

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VII редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 13.05.2022. године, на основу молбе ментора др Иване Клун, научног саветника Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, Института од националног значаја за Републику Србију, и др Драгане Миличић, доцента Биолошког факултета Универзитета у Београду, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације Владимира С. Ћирковића, под насловом: „**Присуство и генетички диверзитет *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. и *Toxoplasma gondii* у површинским водама Србије**”, у саставу: др Вера Николић, редовни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет, др Наташа Миладиновић-Тасић, ванредни професор, Универзитет у Нишу – Медицински факултет, и др Јасмина Крпо-Ћетковић, редовни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација Владимира С. Ћирковића урађена је у целости на Институту за медицинска истраживања, у Центру изузетних вредности за зоонозе преношене храном и векторима. Дисертација је урађена у оквиру пројекта III 41019 Министарства просвете, науке и технолошког развоја под насловом „Контрола инфекција апикомплексним патогенима: од нових места деловања лека до предикције“ којим је руководила др Олгица Ћурковић-Ћаковић, а подржана је и средствима по уговору МПНТР: 451-03-68/2022-14/200015.

Докторска дисертација садржи 9 ненумерисаних и 93 нумерисане стране и обухвата следећа поглавља: Увод (18 страна), Циљеви истраживања (1 страна), Материјал и методе (17 страна), Резултати (23 стране), Дискусија (10 страна), Закључци (1 страна), Литература (21 страна) и Прилози (2 стране). Поред наведеног, докторска дисертација обухвата и биографију аутора, као и следеће целине: насловну страну на српском и енглеском језику, листу ментора и чланова комисије, захвалницу, сажетак дисертације на српском и енглеском језику, садржај, Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјаву о коришћењу.

Докторска дисертација садржи 12 табела (пет у поглављу Материјал и методе, шест у поглављу Резултати, и једну у Прилозима) и 21 слику (шест у поглављу Увод, пет у поглављу Материјал и Методе, и 10 у поглављу Резултати). Поглавље Литература садржи 261 библиографску јединицу.

Анализа докторске дисертације

Поглавље **УВОД** подељено је на четири потпоглавља. У првом потпоглављу, под називом „Значај и доступност воде као природног ресурса у Европи“, изнети су подаци о значају воде као једног од најбитнијих ресурса у природи. Такође, истакнут је њен значај за људско друштво и привреду, са освртом на раст потреба за исправном водом у европским земљама. Назначен је утицај климатских фактора, посебно суше, као и њихових последица које су довеле до прибегавања употреби неисправне воде у разне сврхе. У делу под називом „Вода као резервоар и медијум за трансмисију микроорганизама“ помиње се значај еутрофикације воде (углавном антропогеног порекла) и њене улоге као медијума за пренос, а у неким случајевима и размножавање микроорганизама, са акцентом на патогене микроорганизме. У даљем тексту помиње се значај три групе узрочника обољења људи и животиња (вируса, бактерија и паразита), са нагласком на паразитске протозое које су организми од интереса за ово истраживање. У оквиру другог потпоглавља, „Патогене протозое које се преносе водом“, изложене су основне биолошке карактеристике (животни циклус, облици и морфолошке карактеристике), као и путеви преношења, патогенеза и клинички значај протозоа *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. и *Toxoplasma gondii*. Такође, истакнуто је колико отпорност њихових животних форми доприноси преживљавању ових организама у спољашњој средини. У делу „Значај *G. intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. и *T. gondii* као узрочника хидричних епидемија“ говори се о појму хидричних епидемија као и о узроцима за њихово настајање, како у развијеним, тако и у земљама у развоју. У поглављу је описан и значај два микроорганизама који нису део овог истраживања, и то *Entamoeba histolytica* и *Cyclospora cayetanensis*, као узрочника већег броја наведених епидемија. Фокус потпоглавља усмерен је на епидемије изазване протозоама чији се утицај на контаминацију површинских вода и испитује у овој дисертацији. Уз хронолошки наведене податке о хидричним епидемијама изазваним узрочником *G. intestinalis*, које су се јављале у периоду од неколико деценија уназад, изнети су и подаци о броју оболелих, као и процене о могућем, односно вероватном извору инфекције. Затим следи део посвећен хидричним епидемијама изазваним узрочницима *Cryptosporidium* spp. и *T. gondii*, такође организован хронолошки према времену избијања, где је посебна пажња посвећена подацима од епидемиолошког значаја, као што су број оболелих, време и место када су први пут детектоване, динамика развоја и сл. Последња целина у оквиру увода, под називом „Детекција и мониторинг“, говори о историјском развоју метода детекције протозоа у води, о техникама које су се раније користиле, као и о техникама које су их замениле и које се данас сматрају методама избора.

