u Srbiji
33 relativno povoljna, zbog postojanja žarišta tuberkuloze u pojedinim regionima, sprovođenje
34 programa kontrole i suzbijanja bolesti, mora biti nastavljeno, a sticanje statusa države
35 slobodne od tuberkuloze goveda trebalo bi da bude krajnji cilj i našoj zemlji.

37 U poglavlju **Pregled literature** navodi se da je taksonomija i nomenklatura uzročnika
38 tuberkuloze ljudi i drugih vrsta sisara, heterogene grupe sojeva ili vrsta mikobakterija danas
39 svrstanih u tzv. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, izvor konfuzije već više od jednog
40 veka. Kandidat ukazuje da se prvi opis i taksonomska studija "neuobičajenog" člana *M.*
41 *tuberculosis* kompleksa prvobitno nazvanog *M. tuberculosis subsp. caprae*, a kasnije *M. bovis*
42 *subsp. caprae* u stručnoj literaturi objavljeni ne tako davne, 1999. godine. Mikobakterije koje
43 su izolovane iz patološkog materijala poreklom od koza imale su jasno izražene kulturne,
44 genetske i epizootiološke karakteristike koje su ih izdvajale od ostalih "klasičnih" članova
45 kompleksa. Sojevi koji su prvobitno izolovani iz koza, pokazivali su genetske karakteristike
46 koje se ne sreću kod drugih izolata *M. bovis*. Metodom spoligotipizacije ustanovljeno je da im
47 nedostaju karakteristične kratke oligonukleotidne sekvence (takozvani spejseri), a poseduju
48 divlji tip alela pirazinamidaza *pncA* gena, što je karakteristično za *M. tuberculosis* uz
49 specifičnu kombinaciju polimorfizma u pseudogenu *oxyR*, katalaza (*katG*), i giraza (*gyrA* i
50 *gyrB*) genima i nedavno opisan specifičan polimorfizam u *lepA* genu. Prema najnovijoj
51 literaturi, sada se u MTB-kompleks ubrajaju *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium*
52 *bovis*, *M. bovis* Bacillus Calmette i Guérin, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*,

Mycobacterium canettii, *Mycobacterium pinnipedii* i *Mycobacterium caprae*, Nedavno su predložena dva nova člana kompleksa: oriks bacil uzročnik tuberkuloze afričkog bivola i antilopa za koga je preporučen naziv *Mycobacterium orygis* i patogena mikobakterija izolovana iz mungosa *Mycobacterium mungi*. Detaljno i na interesantan način, kandidat u više podpoglavlja opisuje istorijat, etiologiju, epizootiologiju, patogenezu, kontrolu i eradikaciju, dijagnostiku i molekularnu epizootiologiju tuberkuloze.

U poglavlju **Cilj i zadaci istraživanja** navedeno je da su oni obuhvatili izolaciju, bakteriološku identifikaciju i molekularnu karakterizaciju kompleksa *Mycobacterium tuberculosis* uzročnika tuberkuloze goveda u Vojvodini. Pored toga, cilj je bio i utvrđivanje osetljivosti izolovanih sojeva na odabrane antituberkulozne antibiotike koji se koriste u terapiji tuberkuloze ljudi u našoj zemlji, kao i uporedno ispitivanje osetljivosti i specifičnosti γ -IFN testa u dijagnostici tuberkuloze sa klasičnim mikrobiološkim metodama izolacije i identifikacije uzročnika. Na osnovu podataka o raznolikosti klastera odnosno sojeva koji su prisutni u našoj zemlji biće moguće utvrditi i međusobnu vezu sa sojevima i genotipovima klasifikovanim na osnovu molekularnih karakteristika u susednim zemljama i Evropi. Dobijeni podaci će poslužiti za formiranje epizootioloških karti sa utvrđenom prevalencijom i incidencijom oboljenja kod goveda u Vojvodini.

Za ostvarenje postavljenih ciljeva ove doktorske disertacije definisani su sledeći zadaci:

1. Da se izvrši izolacija, identifikacija i molekularna karakterizacija uzročnika tuberkuloze goveda u Vojvodini
2. Da se ispita osetljivost izolovanih sojeva na antituberkulozne antibiotike (etambutol, streptomycin, rifampicin, izoniazid) koji se koriste u terapiji ljudi u našoj zemlji
3. Da se izvrši uporedno ispitivanje osetljivosti i specifičnosti γ -IFN testa u odnosu na komparativni intradermalni tuberkulinski test i druge klasične metode dijagnostike tuberkuloze
4. Da se izradi epizootiološka karta sa utvrđenom incidencijom i prevalencijom oboljenja kod goveda u Vojvodini

