

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

6  
7 **I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ:**

8  
9 1. **Датум и назив органа који је именовео комисију:** Наставно научно веће Факултета  
10 ветеринарске медицине, 257. седница одржана 29. 05. 2024. године

11  
12 2. **Састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звања, назива**  
13 **уже научне области за коју је изабран у звање, годином избора у звање и назив**  
14 **факултета, установе у којој је члан комисије запослен:**

15 **Напомена:** редослед чланова Комисије је такав да се прво наводе наставници са ФВМ а затим чланови  
16 из других институција, сем у случају када је ментор дисертације из друге институције. Тада се ментор из  
17 друге институције уписује под редним бројем 2, односно после ментора са ФВМ који је под редним бројем

- 18  
19 1. Др Наташа Стевић, доцент, Епизоотиологија, заразне болести животиња и  
20 болести пчела и свилопреља, 2021., Факултет ветеринарске медицине  
21 Универзитет у Београду, председник комисије  
22  
23 2. Др Весна Милићевић, виши научни сарадник, 2022. година, Микробиологија и  
24 имунологија, Научни институт за ветеринарство Србије, Београд  
25  
26 3. Др Славољуб Станојевић, научни сарадник, 2023. година, Биотехничке науке –  
27 Ветеринарство, Дирекција за националне референтне лабораторије, Земун  
28

29 **II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:**

30  
31 1. **Име, име једног родитеља, презиме:**

32 Младен, Миладин, Зеленовић

33  
34 2. **Датум рођења, општина, Република:**

35 14. 06.1987. године, Бијељина, Босна и Херцеговина

36  
37 3. **Датум одбране, место и назив магистарске тезе\*:**

38 /

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

40 /

41  
42  
43  
44 **III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

45  
46 „Серолошке и молекуларно-генетичке методе доказивања присуства *Brucella ovis* код  
47 природно инфицираних овнова и оваца и анализа морфолошких промена у тестисима и  
48 епидидимисима“

49  
50 **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (навести број страна поглавља, слика,**  
51 **шема, графикана и сл.):**

52  
53 Докторска дисертација кандидата Младена Зеленовића је написана на 116 страна  
54 компјутерски обрађеног текста и садржи следећа поглавља: Увод (2 стране), Преглед  
55 литературе (24 стране), Циљеви и задаци (1 страна), Материјал и методе (9 страна),  
56 Резултати (36 страна), Дискусија (14 страна), Закључци (2 стране), Литература (16  
57 страна). На почетку дисертације је дат кратак садржај на српском и енглеском језику,  
58 захвалница као и садржај дисертације.

59 Рад је документован са 23 табеле, 7 графикана и 18 слика. Списак литературе чини 215  
60 библиографских јединица.

1  
2 **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ** (дати кратак  
3 **опис сваког поглавља дисертације: увода-до 250 речи, прегледа литературе-до**  
4 **500 речи, циља и задатака истраживања-није ограничено, материјал и метода-**  
5 **није ограничено, резултата није ограничено, дискусије-до 100 речи, списка**  
6 **референци-навести број референци у докторској дисертацији):**  
7

8 Кандидат у **Уводу** описује бруцелозу оваца као болест која има велики економски  
9 значај и поред тога, што узрочник, *Brucella ovis* не припада зоонозним врстама бруцела.  
10 Имајући у виду управо патогенезу болести као и чињеницу да се и поред мера  
11 контроле, ова болест често неприметно шири и уноси у здраве запате, она се налази на  
12 листи болести обавезних за пријављивање Светске организације за заштиту здравља  
13 животиња (WOAH – World Organisation for Animal Health). У нашој земљи је такође  
14 обавезно пријављивање болести и примена Законом прописаних мера. И поред тога,  
15 епидидимитис овнова, како се често назива ова врста инфекције се и данас спорадично  
16 појављује код нас, доводећи до искључивања из приплода генетички високо вредних  
17 животиња. Најзначајнији резервоари ове бактерије су мужјаци који семеном излучују  
18 бактерије, док овце представљају механичке преносиоце бактерије на друге,  
19 неинфициране животиње. Поред оваца, на природну инфекцију је осетљив и европски  
20 јелен (*Cervus elaphus*), а у ретким случајевима и козе уколико се држе у кохабитацији са  
21 инфицираним овцама. Иако су први серолошки позитивни случајеви званично  
22 регистровани на територији Србије пре више од 15 година, епидидимитис овнова и  
23 данас представља проблем у нашој земљи, посебно у ситуацијама природног припуста  
24 и одсуства систематичне континуиране контроле болести. Описујући значај  
25 дијагностичких метода у откривању ове врсте инфекције, кандидат наглашава потребу  
26 оцене њихове осетљивости и специфичности, имајући у виду да се у рутинској  
27 дијагностици углавном користе серолошки тестови, као најпрактичнији за масовно  
28 тестирање животиња.  
29