У оквиру поглавља **ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА** дефинисани су циљеви и задаци ове дисертације. Основни циљ истраживања било је утврђивање присуства паразитских протозоа *Giardia*, *Cryptosporidium* и *T. gondii* у површинским водама у Србији. Циљ је постигнут кроз имплементацију и стандардизацију нове методологије за детекцију протозоа у води. Остали циљеви били су: увођење до тада некоришћене методологије за детекцију протозоа, утврђивање њиховог присуства у води, анализа географске дистрибуције, као и процена диверзитета, односно утврђивање асемблажа паразита.

Поглавље **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** подељено је у седам логичних целина. У првом делу „План истраживања и узорковања“ наведене су и шематски приказане методе и протоколи који су коришћени у истраживању. Локације на којима је вршено узорковање представљају део програма мера Агенције за заштиту животне средине Републике Србије који се сваке године доноси, а по препоруци Оквирне директиве о водама Европске уније. Након објашњења разлога узорковања на одређеним местима, следи опис процеса узорковања воде. У делу „Провера ефикасности концентрисања (оо)циста *G. intestinalis* и *Cryptosporidium* spp. из воде филтрацијом кроз мембрански филтер“ објашњава се како је

стандардизована методологија пре самог истраживања, тј. пре испитивања првих узорка воде.