U poglavlju **Materijal i metode** navodi se da su za potrebe ovog ispitivanja korišćeni uzorci poreklom od sedamdeset jednog govečeta iz 25 gazdinstava u Vojvodini (lociranih u Južnobačkom i Sremskom okrugu). Sva goveda su poticala iz zapata lociranih u 4 opštine Južnobačkog okruga i dve opštine u Sremskog okruga. Ispitivana goveda bila su većinom ženskog pola, različite starosti (počevši od 12 meseci života). Izabrana grla su prilikom tuberkulinizacije, koju je izvodila nadležna veterinarska služba, pokazala sumnjivu ili pozitivnu reakciju na tuberkulin B. Metoda tuberkulinizacije i komparativne intradermalne tuberkulinizacije (retuberkulinizacija) uz simultano aplikovanje tuberkulina B i tuberkulina A, vršena je na gazdinstvima na kojima su goveda uzgajana. Sva goveda podvrgnuta retuberkulinizaciji su prilikom tuberkulinizacije, sprovedene od strane nadležne veterinarske službe, pokazala sumnjivu ili pozitivnu reakciju na tuberkulin B. Između tuberkulinizacije i retuberkulinizacije kod svih životinja proteklo je minimalno 50, a maksimalno 70 dana. Patomorfološki pregled trupova pozitivnih goveda, poslatih na sanitarno klanje izvršeno je u četiri klanice koje su tokom perioda istraživanja bile određene za prijem ovih grla od strane Uprave za veterinu, Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije. Patomorfološki pregled jednog uginulog goveda izvršen je u terenskim uslovima, neposredno pored jame grobnice. Prilikom pregleda trupova i organa zaklanih goveda, uzorkovana su tkiva sa promenama karakterističnim za tuberkulozu. Kod goveda kod kojih prilikom patomorfološkog pregleda nisu ustanovljene makroskopski vidljive promene, uzorkovani su retrofaringealni, medijastinalni, cervikalni i bronhijalni limfni čvorovi. Za tuberkulinizaciju su korišćeni Tuberkulin B i Tuberkulin A proizvođača Veterinarski Zavod Zemun.

1 Uzorci pune krvi sa heparinom kao antikoagulansom, od ukupno 71 životinje su uzeti
2 aseptičnom punkcijom *v.jugularis* i transportovani u laboratoriju u roku 6-8 časova od
3 uzorkovanja. Za izvođenje γ interferon testa korišćen je komercijalni Bovigam-gama interferon
4 set kit za goveda (*Prionics*, Švajcarska).

5 Izolacija i mikrobiološka identifikacija vršena je iz materijala prikupljenog od ukupno 49
6 zaklanih i uginulih goveda (limfni čvorovi i delovi plućnog tkiva). Uzorci su čuvani na
7 temperaturi frižidera (6-8°C) i u roku od 24-48h dostavljeni u Laboratoriju za mikobakterije
8 Instituta za plućne bolesti Vojvodine u Sremskoj Kamenici. Izolacija mikobakterija iz uzoraka
9 vršena je primenom standardnih kulturelnih metoda ispitivanja za mikobakterije. Obrađeni
10 uzorci su uz prethodnu dekontaminaciju pregledani i na prisustvo acidorezistentnih bacila
11 (ARB) mikroskopskim pregledom obojenog razmaza po Ziehl-Neelsenu (Z-N).

12 Spoligotipizacija je rađena na Medicinskom fakultetu u Innsbuku, Austrija, Katedra za
13 mikrobiologiju, higijenu i socijalnu medicinu (Dept. für Hygiene, Mikrobiologie und
14 Sozialmedizin Sektion Hygiene und Medizinische Mikrobiologie Medizinische Universität
15 Innsbruck). Genomska DNK za izvođenje metode lančane reakcije polimeraze (PCR)
16 dobijena je iz izolata mikobakterija uzgajanih na podlozi po Levenštajn-Jensenu; dve eze
17 izolata prenete su u Eppendorf mikrotube i resuspendovane u 200 μ l 1xTris-EDTA pufera.
18 Ovako pripremljene bakterije inkubirane su 15 minuta na temperaturi od 90°C. Minitube sa
19 suspenzijom su nakon toga centrifugirane na 13000 rpm 2 minuta. Posle odbacivanja
20 supernatanta, zaostali talog je resuspendovan u 500 μ l 150mM NaCl. Ovaj postupak je
21 ponovljen dva puta. Konačno dobijeni talog resuspendovan je u 25 μ l 1xTris-EDTA za dalje
22 ispitivanje.