30 У **Прегледу литературе**, кандидат описује историјат болести, етиологију и  
31 морфолошке и културелне особине врсте *Brucella ovis* и раширеност на глобалном  
32 нивоу. У прегледу литературе кандидат наводи и остале узрочнике који изазивају  
33 епидидимитис овнова, који диференцијално дијагностички имају велики значај за  
34 дијагностику болести. Поред тога, наглашава се економски значај и епизоотиологија  
35 болести која по начину преношења припада ланчастим заразама. Према Правилнику о  
36 утврђивању Програма мера здравствене заштите животиња, у Србији се сваке године  
37 врши испитивање на епидидимитис овнова, а у случају потврде позитивног налаза,  
38 животиње се искључују из приплода, кастрирају се и елиминишу у року од тридесет  
39 дана. У прегледу литературе се систематично описује клиничка слика код овнова, а као  
40 најдоминантнији симптоми присутни су епидидитимитис, орхитис и смањење  
41 плодности. Семе инфицираних животиња је лошег квалитета, са повећаним бројем  
42 леукоцита што често може да буде и једини рани знак инфекције. Број и покретљивост  
43 сперматозоида су у каснијем току болести смањени, а уобичајен је и налаз  
44 морфолошки измењених сперматозоида. Наглашава се и значај клиничког прегледа  
45 животиња који у теренским условима обично изостаје, иако палпабилне промене могу  
46 да буду присутне и код 50 % инфицираних животиња. Без обзира на то, либидо је код  
47 већине животиња очуван, што доводи до ширења и одржавања инфекције на неком  
48 подручју. Најзначајнији патоморфолошки налаз су лезије на епидидимисима, затим на  
49 *tunica vaginalis* и тестисима овнова. Промене могу да захвате један или оба  
50 епидидимиса с тим да се промене чешће налазе у репу, у односу на главу и тело. У  
51 каснијем току болести доминира дифузна фиброза. Иако је епидидимитис овнова  
52 епизоотиолошки и клинички најважнији код мужјака, код оваца се јавља побачај. На  
53 ендометријуму су присутне дегенерација, фокална и дифузна лимфоидна  
54 инфилтрација. У тежим случајевима налази се пурулентни некротични ендометритис.  
55 На плаценти се налазе жуто-сиви плакови који се често спајају у интеркотиледонарном  
56 простору. Котиледони могу бити некротични. У тешким случајевима у хориоалантоису је  
57 присутан желатинозни едем. У плућима фетуса понекад може бити присутна и  
58 пнеумонија. Гравидне животиње обично побаче само једном, па се у таквим  
59 случајевима болест лако превиди. Дијагностичке методе представљају основу за  
60 откривање инфицираних животиња и ефикасну примену мера контроле и сузбијања.

1 Имајући у виду да је за изолацију бактерија потребно време, посебно у случају високо  
2 контаминираних узорака, и да је већина изолата CO<sub>2</sub> зависна, основу дијагностике  
3 представљају серолошке методе. Иако је РВК (реакција везивања комплемента) високо  
4 специфична и осетљива, због компликованости извођења и честе  
5 антикомплементарности испитујућих серума која отежава процену добијених резултата,  
6 у рутинској дијагностици се углавном користе имуноензимски тестови (ЕЛИСА). У  
7 рутинској дијагностици, све бројнија истраживања могућности примене молекуларних  
8 метода нису показала довољну осетљивост на узорцима патолошког материјала, иако  
9 брзина извођења ових метода представља један од важних дијагностичких критеријума.  
10 На крају, кандидат цитирајући резултате других истраживача, наводи сетове  
11 превентивних мера које се користе у контроли и сузбијању бруцелозе оваца изазване  
12 врстом *Brucella ovis*.

13  
14 **Циљеви и задаци испитивања** обухватили су утврђивање присуства *B. ovis*, односно  
15 постојање серолошког одговора природно инфицираних оваца и овнова, као и  
16 утврђивање присуства морфолошких промена на тестисима и епидидимисима  
17 инфицираних овнова.