У делу „Концентрисање узорка филтрацијом кроз мембрански филтер“ објашњена је процедура концентрисања узорка воде применом перисталтичке пумпе и хидрофилних поликарбонатних филтера. Наведени су кораци који су предузети од уласка сваког узорка воде у лабораторију па све до концентрисања и смањења његове запремине од 10 L до неколико mL. Следећа целина „Имуномагнетна сепарација (оо)циста *G. intestinalis* и *Cryptosporidium* spp.“ наставља се на целину о концентрисању и говори о сепарацији односно издвајању (оо)циста паразита из узорка помоћу имуномагнетне сепарације. У овом делу дисертације детаљно су описани сви кораци као и реагенси неопходни да би се овај метод успешно применио. У оквиру поднаслова „Детекција (оо)циста и/или гДНК протозоа“ налазе се још три целине које објашњавају начине на који су детектовани испитивани паразити у узорцима воде. Назив прве целине гласи „Детекција (оо)циста *G. intestinalis* и *Cryptosporidium* spp. имунофлуоресценцијом“ и у њему је детаљно објашњен поступак детекције циста и ооциста *Giardia* и *Cryptosporidium* употребом флуоресцентне микроскопије. У оквиру дела „Детекција гДНК *G. intestinalis* и *Cryptosporidium* spp. и типизација асемблажа *G. intestinalis*“ налази се још пет поднаслова. Први међу њима, „Екстракција гДНК“ објашњава начин на који је екстрахована гДНК из узорка као и која метода је коришћена. У овом делу акценат је стављен на врсту реагенса који су коришћени због специфичности узорка. Други део „Концентрисање гДНК преципитацијом натријум ацетатом и етанолом“, садржи објашњење зашто је рађена концентрација узорка и у овом делу детаљно је објашњен поступак концентрације ДНК у претходно екстрахованом узорку. Трећи и четврти поднаслов „Детекција гДНК *G. intestinalis* PCR амплификацијом из два корака“ и „PCR-RFLP типизација асемблажа *G. intestinalis*“ говоре о начину детекције као и типизације *G. intestinalis* у узорцима воде. На почетку овог дела дисертације наводи се на који је начин рађена амплификација β -*giardin* гена. Екстерни и интерни прајмери и термални профили коришћени за амплификацију β -*giardin* гена приказани су табеларно. У наставку је објашњен начин на који су се утврђивале асемблаже *G. intestinalis* помоћу ензима ендонуклеазе. У петом поднаслову „Детекција гДНК *Cryptosporidium* spp. PCR амплификацијом из једног или два корака“ изнет је протокол за детекцију овог паразита у узорцима воде. Детекција је вршена таргетирањем четири различита гена: SSU rRNA, TRAP-C2, HSP70 и COWP, након чега следи детаљан опис начина на који је рађена амплификација секвенци поменутих гена. У следећој целини овог дела дисертације, „Детекција гДНК *T. gondii* PCR амплификацијом из једног (529 bp) и два корака (SAG2, GRA6)“, наводи се да је у свим узорцима рађена детекција 529 bp репетитивног елемента која је потврђена детекцијом SAG2 и GRA6 гена. У делу текста под називом „Припрема базе за графички приказ резултата помоћу географског информационог система (ГИС)“, табеларно су приказани подаци о локалитетима узорковања, који обухватају административно-територијалне податке, датум узорковања и детаљан опис локација, а дата је и њихова мапа. У последњем делу овог поглавља наводи се коришћење χ^2 теста у обради података при поређењу утицаја хидроморфолошких, физичких, хемијских и биолошких параметара, као и годишњег доба узорковања на резултате детекције протозоа у узорцима.

Четврто поглавље под називом **РЕЗУЛТАТИ**, подељено је на пет већих целина. У првој целини „Ток узорковања“ изнети су подаци о периоду када је вршено истраживање односно скупљање узорка (од краја 2018. до јула 2021. године), а изнети су и подаци о квалитету појединих узорка (турбидитет) и како је то утицало на њихову обраду. У делу текста „Резултати провере ефикасности концентрисања (оо)циста – валидација резултата истраживања“ приказани су резултати провере ефикасности примењене методе, који су показали да је метода дала више него задовољавајуће резултате, као и резултати провере ефикасности методологије за концентрисање (оо)циста, што је и потврдило да су резултати добијени у овом истраживању валидни. Трећи део у овом поглављу „Налаз протозоа у

површинским водама Србије“ садржи још четири подналова и уједно представља срж резултата. На почетку овог дела текста приказан је укупни налаз контаминираниости површинских вода цистама и ооцистама по регионима. Након овога следи преглед резултата по методама. Прво су дати резултати IFA теста и подаци о степену контаминације површинских вода *G. intestinalis* и *Cryptosporidium* spp. Резултати детекције (оо)циста приказани су табеларно, као и на мапи. Следе резултати детекције гДНК PCR методом – „PCR детекција *G. intestinalis* у узорцима воде“ и „Стандардизација PCR методе за детекцију *Cryptosporidium* spp. у узорцима воде“ са објашњењем процеса стандардизације PCR методе. Табеларно су приказани таргет гени коришћени у PCR реакцијама за детекцију *Cryptosporidium* spp. као и дужина добијених фрагмената. У делу „PCR детекција *T. gondii* у узорцима воде“ изнети су резултати о детекцији гДНК наведеног паразита, као и табеларни приказ локација и узорака у којима су детектоване све три секвенце. Четврта целина поглавља „Резултати“ даје податке о типовима детектованих асемблажа *G. intestinalis* у узорцима са локацијама узорака где су те асемблаже детектоване, што је приказано и на мапи. У делу „Анализе утицаја најзначајнијих хидроморфолошких параметара површинских вода на налаз протозоа“ дат је табеларни преглед физичких, хемијских и биолошких параметара квалитета воде са локација где је вршено узорковање, као и годишњег доба узорковања, и, табеларни преглед вредности статистичких значајности евентуалног утицаја испитиваних параметара на налаз протозоа у води, добијених као резултат χ^2 теста.