23
24 Metod spoligotipizacije zasnovan je na PCR amplifikaciji DR (direct repeat) lokusa i njihovoj
25 hibridizaciji sa membranom koja sadrži set od 43 kovalentno vezana oligonukleotida (eng.
26 *spacer sequences*) koji potiču od *M. tuberculosis* referentnog soja H37Rv (37 kratkih
27 oligonukleotidnih sekvenci) i *M. bovis* BCG soja P3 (6 kratkih oligonukleotidnih sekvenci).
28 Razlike u spoligotipnom obrascu nastaju kao posledica delecije direktno ponavljajućih
29 varijabilnih sekvenci (eng. *direct variable repeats*) u DR regionu bakterijske DNK. Sve
30 spejser-oligonukleotidne sekvence su spojene sa 5' terminalnom aminogrupom, pomoću koje
31 se mogu kovalentno vezati za aktiviranu membranu. Amplifikacija spejsera postignuta je
32 upotrebom prajmera DRa i DRb, što je omogućilo amplifikaciju celokupnog DR regiona. U
33 doktorskoj disertaciji prikazan je detaljan opis PCR hibridizacije i detekcije. Za proveru i
34 poređenje dobijenih spoligotipova dobijenih izolata korišćene su dve relevantne baze
35 podataka: www.mbovis.org i http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE, u
36 kojima je unošenjem binarnog koda, poređen spoligotipni obrazac izolata sa spoligotipovima
37 koji su do sada prijavljeni i dostupni u ovim bazama podataka. Na ovaj način bilo je moguće
38 proveriti dobijene spoligotipove u smislu identifikacije vrste MTB-kompleks izolata, odnosno
39 klastera, međunarodnog kodiranja i utvrditi raširenost datog spoligotipa u regionu i šire.
40 Vebsajt www.mbovis.org i baza podataka pokrenuti su u cilju međunarodne standardizacije
41 nomenklature u molekularnoj genotipizaciji *Mycobacterium bovis* sojeva. U bazi se prikupljaju
42 podaci o svim sojevima koji ne pripadaju *Mycobacterium tuberculosis sensu stricto*, a
43 definisani su kao sojevi *M.tuberculosis* kompleksa kojima nedostaje hromozomski region
44 RD9. U bazu su uključeni podaci o spoligotipnim obrascima dobijenim od izolata *M. africanum*
45 (Zapadnoafrički tip), *M. microti* sojeva povezanih sa oboljenjem kod lama, zatim
46 *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov, povezan sa infekcijom koza i goveda kao i
47 spoligotipovi klasičnih sojeva *M.bovis*.

1 Baza podataka http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE, obezbeđena je od
2 strane Pasterovog zavoda iz Gvadalupe, Francuska i sadrži izveštaje o ukupno 7105
3 spoligotipnih obrazaca (što odgovara 58,180 kliničkih izolata) grupisanih u 2740 zajedničkih
4 tipova odnosno međunarodnih spoligotipova (eng. *spoligotype international types* -SIT) i 4364
5 zasebnih spoligotipnih obrazaca.

7 Za histopatološka ispitivanja uzorci limfnih čvorova i pluća su fiksirani u 10% neutralnom
8 formalinu u trajanju od 48-72 časa. Posle fiksacije, tkivo je obrađivano u automatskom
9 tkivnom procesoru (dehidracija kroz seriju alkohola, prosvetljavanje u ksilolu, impregnacija
10 parafinom) i uklopljeno u parafinske blokove. Parafinski isecci dobijeni sečenjem u
11 mikrotomu, debljine 3 do 5µm bojeni su hematoksilin-eozinom (HE) i posmatrani pod
12 mikroskopom. Ispitivanja su vršena u laboratoriji za patološku morfologiju Naučnog Instituta
13 za veterinarstvo Srbije u Beogradu i laboratoriji za patološku morfologiju Departmana za
14 veterinarsku medicinu, Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu.

15 Ispitivanje osetljivosti izolovanih sojeva mikobakterija na antituberkulozne antibiotike vršeno je
16 primenom standardne metode proporcija koji je i „zlatni standard“ (Centers for Disease
17 Control and Prevention, USA-CDC). Osetljivost izolovanih sojeva ispitana je na kritične
18 koncentracije antimikrobnih sredstava: izonijazid (H) 0,2 µg/ml, rifampicin (R) 40,0 µg/ml,
19 etambutol (E) 2,0 µg/ml i streptomycin (S) 4,0 µg/ml podloge. Rezultati testa osetljivosti
20 očitavani su nakon inkubacije od 4 nedelje na 37°C. Zavisno od porasta ispitivanog izolata na
21 podlozi sa inkorporisanim antibiotikom u poređenju sa porastom soja na kontrolnim
22 podlogama bez antibiotika, izolat je klasifikovan u dve terapijske kategorije: osetljiv (S) i
23 rezistentan (R).

24 Kao materijal korišćeni su i godišnji epizootiološki izveštaji i drugi epizootiološki podaci
25 dobijeni od Veterinarskih specijalističkih instituta "Zrenjanin", "Pančevo", "Sombor", "Subotica"
26 i Naučnog instituta za veterinarstvo "Novi Sad", terenski epizootiološki zapisnici, zapisnici
27 Republičke veterinarske inspekcije kao i izveštaj Odseka za obeležavanje i registraciju
28 životinja-Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine.