18 За остваривање постављених циљева дефинисани су и задаци истраживања и то:

- 19 1. Утврђивање серопреваленције бруцелозе у некомерцијалном стаду оваца изазване
- 20 врстом *B. ovis* применом индиректног ELISA теста
- 21 2. Утврђивање присуства ДНК *B. ovis* у узорцима хомогенизованих ткива тестиса и
- 22 епидидимиса применом Bruce-ladder multiplex PCR методе
- 23 3. Утврђивање присуства ДНК *B. ovis* у узорцима хомогенизованих тестиса и
- 24 епидидимиса применом Real time PCR методе
- 25 4. Упоредна анализа резултата Bruce-ladder multiplex PCR и Real time PCR метода са
- 26 различитим протоколима екстракције нуклеинске киселине
- 27 5. Упоредна анализа резултата молекуларних тестова са индиректним ЕЛИСА тестом
- 28 6. Утврђивање клиничких манифестација код овнова инфицираних *B. ovis*
- 29 7. Утврђивање макроскопских промена на тестисима и епидидимисима овнова
- 30 инфицираних *B. ovis*
- 31 8. Утврђивање микроскопских промена на тестисима и епидидимисима овнова
- 32 инфицираних *B. ovis*
- 33 9. Статистичка обрада резултата и процена добијених резултата, на основу којих ће се
- 34 одредити поузданост различитих метода за дијагностику инфекције оваца бактеријом *B.*
- 35 *ovis*.

36  
37 У поглављу **Материјал и методе** наводи се да је за потребе израде ове дисертације  
38 истраживање спроведено на фарми некомерцијалног типа код оваца расе Ile de France у  
39 близини Београда. Имајући у виду тип фарме, мужјаци су држани одвојено од женки са  
40 изузетком неколико овнова који су имали слободан приступ женкама у току сезоне  
41 парења. Сакупљен је материјал од укупно 94 животиње, и то 33 мужјака и 61 женке. За  
42 серолошко испитивање коришћен је индиректни ELISA комерцијални кит Ingezim  
43 *Brucella ovis* (Ingenaza, Spain). Сви серолошки позитивни овнови, клинички су  
44 прегледани палпацијом и утврђивани су параметри као што је болност и  
45 темперираност, повећање обима тестиса и епидидимиса, симетрија и конзистенција и  
46 покретљивост у скротуму. Орхидектомија је рађена након преоперативне припреме, а  
47 овнови су увођени у општу анестезију (Ксилазин 1-2 mg/kg i.m.). После увођења у општу  
48 анестезију и припреме оперативног поља, у линију реза сваког тестиса апликовано је 1  
49 ml лидокаина, у складу са принципима добробити. По завршеној орхидектомији  
50 извршен је макроскопски преглед тестиса и епидидимиса и узорковано је ткиво тестиса  
51 и епидидимиса за хистопатолошка и молекуларно-генетичка испитивања.  
52 Постоперативно, као и следећег дана, животињама је апликован карпрофен у дози од 3  
53 mg/kg s.c. за терапију бола.

54 Поред тестиса и епидидимиса, узимани су препуцијални и вагинални брисеви  
55 серолошки позитивних животиња. Препуцијалним и вагиналним брисевима додат је  
56 фосфатни слани раствор PBS (Thermo Fisher Scientific, USA). Узорци су након тога  
57 замрзнати и чувани на температури од -20 °C до испитивања. За спровођење ове  
58 студије добијено је одобрење од Етичког одбора за заштиту и добробит  
59 лабораторијских животиња при Факултету ветеринарске медицине Универзитета у  
60 Београду (Одобрење бр. 01-522 од 29.05. 2023.).