У поглављу **ДИСКУСИЈА**, резултате истраживања обухваћених дисертацијом кандидат анализира у контексту релевантних података из међународних и неких домаћих литературних навода. Поред анализе резултата саме детекције протозоа извршен је и критички осврт на методологију коришћену у овом и сродним истраживањима. На почетку поглавља износе се подаци о броју хидричних епидемија које су забележене у свету у последњих 10 година. Такође, коментарише се приметан недостатак података из великог броја земаља, што се не објашњава изостанком узрочника, односно непостојањем епидемија, већ недостатком адекватне методологије за детекцију, или пак изостанком система за правовремену пријаву епидемија, тј. за активни или пасивни надзор појаве болести. Даље у тексту изнети су подаци о хидричним епидемијама, инфекцијама или обољењима у Србији потенцијално изазваним протозоама које су биле предмет овог истраживања. Истиче се да је већи број тих епидемија остао без разјашњеног извора, што сугерише да је хидрични пут ширења могућ. У даљем тексту наводи се да се у Србији површинска вода не контролише на присуство протозоа и истиче се да је овај вид мониторинга неопходан због стања загађености површинских вода. У Србији се само 12% отпадних вода пречишћава, а реке служе као реципијенти канализационих вода, што значајно повећава могућност за инфекцију људи и животиња овим микроорганизмима.

У делу текста посвећеном анализи методологије која је коришћена у истраживању, истиче се да је управо та методологија „златни стандард“ у детекцији *G. intestinalis* и *Cryptosporidium* spp. и да је до сада показала најбоље резултате у истраживањима која су вршена широм света. Такође, помиње се да хетерогеност узорака није утицала на добијене резултате, иако састав воде (већа количина растворених јона) може донекле да умањи степен сепарације (оо)циста из узорка. Наводи се да процена вијабилности (оо)циста није рађена, а такође се наводе и методе које у ту сврху могу да се користе, попут специјалних бојења, биолошких огледа на лабораторијским животињама и сл. Такође се истиче да се, с обзиром на то да у тренутку узорковања није било екстремних температурних осцилација, може претпоставити да су организми били вијабилни и потенцијално способни да изазову обољење.

Због природе узорака односно велике количине инхибитора PCR реакције и потенцијално мале количине ДНК, у тексту је објашњено шта је предузимано како би се ови проблеми решили или избегли. Такође, негативни резултати у одређеном броју узорака

објашњени су недовољном количином ДНК, што представља чест проблем при раду са узорцима пореклом из спољашње средине.