30 Poglavlje **Rezultati** sistematizovano je prema postavljenim zadacima ispitivanja. Na prisustvo
31 bakterija MTB-kompleksa ispitani su uzorci tkiva (pluća i limfni čvorovi) od 49 goveda koja su
32 prilikom izvođenja komparativnog tuberkulinskog testa imali pozitivnu reakciju; kod 40 grla
33 prilikom patomorfološkog pregleda na liniji klanja su ustanovljene promene koje mogu
34 ukazivati na tuberkulozu. Direktnim mikroskopskim pregledom preparata obojenih po Ziehl-
35 Neelsen-u, prisustvo acidorezistentnih štapićastih bakterija (ACR) ustanovljeno je u uzorcima
36 tkiva 14 goveda (28,6%). Kultivacijom na podlogama po Löwenstein-Jensen-u, iz uzoraka
37 tkiva 19 (38,7%) goveda izolovane su bakterije MTB-kompleksa. Kod 4 jedinke u uzorcima
38 limfnih čvorova ustanovljeno je prisustvo acidorezistentnih bakterija, ali izolacija nije uspeła
39 usled kontaminacije ili drugih razloga. Izolovane bakterije su na osnovu fenotipskih
40 karakteristika i primenom standardnih biohemijskih testova identifikovane do nivoa vrste. Svi
41 izolati su na osnovu biohemijskih karakteristika svrstani u vrstu *M. bovis*. Metodom PCR
42 spoligotipizacije u cilju detekcije i genotipizacije *M. tuberculosis kompleks* bakterija ispitano je
43 18 izolata mikobakterija kod kojih je postupak ekstrakcije DNK bio uspešan. Sva ispitivana
44 goveda su poticala iz individualnih gazdinstava (ukupno 16), lociranih u četiri opštine
45 Južnobačkog okruga i jednoj Sremskog okruga. Rezultati spoligotipizacije kod svih izolata
46 poreklom od goveda iz Južnobačkog i Sremskog okruga pokazivala su odsustvo spejsera 1 i
47 niza spejsera od 3 do 16, kao i spejsera 28 što je karakteristično za *Mycobacterium caprae*.
48 Odsustvo spejsera 28, i niza spejsera od 39 do 43, kod svih izolata ukazuje da pripadaju
49 istom klasteru, odnosno imaju „klasičan“ *Mycobacterium caprae* S1 spoligotip. Dobijeni
50 podaci binarnog koda automatski su upoređeni sa već postojećim podacima unetim u
51 spoligotipnu bazu podataka na adresi www.mbovis.org i dobijene su internacionalno
52 merodavne oznake spoligotipnog obrasca odnosno klastera naših izolata. Svaki spoligotipni

1 obrazac dobija jedinstveni SB broj, oktalnu i Hex code oznaku uz identifikaciju vrste MTB-
2 kompleksa kojoj pripada.

3 Nakon unošenja binarnog spoligotipnog koda naših izolata u bazu podataka dobijena je
4 spoligotipna oznaka SB0418 i Hexcode 20-00-1F-7E-FF-60. Prema informacijama dostupnim
5 u ovoj bazi podataka izolati su identifikovani kao *M. caprae*, a izolati identičnog spoligotipa
6 ustanovljeni su u Belgiji. Binarni kod naših izolata automatski je upoređen i sa podacima
7 prisutnim u 2012. SITVIT WEB Database, najvećoj svetskoj bazi podataka o genotipskim
8 markerima (spoligotipovi, MIRU, VNTR) za *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, na adresi
9 http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE. Prema podacima generisanim u
10 SITVIT bazi, izolati *M. caprae*, spoligotipnog obrasca ST 647, pored naše zemlje ustanovljeni
11 su u periodu od 1995. godine do danas još u Austriji, Belgiji, Češkoj, Nemačkoj, Francuskoj,
12 Velikoj Britaniji, Hrvatskoj, Mađarskoj, Italiji, Holandiji, Hondurasu i Ukrajini.

13 Osetljivost na antituberkulozne lekove (etambutol, rifampicin, izoniazid i streptomycin) koji se u
14 našoj zemlji najčešće primenjuju u terapiji ljudi obolelih od tuberkuloze, ispitana je kod 5 od
15 ukupno 19 dobijenih izolata. Svi izolati dobijeni su kultivacijom iz organa i tkiva na kojima su
16 bile uočljive karakteristične tuberkulozne lezije. Izolati su poticali od goveda iz pet zapata sa
17 teritorije četiri opštine Južnobačkog i jedne opštine u Sremskom okrugu. Ustanovljeno je da
18 su svi izolati bili osetljivi na etambutol, streptomycin, rifampicin i izoniazid.

19 Rezultati patomorfološkog pregleda ukazuju da su kod najvećeg broja tuberkuloznih goveda
20 kod kojih su bile prisutne makroskopski vidljive lezije one bile lokalizovane na limfnim
21 čvorovima, i to najčešće medijastinalnim 27 (67,5%), bronhijalnim 19 (47,5%) i
22 retrofaringealnim 15 (37,5%), dok su promene na plućnom tkivu uočene kod 11 (27,5%) od
23 ukupno 40 grla sa ustanovljenim patomorfološkim promenama. Od 8 grla kod kojih su
24 ustanovljene samo pojedinačne promene kod 5 grla promene su bile lokalizovane na
25 medijastinalnim i retrofaringealnim limfnim čvorovima, kod dva na medijastinalnim, a kod
26 jednog grla tuberkulozne lezije ustanovljene su na mezenterijalnim limfnim čvorovima crevne
27 ploče.