1 Припрема материјала репродуктивних органа за извођење молекуларно генетичких  
2 испитивања (тестиса и епидидимиса) вршена је уситњавањем и обрадом у стомахеру  
3 Bag Mixer 400 P (Interscience, France), јачине 8 удараца/секунди. Коришћена су  
4 разређења органа са физиолошким раствором у размери 1:2. Узорци су  
5 хомогенизовани у кесама са филтером порозности < 250  $\mu\text{m}$  (Bag Filter P) запремине  
6 400 ml (Interscience, France). Хомогенизован материјал је пакован у Eppendorf  
7 микротубе и чуван на температури од -20 °C до испитивања. ДНК из хомогенизованих  
8 органа екстрахована је помоћу два комерцијална кита за екстракцију и то QIAamp Cador  
9 Pathogen mini kit (Qiagen, Germany) и GeneJET Genomic DNA Purification kit (Thermo  
10 Fisher Scientific, USA) према упутству произвођача. Извођење Bruce-ladder multiplex  
11 PCR је обухватило иницијалну денатурацију на температури од 95 °C, 7 минута праћену  
12 са 25 циклуса денатурације ДНК на температури 95 °C, 35 секунди, хибридизацију  
13 прајмера на 64 °C, 45 секунди и елонгацију ДНК ланаца на 72 °C, 180 секунди, а затим  
14 финалну елонгацију на 72 °C, у трајању од 6 минута. Визуелизација добијених PCR  
15 продуката, вршена је применом методе хоризонталне електрофорезе у агарозном гелу  
16 концентрације 1% (Serva, Germany) са додатком боје GreenSafe Premium (NZYtech,  
17 Portugal) у финалној концентрацији од 1%. Визуелизација трака вршена је на апарату са  
18 УВ светлом и одређена је дужина умножених секвенци, на основу пређеног пута између  
19 две електроде. За извођење Bruce-ladder multiplex PCR коришћени су следећи  
20 прајмери: BMEI0998f, BMEI0997r, BMEI0535f, BMEI0536r, BMEI0843f, BMEI0844r,  
21 BMEI1436f, BMEI1435r, BMEI0428f, BMEI0428r, BR0953f, BR0953r, BMEI0752f,  
22 BMEI0752r, BMEI0987f, BMEI0987r.  
23 Као позитивна контрола коришћена је ДНК раније изоловане и потврђене *Brucella*  
24 *melitensis* и *Brucella ovis* Reo 198 (CO<sub>2</sub> независни сој) из колекције Катедре за заразне  
25 болести животиња и болести пчела Факултета ветеринарске медицине Универзитета у  
26 Београду, а као ДНК маркер примењен је Mass ruler ДНК 100 bp ladder (Thermo Fisher  
27 Scientific, USA). Позитивним је сматрана појава пет (одсуство трака дужине 1682 бп и  
28 272 бп) трака следећих дужина: 1071, 794, 587, 450 и 152 бп. Real-time PCR метода је  
29 рађена са истим екстрактима ДНК као и Bruce-ladder multiplex PCR. Метода је рађена  
30 коришћењем комерцијалног кита Luna® Universal qPCR Master Mix (NEB, USA).  
31 Реакциона смеша се састојала од 2,5  $\mu\text{l}$  изоловане ДНК, 5,5  $\mu\text{l}$  Master Mix-а, по 0,44  $\mu\text{l}$   
32 прајмера (10  $\mu\text{M}$ ), 0,22  $\mu\text{l}$  пробе (10  $\mu\text{M}$ ) и 3,4  $\mu\text{l}$  RNase free воде за PCR, по протоколу  
33 који су описали Hinić и сар. 2008. Циљана секвенца је IS711 а коришћени су прајмери:  
34 forward 5'-GCTTGAAGCTTGCGGACAGT-3', reverse 5'-GGCCTACCGCTGCGAAT-3',  
35 Probe 5'-FAM-AAGCCAACACCCGGCCATTATGGT-TAMRA - 3'. Амплификација IS711  
36 дела генома вршена је коришћењем Quant Studio 3, Applied Biosystems (USA) са  
37 температурним профилем: почетна денатурација на 95 °C 1 минут, 40 циклуса  
38 денатурације на 95 °C током 15 секунди и хибридизације/елонгације на 60 °C током 30  
39 секунди. Сви узорци са Ct вредношћу од 35 и нижом сматрани су позитивним.  
40 За потребе хистопатолошких анализа узорци ткива су фиксирани у неутралном  
41 пуферизованом 10% формалину, обрађени у аутоматском ткивном процесору,  
42 укалупљени у парафинске блокове и сечени на исечке дебљине 3-5  $\mu\text{m}$ .  
43 Ткивни исечци су бојени хематоксилином и еозином и затим анализирани на  
44 светлосном микроскопу BX51 (Olympus Optical, Japan) и фотографисани дигиталном  
45 камером Olympus Color View III®.  
46 Статистичке анализе су рађене коришћењем статистичког софтверског пакета Microsoft  
47 Office Excel 2016 (XLSTA за Excel). Добијени резултати су процењивани уз помоћ  
48 батерија статистичких тестова, и то  $\chi^2$ -тестом и Фишеровим егзактним тестом, као и  
49 Cohen's карра коефицијенатом асоцијације. За ELISA тест израчунате су вредности  
50 коефицијента асоцијације као и позитивне и негативне предиктивне вредности теста,  
51 односи вероватноћа добијања позитивних и негативних резултата, а одређене су и  
52 стопе лажно позитивних и лажно негативних резултата. Анализе хистопатолошких  
53 промена рађене су у програмском језику Python, применом метода кластер анализе  
54 (мултикритеријална агломеративна хијерархијска метода и нехијерархијска метода  
55 рашчлањивања кластера). Процена повезаности фактора ризика као што су старост и  
56 пол животиња са епизоотиолошким индикаторима урађена је применом параметријских  
57 и непараметријских тестова као што су Man-Whitney U, Shapiro-Wilk тест, Wilcoxon-ов  
58 тест и ANOVA тест. Независни и зависни т-тест рађени су у Python scipy.stats  
59 библиотеци. Tukey тест је рађен у Python statsmodels.stats.multicomp библиотеци.

1 Модели логистичке регресије, Random Forest класификатор и кластеровање рађени су у  
2 Python scikit-learn библиотеци.

3  
4 У поглављу **Резултати** кандидат је систематично, навео добијене резултате  
5 испитивања.

6 Серолошким испитивањем установљена је укупна привидна серопреваленција која је  
7 износила 26,6% за интервал поузданости од 95% (CI), а стварна преваленција износила  
8 је 25,4% за исти интервал поузданости. Позитивна предиктивна вредност  
9 комерцијалног ELISA теста износила је 95,83%, док је негативна предиктивна вредност  
10 износила 98,57%. Вредности односа позитивне вероватноће и односа негативне  
11 вероватноће износили су 49,50 и 0,01. Статистичком анализом добијених резултата  
12 установљено је да мужјаци имају 138 пута већу шансу да оболе у односу на женке  
13 (Odds ratio = 138) уз релативни ризик од 42,52. Применом  $\chi^2$  теста установљена је  
14 статистички значајна разлика између броја ELISA позитивних мужјака и женки ( $p <$   
15  $0,0001$ ). Слични резултати су добијени и Фишовим егзактним тестом.

16 Након екстракције ДНК QIAamp Cador Pathogen mini китом из 38 узорак  
17 хомогенизованих тестиса и епидидимиса испитани су Bruce-ladder multiplex PCR  
18 методом, дијагностиковано је укупно 6 позитивних узорак (15,79 %). Узорци пуне крви,  
19 препуцијалних и вагиналних брисева су били негативни. Од 38 узорак  
20 хомогенизованих тестиса и епидидимиса код којих је ДНК екстрахована GeneJET  
21 Genomic DNA Purification китом који су испитани Bruce-ladder multiplex PCR методом,  
22 добијена су четири позитивна узорак (10,53 %). Узорци пуне крви, препуцијалних и  
23 вагиналних брисева су били негативни. Резултати добијени применом Real time PCR  
24 методе на узорцима добијеним екстракцијом QIAamp Cador Pathogen mini китом  
25 установљено је укупно 11 (28,95%) позитивних узорак. Сви узорци крви, препуцијалних  
26 и вагиналних брисева били су негативни. Резултати добијени применом Real time PCR  
27 методе на узорцима добијеним екстракцијом GeneJET Genomic DNA Purification китом  
28 од укупно 38 узорак ткива тестиса и епидидимиса добијено је 10 (26,32%) позитивних  
29 узорак. Сви узорци крви, препуцијалних и вагиналних брисева били су негативни.  
30 Поређењем резултата добијених применом два различита протокола екстракције  
31 класични PCR протокол је имао конкорданцију од 94,74% а Cohen's kappa вредност  
32 износила је 0,771 (95% CI 0,614 – 0,929), док је Real time PCR протокол имао знатно  
33 лошији степен конкорданције од 71,05% и Cohen's kappa вредност од 0,277 (95% CI  
34 0,093 – 0,461). Упоредни резултати различитих PCR протокола у доказивању присуства  
35 нуклеинске киселине *B. ovis* на збирним узорцима ткива тестиса и епидидимиса  
36 серолошки позитивних овнова, код којих је установљен позитиван резултат код било ког  
37 од два збирна узорак репродуктивног ткива (тестиси и епидидимиси), комбинација  
38 QIAamp Cador Pathogen mini кита и Bruce-ladder multiplex PCR је имала осетљивост од  
39 31,6% (6/19). У случају екстракције са GeneJET Genomic DNA Purification китом, Bruce-  
40 ladder multiplex PCR је имао осетљивост од 21,1% (4/19). Код Real time PCR протокола  
41 где је екстракција нуклеинске киселине рађена QIAamp Cador Pathogen mini китом било  
42 је укупно 52,6% (10/19) овнова који су имали позитиван резултат барем на једном  
43 збирном узорку ткива, док је код екстракције GeneJET Genomic DNA Purification китом  
44 укупно било 47,4% (9/19) позитивних овнова.