28 Na prisustvo karakterističnih tuberkuloznih lezija pregledani su isecci tkiva poreklom od 40
29 goveda koja su bila pozitivna na komparativnom intradermalnom tuberkulinskom testu ili
30 paralelno i na γ -interferon testu. Kod ovih grla su prilikom patomorfološkog pregleda uočene
31 promene koje su kompatibilne sa tuberkulozom, a pregledom su obuhvaćeni limfni čvorovi i/ili
32 delovi pluća. Za svako grlo dobijeni rezultat je označen kao pozitivan, negativan ili nejasan.
33 Rezultati patohistološkog ispitivanja pokazali su kod 36 grla pozitivan patohistološki nalaz na
34 tuberkulozu. Kod pozitivnih grla ustanovljene su sledeće patohistološke dijagnoze:
35 *Lymphadenitis tuberculosa*, *Lymphadenitis caseosa tuberculosa*, *Lymphadenitis caseosa*
36 *tuberculosa et partim calcificata*, *Tuberculosis fibro-caseosa et calcificata pulmonum*,
37 *Pneumonia caseosa tuberculosa*, *Tuberculosis miliaris pulmonum*.

38 Kod 4 grla, nisu ustanovljene patohistološke promene karakteristične za tuberkulozu, pri
39 čemu su u materijalu poreklom od dva grla ustanovljeni znaci gnojnog bronhitisa i
40 bronhopneumonije sa obilnim peribronhijalnim limfocitnim infiltratom i hiperplazijom limfnog
41 tkiva, koja je bila okružena nespecifičnim zapaljenskim infiltratom. Ovakav patohistološki
42 nalaz odgovarao je nespecifičnoj bronhopneumoniji. Kod dva goveda pregledom isečaka
43 pluća na kojima su makroskopski ustanovljene tvrde čvoraste mase, histološki je ustanovljena
44 narušena struktura usled prisustva prostranih ognjišta u kojima su bile vidljive nematodne
45 larvice, prisustvo makrofaga i velikog broja granulocita uz obilje eozinofila, što odgovara
46 verminoznoj pneumoniji.

47 Nakon sprovedene tuberkulinizacije uz primenu bovinog tuberkulina (monotest), od strane
48 nadležne veterinarske službe, goveda kod kojih je utvrđena sumnjiva ili pozitivna
49 tuberkulinska reakcija, po isteku 50 do 60 dana ponovo su tuberkulinisana primenom
50 komparativnog tuberkulinskog testa uz prethodno uzorkovanje krvi za γ -IFN test. Tokom
51 dijagnostičkog ispitivanja metodom pojedinačnog testa tuberkulinom B, pozitivna reakcija
52 ustanovljena je kod 51 grla (71,8%), a sumnjiva kod 20 (28,2%). Komparativnim

tuberkulinskim testom uz simultanu aplikaciju avijarnog i bovinog tuberkulina kod istih goveda pozitivna reakcija utvrđena je kod 48 grla (67,6%), a negativna kod 14 (19,7%). Kod 7 (9,9%) grla ustanovljena je sumnjiva reakcija, dok je kod 2 (2,8%) goveda reakcija protumačena kao nespecifična, odnosno pozitivna na avijarni tuberkulin. Primenom *M.bovis* γ -IFN testa u 42 (59,1%) pregledana uzorka krvi goveda ustanovljene vrednosti ukazivale su na infekciju sa *M.bovis*, u 6 (8,5%) uzoraka krvi ustanovljena je sumnjiva reakcija, odnosno granična *cut off* vrednost, a 21 (29,6%) uzorak je bio negativan. Distribucija rezultata komparativnog tuberkulinskog testa i γ -IFN testa analizirana posebno za svaki ispitivani uzorak bila je sledeća: 67,6% goveda bilo je pozitivno na komparativnom tuberkulinskom testu, dok je 59,1% bilo pozitivno na γ -IFN testu. Procenat sumnjivih reakcija na γ -IFN testu i komparativnom tuberkulinskom testu neznatno se razlikovao 8,4% naspram 9,9%. Ukupno 2 (2,8%) goveda su bila pozitivna na avijarni tuberkulin pri izvođenju γ -IFN testa, dok su takođe 2 grla imala pozitivnu reakciju na avijarni tuberkulin pri izvođenju komparativne tuberkulinizacije.

U slučaju tumačenja svih sumnjivih reakcija kao pozitivnih, a reakcije na avijarni tuberkulin kao negativne, procenat pozitivnih reaktora za komparativni tuberkulinski test iznosio je 77,4%, a za γ -IFN test 67,6%.

Izračunavanje podudarnosti dobijenih rezultata ispitivanja reakcije kasne preosetljivosti sa dva dijagnostička testa komparativnom tuberkulinizacijom i γ -IFN testom, izvršeno je uz pomoć *Kappa statističke analize* (κ). Ukupna podudarnost oba testa iznosila je 0,79; odnosno saglasnost rezultata oba testa ustanovljena je u 78,8% ispitanih grla, pri čemu je ustanovljen visok nivo proporcije pozitivne podudarnosti $r = 0,85$, dok je utvrđena proporcija saglasnosti negativnog nalaza bila $r = 0,62$ (CI 95%). *Kapa statističkom* analizom dva poređena dijagnostička testa dobijena je vrednost $\kappa = 0,48$ što ukazuje na umerenu (srednju) saglasnost testova.