45 Статистичка анализа резултата добијених QIAamp Cador Pathogen mini и GeneJET  
46 Genomic DNA Purification протоколима екстракције и Bruce-ladder multiplex PCR и Real  
47 time PCR методама показала је да је у случају екстракције нуклеинске киселине QIAamp  
48 Cador Pathogen mini китом и Bruce-ladder multiplex PCR методом добијено укупно 6  
49 позитивних резултата док је Real time PCR методом добијено 11 позитивних резултата.  
50 Само у једном случају узорак позитиван на Bruce-ladder multiplex PCR био је негативан  
51 на Real time PCR. За ову методу екстракције, поређењем са два различита PCR  
52 протокола добијена је Cohen's kappa вредност од 0,482 (95% CI 0,306-0,659) уз степен  
53 конкорданције од 81,58%. У случају екстракције нуклеинске киселине GeneJET Genomic  
54 DNA Purification китом, Bruce-ladder multiplex PCR методом добијена су 4 позитивна  
55 резултата док је Real time PCR добијено 10 позитивних резултата. За ову методу  
56 екстракције добијена је Cohen's kappa вредност од 0,496 (95% CI 0,307-0,685) уз степен  
57 конкорданције од 84,21%.

58 Макроскопским прегледом уочене су промене на епидидимисима и тестисима.

59 Доминантне промене уочене су на епидидимисима при чему је на глави епидидимиса  
60 код 5,26% (1/19) овнова уочена спермоциста, некротичне промене су уочене код 15,79%

1 (3/19) овнова док је хипертрофија главе и репа епидидимиса запажена код 31,58%  
2 (6/19) овнова. Фибротичне промене на епидидимисима макроскопски су биле изражене  
3 код 15,79% (3/19) овнова.

4 Фиброза је макроскопски запажена и на тестисима код 36,84% (7/19) овнова, код 15,79%  
5 (3/19) овнова уочена је калцификација, док су атрофичне промене уочене код 21,05%  
6 (4/19) овнова.

7 Хистопатолошке промене запажене су на тестисима и епидидимисима код свих  
8 испитаних овнова (19/19). Доминантне промене су уочене на епидидимисима, при чему  
9 је у каналићима епидидимиса код 100% (19/19) испитаних овнова запажена  
10 дегенерација, вакуолизација и хиперплазија епителних ћелија са интраепителним  
11 цистама у којима се формирају микроапсцеси, које су запажене код 26,32% (5/19)  
12 овнова. Спермостаза која је последица сужавања лумена каналића епидидимиса које  
13 настаје услед хиперпластичних промена на епители описана је код 5,26% (1/19) овнова.  
14 Поред хиперпластичних промена код 26,32% (5/19) овнова запажене су атрофичне  
15 промене на епителним ћелијама каналића епидидимиса и у лумену ових каналића се не  
16 уочавају сперматозоиди.

17 Такође су код 68,42% (13/19) овнова запажене инфламаторне промене у  
18 интерстицијуму епидидимиса карактеристичне за епидидимитис. Инфламаторне  
19 промене карактерисале су се инфилтрацијом мононуклеарним ћелијама -  
20 лимфоцитима, плазма ћелијама и макрофагима, док је гранулом са некротичним  
21 центром запажен код 5,26% (1/19) овнова. Фибротичне промене на епидидимисима  
22 карактерисале су се умножавањем везивно-ткивних ћелија и влакана у интерстицијуму.

23 Поред доминантних хистопатолошких промена на епидидимису код свих испитаних  
24 овнова запажене су и промене на тестисима које су углавном биле дегенеративног  
25 карактера. Поменуте промене на тестисима карактерисале су се вакуолизацијом  
26 Сертолијевих ћелија, ексфолијацијом герминативних ћелија и смањивањем степена  
27 сперматогенезе која се манифестовала изостајањем матурације сперматозоида,  
28 апоптозом и некрозом сперматиде као и формирањем мултинуклеарних ћелија које се  
29 уочавају у лумену семених каналића. Базална мембрана семених каналића је често  
30 задебљала и таласастог изгледа.

31 Фиброза тестиса манифестовала се умножавањем везивно-ткивних ћелија и влакана у  
32 интерстицијуму тестиса, док се калцификација тестиса карактерисала акумулацијом  
33 базофилних, хомогених беструктурних депозита калцијумових соли интратубуларно, у  
34 интерстицијуму и базалној мембрани семених каналића.

35 Инфламаторне промене у форми интерстицијалног орхитиса уочене су код 5,26% (1/19)  
36 овнова и карактерисале су се инфилтрацијом лимфоцитима, макрофагима и плазма  
37 ћелијама.

38  
39 У поглављу **Дискусија**, кандидат упоређује добијене резултате са резултатима других  
40 аутора. Указујући на предности и мане ЕЛИСА и молекуларних тестова за детекцију  
41 нуклеинске киселине бруцела у ткивима кандидат је критички анализирао добијене  
42 резултате.

43 У оквиру испитивања везаних за морфолошке промене на макроскопском и  
44 хистопатолошком нивоу кандидат анализира и пореди резултате својих испитивања са  
45 наводима из добро одабране литературе. Констатује да су промене на макроскопском и  
46 микроскопском нивоу доминантније на епидидимисима него на тестисима. Морфолошке  
47 промене на епидидимисима су претежно инфламаторног карактера у форми  
48 епидидимитиса, док су такође изражене и дегенеративне промене епитела  
49 епидидимиса.

50  
51 У списку **литературе** кандидат правилно наводи и у тексту цитира, 215 добро  
52 одабраних референци.

## 53 54 **VI ЗАКЉУЧЦИ ИСТРАЖИВАЊА (навести закључке који су приказани у докторској** 55 **дисертацији):**

56  
57 На основу добијених резултата изведени су следећи закључци:

- 58 1. Коришћењем индиректног ELISA теста утврђена серопреваленција бруцелозе  
59 изазване врстом *B. ovis* у некомерцијалном стаду оваца износила је 25,4%, при  
60 чему је било 69,7% серопозитивних овнова и 3,3% серопозитивних оваца.

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
2. Применом Bruce-ladder multiplex PCR методе код којих је ДНК *B. ovis* екстрахована QIAamp Cadog Pathogen mini китом из узорака хомогенизованих тестиса и епидидимиса добијено је 6 позитивних узорака (15,79%), док су коришћењем GeneJET Genomic DNA Purification кита за екстракцију ДНК *B. ovis* добијена четири позитивна узорка (10,53%)
3. Применом Real time PCR методе код којих је ДНК *B. ovis* екстрахована QIAamp Cadog Pathogen mini китом из узорака хомогенизованих тестиса и епидидимиса добијено је 11 позитивних узорака (28,95%), док је коришћењем GeneJET Genomic DNA Purification кита за екстракцију ДНК *B. ovis* добијено 10 позитивних узорака (26,32%).
4. Real time PCR протокол показао је нешто већу осетљивост у односу на Bruce-ladder multiplex PCR протокол.
5. Молекуларни тестови су у поређењу са индиректним ЕЛИСА тестом показали значајан недостатак осетљивости. Од 19 серопозитивних овнова 26,3% имало је негативне резултате у оба збирна узорка репродуктивног ткива за све протоколе екстракције ДНК и PCR протоколе, док су пуна крв и препуцијални и вагинални брисеви били негативни.
6. Клинички, промене на репродуктивним органима серолошки позитивних овнова манифестовале су се асиметријом скротума, унилатералним увећањем репа епидидимиса (63,16%), увећањем главе епидидимиса (31,58%), болношћу (21,05%) и чвршћом конзистенцијом тестиса и епидидимиса (47,37%).
7. Макроскопским испитивањем на епидидимису су на глави уочене спермоците (5,26%), некротичне промене (15,79%), хипертрофија главе и репа (31,58%) и фиброза код 15,79%, док је на тестисима запажена фиброза (36,84%), калцификација (15,79%) и атрофија (21,05%).
8. Микроскопске промене на тестисима уочене су код свих серолошки позитивних овнова и биле су у форми дегенерације тестиса која се карактерисала дегенеративним променама герминативних и Сертоли ћелија, смањивањем степена сперматогенезе, формирањем мултинуклеарних ћелија и задебљањем базалне мембране семених каналића, фиброзом и калцификацијом тестиса као и инфилтрацијом интерстицијума мононуклеарним инфламаторним ћелијама (лимфоцитима, макрофагима и плазма ћелијама).
9. У каналићима епидидимиса свих серолошки позитивних овнова уочена је дегенерација, вакуолизација и хиперплазија епителних ћелија са формирањем интраепителних циста и микроапсцеса (26,32%); спермостаза (5,26%); атрофија епителних ћелија каналића епидидимиса (26,32%). Такође је уочена и фиброза епидидимиса, као и грануломи са некротичним центром. Код 68,42% серолошки позитивних овнова уочена је инфилтрација интерстицијума епидидимиса мононуклеарним инфламаторним ћелијама (лимфоцитима, макрофагима и плазма ћелијама), што је налаз карактеристичан за епидидимитис.
10. Кластер анализа за хистопатолошке промене на тестисима показала је одсуство формирања значајних образаца између промјена. Формирана су два кластера промјена на епидидимисима при чему би критеријум раздвајања могао бити дужина трајања патолошког процеса.