U periodu od 2010. do 2015. godine u Vojvodini je dijagnostičkom ispitivanju na tuberkulozu metodom intradermalne tuberkulinizacije PPD tuberkulinom B bilo podvrgnuto ukupno 1.515.863 goveda. Broj registrovanih gazdinstava na kojima su uzgajana goveda na teritoriji Vojvodine u posmatranom periodu varirao je između 18.500-19000. U 2015-oj godini ukupan broj aktivnih gazdinstava na kojima su se uzgajala goveda u Vojvodini iznosio je 18.619, od čega je 2262 zapata goveda bilo locirano na teritoriji Južnobanatskog epizootiološkog područja (VSI "Pančevo"), 4269 zapata bila su registrovana na teritoriji Srednjobanatskog i Severnobanatskog epizootiološkog područja (VSI „Zrenjanin“), 2912 gazdinstava bilo je smešteno na teritoriji Zapadnobačkog epizootiološkog područja (VSI „Sombor“), a 2966 zapata goveda na teritoriji Severnobačkog epizootiološkog područja (VSI „Subotica“). Na epizootiološkom području koje je pod nadzorom NIV „Novi Sad“, bilo je ukupno registrovano 6210 gazdinstava na kojima su uzgajana goveda, od čega 2586 u Južnobačkom okrugu i 3624 u Sremskom okrugu. U analiziranom periodu pozitivna reakcija je ustanovljena kod 204 (0,013%) grla od ukupno ispitanih 1.515.863. Tokom 2010. godine od ukupno tuberkulinisanih 247.044 goveda pozitivna reakcija ustanovljena je kod 31 (0,013%), pri čemu su 3 pozitivna grla ustanovljena na teritoriji Zapadnobačkog okruga u 2 zapata goveda, a 28 pozitivnih grla na teritoriji Južnobačkog okruga u 14 različitih gazdinstava. U 2011. godini od ukupno 258.019 tuberkulinisanih goveda pozitivna reakcija ustanovljena je kod 33 (0,013%), od čega su 3 pozitivna grla dijagnostikovana na teritoriji Severnobačkog okruga u dva gazdinstva, 14 na teritoriji Zapadnobačkog u tri zapata, a 16 Južnobačkog okruga u 12 zapata goveda. U 2012. godini od ukupno ispitanih 256.712 životinja pozitivna tuberkulinska proba bila je ustanovljena kod 45 (0,018%) grla, od čega je po 1 pozitivno grlo bilo ustanovljeno u Severnobačkom i Južnobanatskom okrugu, 4 u Srednjobanatskom okrugu u tri zapata, 11 u Zapadnobačkom okrugu u 4 zapata, a 28 u Južnobačkom okrugu u 14 zapata goveda. U 2013. godini, od ukupno tuberkulinisanih 248.520 goveda, pozitivna su bila 42 (0,017%) grla, od toga po 1 pozitivno grlo ustanovljeno je u Severnobačkom, Sremskom i Severnobanatskom okrugu, 12 u Zapadnobačkom okrugu u tri gazdinstva, a 27 pozitivnih

1 ustanovljeno je u Južnobačkom okrugu u 15 gazdinstava. Tokom 2014. godine primenom
2 metode tuberkulinizacije ispitano je 252.938 goveda, pri čemu je ustanovljeno 35 (0,014%)
3 pozitivnih grla. Pozitivna grla ustanovljena su samo na teritoriji Zapadnobačkog (17) u 4
4 gazdinstva i Južnobačkog (18) okruga u 14 gazdinstava. U 2015. godini od ukupno ispitanih
5 252.630 goveda, pozitivna tuberkulinska reakcija ustanovljena je kod 18 grla (0,007%), a
6 pozitivna grla bila su utvrđena na teritoriji Zapadnobačkog (6) u 2 zapata i Južnobačkog (12)
7 epizootiološkog područja u 9 zapata. Analizom ispitivanog perioda od 6 godina može se
8 zaključiti da je incidencija tuberkuloze na nivou celokupnog stada goveda u Vojvodini stabilno
9 niska. U posmatranom periodu od 2010-2015. godine incidencija na nivou obolelih jedinki nije
10 znatnije varirala i kretala se u rasponu od minimalnih 0,007% u 2015. do maksimalnih 0,018%
11 u 2012. godini. Budući da svi otkriveni slučajevi u toku godine, zapravo predstavljaju nove
12 slučajeve, jer se na osnovu Pravilnika o utvrđivanju mera za rano otkrivanje, dijagnostiku,
13 sprečavanje širenja, suzbijanje i iskorenjivanje zarazne bolesti tuberkuloza goveda, načinu
14 njihovog sprovođenja, kao i načinu utvrđivanja statusa gazdinstva slobodnog od tuberkuloze
15 goveda („Sl. Glasnik RS“ br. 51/09), sva test pozitivna grla smatraju zaraženim i uklanjaju u
16 roku od 30 dana od postavljanja dijagnoze, dobijeni rezultati predstavljaju apsolutnu
17 incidenciju oboljenja na nivou inficiranih jedinki.