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

1 Истраживања су спроведена у складу са постављеним циљем и задацима испитивања,  
2 а сви изведени закључци произилазе из добијених, статистички оцењених резултата.  
3  
4  
5

## 6 VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

- 7  
8 1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у  
9 пријави теме?

10  
11 Да

- 12  
13 2. Да ли дисертација садржи све елементе прописане за завршену докторску  
14 дисертацију?

15  
16 Да

- 17  
18 3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?  
19

20 У докторској дисертацији Младена Зеленовића, допринос науци огледа се у  
21 систематском и свеобухватном испитивању и анализи серолошких, молекуларних,  
22 клиничких и патохистолошких метода које могу да се користе у откривању инфекција  
23 изазваних врстом *Brucella ovis*. Посебна вредност добијених резултата односи се на  
24 чињеницу да су истраживања спроведена у специфичним условима природне  
25 инфекције непознате дужине трајања у некомерцијалном стаду оваца у коме нису  
26 спровођена дијагностичка испитивања. Неуобичајена структура стада у коме је већи  
27 број овнова држан изоловано, пружила је јединствен увид у настанак и развој  
28 патолошких промена. Комплексна анализа поузданости дијагностичких метода показала  
29 је добра слагања клиничких, серолошких и патохистолошких испитивања. У доступној  
30 литератури мало је података о морфолошким променама у тестистима и  
31 епидидимисама инфицираних овнова, које су у овој дисертацији детаљно анализирани.  
32 Истраживања спроведена у овој дисертацији су реализована уз помоћ средстава  
33 Министарства науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије (Уговор број  
34 451-03-47/2023-01/200143.).  
35

- 36 4. Да ли је ментор током провере оригиналности дисертације утврдио  
37 неоправдано преклапање текста са другим публикацијама (одговорити са да  
38 или не):  
39

40 Не  
41

42 IX СПИСАК НАУЧНИХ РАДОВА САДРЖИНСКИ ПОВЕЗАНИХ СА ДОКТОРСКОМ  
43 ДИСЕРТАЦИЈОМ У КОЈИМА ЈЕ ДОКТОРАНД ПРВИ АУТОР ОДНОСНО АУТОР СА  
44 НЕЈВЕЋИМ ДОПРИНОСОМ (написати имена свих аутора, годину објављивања,  
45 наслов рада, назив часописа, импакт фактор и класификацију према Правилнику  
46 о поступку, начину вредновања и квантитативном исказивању  
47 научноистраживачких резултата истраживача):  
48

49 Zelenović, Mladen, Marinković, Darko, Stević, Nataša, Stanojević, Slavoljub, Aničić, Milan,  
50 Milićević, Vesna, Valčić, Olivera, Radojičić, Sonja, "Reliability of molecular tests in diagnosing  
51 ovine brucellosis caused by *Brucella ovis*" in *Acta Veterinaria-Beograd*, 74, no. 1 (2024):133-  
52 144, <https://doi.org/10.2478/acve-2024-0010>, Journal Impact Factor 2022: 0.6, M23  
53

## 54 X ПРЕДЛОГ:

55  
56 На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже (одабрати једну од три  
57 понуђених могућности):  
58

- 59 - да се докторска дисертација прихвати а кандидату одобри одбрана  
60



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

ДАТУМ  
19. VI 2024. године

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

Председник комисије

Др Наташа Стевић, доцент  
Факултет ветеринарске медицине  
Универзитет у Београду

---

Др Весна Милићевић  
Виши научни сарадник  
Научни институт за ветеринарство Србије

---

Др Славољуб Станојевић,  
Научни сарадник  
Дирекција за националне референтне лабораторије Земун

---