18 Po broju pozitivnih reaktora, u ispitivanom periodu ističu se dva epizootiološka regiona:
19 Zapadnobački sa 63 (30,88%) od ukupno 204 tuberkuloznih goveda i Južnobački u kome je
20 dijagnostikovano 129 (63,24%) test pozitivnih grla. Sva tuberkulozna grla u Zapadnobačkom
21 okrugu poticala iz ukupno 9 različitih zapata lociranih na teritoriji tri opštine (Bačka Topola,
22 Sombor i Kula), u kojima su pozitivni reaktori registrovani intermitentno u toku ispitivanog
23 perioda. Sličan trend prisutan je i u Južnobačkom okrugu, gde se tuberkuloza više godina
24 intermitentno javlja u oko 45% od ukupnog broja pozitivnih zapata u posmatranom periodu. U
25 ostalim epizootiološkim područjima registrovani su pojedinačni slučajevi, bez tendencije
26 ponavljanja. Prevalencija je određivana na nivou inficiranih zapata, odnosno predstavljala je
27 broj zapata koji su u toku godine bili pod merama restrikcije usled pojave tuberkuloze u
28 odnosu na ukupan broj testiranih zapata. U posmatranom periodu procenat inficiranih zapata
29 kretao se od 0,06-0,012% od ukupnog broja registrovanih gazdinstava za uzgoj goveda na
30 teritoriji Vojvodine.

31
32 U poglavlju **Diskusija**, sumirajući celokupne rezultate istraživanja, kandidat ukazuje da po
33 prvi put dokazno prisustvo *M. caprae*, zahteva širi pristup u iskorenjivanju tuberkuloze kod
34 goveda. Sa epizootiološkog aspekta bitno je istaći činjenicu da su u mnogim domaćinstvima u
35 kojima su bila ustanovljena tuberkulozna goveda, često bili prisutni i mali preživari, koji ne
36 podležu obaveznom dijagnostičkom ispitivanju na prisustvo tuberkuloze. Imajući u vidu da je
37 *M. caprae* prvobitno ustanovljen kao uzročnik tuberkuloze koza, trebalo bi u sklopu suzbijanja
38 tuberkuloze u žarištima ili pri iznenadnom izbijanju zaraze, obavezno dijagnostičkom pregledu
39 podvrgnuti koze i ovce u cilju sprečavanja održavanja infekcije što dovodi do prenosa infekcije
40 na goveda i predstavlja značajan rizik za širenja bolesti na ljude. Kandidat ističe da dobijeni
41 rezultati pokazuju da se Nacionalni program suzbijanja tuberkuloze u Srbiji u velikoj meri
42 pokazao uspešnim, te da se najveći deo Vojvodine može smatrati slobodnim od tuberkuloze
43 goveda, odnosno da je 99,9% zapata u najvećem delu Vojvodine kontinuirano slobodno od
44 tuberkuloze. Izuzetak predstavljaju ustanovljena žarišta tuberkuloze u delovima Južnobačkog
45 okruga u kojima i pored znatnog opadanja incidencije kao i prevalencije zaraženih zapata
46 usled preduzetih mera na suzbijanju tuberkuloze tokom prethodnih 10 godina ona i dalje
47 ostaje enzootski prisutna u niskom intenzitetu. Značajna pomoć u dijagnostici tuberkuloze u
48 žarištima, može biti strateška primena γ -IFN testa, zbog njegove osetljivosti i mogućnosti
49 nešto ranijeg otkrivanja tuberkuloznih jedinki u odnosu na komparativni tuberkulinski test.

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

Na osnovu dobijenih rezultata istraživanja izvedeni su sledeći zaključci:

1. Devetnaest izolata bakterija iz kompleksa *Mycobacterium tuberculosis* je primenom klasičnih bakterioloških i standardnih biohemijskih testova tipizirano kao vrsta *Mycobacterium bovis*. Na osnovu molekularne karakterizacije izolata primenom PCR spoligotipizacije, ustanovljeno je da svi izolati pripadaju vrsti *Mycobacterium caprae*.
2. Spoligotipni obrazac kod svih izolata je bio identičan, na osnovu čega je ustanovljeno da svi pripadaju istom soju odnosno klasteru, jedinstvene spoligotipne oznake SB0418, Hexcode 20-00-1F-7E-FF-60, odnosno ST 647. Nalaz SB0418 odnosno ST647 *Mycobacterium caprae* spoligotipa kao uzročnika tuberkuloze goveda na području Vojvodine potvrđuje njegovu široku i dominantnu rasprostranjenost u Srednjoj i Istočnoj Evropi kao i u našoj zemlji.
3. Ispitivanjem antimikrobne osetljivosti pet reprezentativnih izolata vrste *Mycobacterium caprae* metodom proporcija, nije ustanovljena rezistencija na sledeće antibiotike: etambutol, streptomycin, rifampicin i izoniazid.
4. Poređenjem tuberkulinskog i γ -IFN testa *Kappa* statističkom analizom, dobijena je vrednost $\kappa=0,48$, što predstavlja srednji nivo podudarnosti poređenih testova u *ante mortem* dijagnostici tuberkuloze goveda.
5. Paralelnom upotrebom tuberkulinskog i γ -IFN testa ukupan broj dijagnostikovanih pozitivnih grla bio je za 10% veći u odnosu na pojedinačnu primenu tuberkulinskog testa.
6. Prilikom ispitivanja osetljivosti γ -IFN testa u poređenju sa *post mortem* potvrđenim slučajevima tuberkuloze na osnovu bakteriološke izolacije, nalaza acidorezistentnih bakterija u mikroskopskim preparatima ili pozitivnog patohistološkog nalaza, ustanovljena osetljivost testa iznosila je 90%.
7. Na osnovu epizootioloških istraživanja, ustanovljena incidencija tuberkuloze goveda u periodu od 2010. do 2015. godine, na teritoriji Vojvodine je bila niska i kretala se u rasponu od 0,007 do 0,018% od ukupno ispitanih grla u datoj godini, a prevalencija inficiranih zapata se kretala između 0,08-0,012%.
8. U Južnobačkom okrugu na teritoriji opština Novi Sad, Žabalj i Titel ustanovljena su žarišta tuberkuloze u kojima je infekcija enzootski prisutna sa niskom prevalencijom što zahteva izradu posebnog programa kontrole i eradikacije ove bolesti. U takvim situacijama, opravdano je raditi i tuberkulinizaciju koza i ovaca.

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):

Prikaz i tumačenje rezultata istraživanja su u skladu sa postavljenim ciljevima doktorske disertacije. Dobijene rezultate kandidat je prikazao tabelarno, grafikonima, kartogramima, a u prilogu se nalazi detaljan prilog fotodokumentacije; opisi i tumačenja rezultata su jasni,

1 detaljni i sveobuhvatni, u skladu sa najnovijim naučnim informacijama. Izvedeni zakljuci
2 proizilaze iz dobijenih rezultata, logični su i jasno formulisani.

4 VIII KONAČNA OCENA DOKTORSKE DISERTACIJE:

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

7 Doktorska disertacija kandidata mr Ivana Pušića pod naslovom „**Izolacija, identifikacija i**
8 **molekularna karakterizacija uzročnika tuberkuloze goveda u Vojvodini**“ je napisana u
9 skladu sa obrazloženjem navedenim u prijavi teme.

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

11 Doktorska disertacija kandidata Ivana Pušića sadrži sve elemente i u skladu je sa zahtevima
12 koji su propisani za završenu doktorsku disertaciju.

13 3. Po čemu je disertacija originalan doprinos nauci?

14 U doktorskoj disertaciji mr Ivana Pušića DVM, originalni doprinos nauci leži u sistematskom
15 bakteriološkom i molekularnom ispitivanju uzročnika tuberkuloze goveda na teritoriji
16 Vojvodine. Pored uspešne izolacije i identifikacije uzročnika tuberkuloze kod goveda, po prvi
17 put je uz pomoć PCR spoligotipizacije ustanovljeno da svi izolati poreklom od goveda sa
18 teritorije Vojvodine, pripadaju vrsti *Mycobacterium caprae*, jedinstvene spoligotipne oznake
19 SB0418, Hexcode 20-00-1F-7E-FF-60, odnosno ST 647. Uz to, značajan doprinos leži i u
20 proceni istovremene upotrebe tuberkulinskog i γ -IFN testa čime je dokazano da ukupan broj
21 dijagnostikovanih pozitivnih grla bio je veći u odnosu na pojedinačnu primenu tuberkulinskog
22 testa. To praktično znači da bi se strateškom primenom γ -IFN testa u završnim fazama
23 eradikacije, povećala ukupna specifičnost testiranja u regionima sa niskom incidencijom
24 tuberkuloze, odnosno u regionima u kojima veliki broj goveda pokazuje nespecifične reakcije
25 na tuberkulin, tako što bi se uklanjala samo goveda pozitivna na oba testa. U drugom slučaju,
26 upotreba γ -IFN testa bi uticala na povećanje ukupne osetljivosti testiranja u zapaćima sa
27 visokom prevalencijom inficiranih jedinki, tako što bi se uklanjala sva grla pozitivna na bilo koji
28 od dva testa (komparativni tuberkulinski ili γ -IFN test). Nesumnjivi značaj ove disertacije leži i
29 u proceni značaja koza i ovaca kao potencijalnih rezervoara tuberkuloze izazvane vrstom *M.*
30 *caprae*.

31 IX PREDLOG:

32 Na osnovu ukupne ocene disertacije, komisija predlaže (odabrati jednu od tri
33 ponuđenih mogućnosti):

34 - da se doktorska disertacija prihvati a kandidatu odobri odbrana

35 DATUM
36 U Beogradu
37 13.VI 2016.

POTPISI ČLANOVA KOMISIJE

45 Dr Sonja Radojičić, redovni profesor,
46 Fakultet Veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

48 Dr Dušan Mišić, vanredni profesor,
49 Fakultet Veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

1
2
3
4
5
6
7
8
9

Dr Dušan Lalošević, redovni profesor
Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Dr Igor Stojanov, viši naučni saradnik
Naučni institut za veterinarstvo, Novi Sad