Детектоване асемблаже *G. intestinalis* у три узорка, указују на то да је контаминација водотокова заправо последица испуштања канализационих и других отпадних вода у водотокове, што представља потенцијални пут преношења, а истовремено и извор инфекције за животиње али и људе. Неуспех у детекцији гДНК *Cryptosporidium* spp. у узорцима, иако су ооцисте биле микроскопски детектоване, објашњен је високим лимитом детекције, односно малом количином гДНК у узорку. Присуство гДНК *T. gondii* објашњено је могућом контаминацијом околног земљишта ооцистама пореклом од дивљих или домаћих мачака и доспевањем истих у водотокове.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** наведени су најважнији закључци проистекли из резултата истраживања. Закључено је да је новоуведена методологија за детекцију паразитских протозоа у површинским водама филтрацијом и имуномагнетном сепарацијом за пречишћавање циста, одн. ооциста протозоа, у комбинацији са имунофлуоресценцијом и молекуларном детекцијом заснованом на PCR методи, показала задовољавајућу осетљивост и специфичност и да је стога примењива у будућим сличним истраживањима у нашој средини. У овом истраживању, у рекама из свих великих сливова са територије Србије (Дунав, Дрина, Сава, Велика Морава) детектовано је присуство протозоа у барем једном узорку. Присуство протозоа утврђено је у 50% од укупног броја од 48 узорка. Имунофлуоресценцијом детектовано је присуство *G. intestinalis* у 14 узорка (29,2%) а *Cryptosporidium* spp. у пет узорка (10,4%), док је у три узорка (6,25%) детектовано присуство и *G. intestinalis* и *Cryptosporidium* spp. PCR методом детектовано је присуство гДНК *G. intestinalis* у осам узорка (16,7%), *T. gondii* у четири узорка (8,3%) док гДНК *Cryptosporidium* spp. није детектована ни у једном узорку. Типизацијом су детектоване потенцијално зоонотске асемблаже (**A** и **B**) *G. intestinalis* у рекама, а употребом qGIS софтвера утврђена је просторна дистрибуција протозоа и установљено је њихово релативно веће присуство у одређеним деловима западне и централне Србије. Ово истраживање је пружило прве, пионирске податке о стању контаминираности површинских вода паразитским протозоама у Србији. Подаци представљају полазну основу за даља истраживања, у циљу припреме и увођења плана мера превенције.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи 261 библиографску јединицу. Литературни извори у тексту дисертације цитирани су адекватно и на одговарајућим местима.

У поглављу **ПРИЛОЗИ** табеларно су приказани геореферентни подаци, односно координате локација, складиштени у оквиру базе направљене у OziExplorer софтверу.

ПУБЛИКОВАНИ РАДОВИ И САОПШТЕЊА ИЗ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:

Б1. Радови у часописима међународног значаја - M20

- **Ćirković V**, Klun I, Selstad Utaaker K, Uzelac A, Tysnes K, Robertson L, Djurković-Djaković O. (2019): Surface waters as a potential source of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Serbia. *Exp Parasitol* 209:b107824. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107824> (M22)
- **Ćirković V**, Uzelac A, Miličić D, Klun I, Djurković-Djaković O. (2020): First detection of *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) (Eucoccidiorida: Sarcocystidae) in river

waters in Serbia. *Acta Zool Bulg* 72, Suppl 15: 79-83. https://acta-zoologica-bulgarica.eu/older-articles/Suppl_15_15.pdf (M23)

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја - М30

- **Ćirković V**, Uzelac A, Klun I, Djurković-Djaković O (2019): Површинске воде као резервоар протозоа *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* spp. и *Toxoplasma gondii*: налаз у неким рекама Србије. Зборник радова 48. Међународне конференције о актуелним проблемима коришћења и заштите вода “Вода 2019”, Златибор, 4-6. јун, стр. 147-152. (M33)
- **Ćirković V**, Uzelac A, Klun I, Djurković-Djaković O (2019): Surface waters as a potential source of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Serbia. *53rd Days of Preventive Medicine – Intl. Congr.*, Faculty of Medicine, University of Niš, Serbia, 24-27.09. Session: Current parasitoses and fungal infections (Oral presentation). Book of Abstracts, ISBN 978-86-900283-0-6, p. 98. (M34)
- **Ćirković V**, Uzelac A, Klun I, Miličić D, Djurković-Djaković O (2019): The first detection of *Toxoplasma gondii* in rivers in Serbia. *3rd International Conference on Zoology, Zoonoses and Epidemiology*, Hissar, Bulgaria, 21-23.10. Programme & Abstracts Book, Plovdiv University Press, ISBN 978-619-202-507-6, p. 91. (M34)

ПРОВЕРА ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација кандидата Владимира С. Ћирковића, број индекса Е3005/2016, послата је дана 05.05.2022. године на софтверску проверу оригиналности. Извештај који садржи резултате провере оригиналности ментори су добили истог дана, 05.05.2022.

Резултати електронске провере ове докторске дисертације показали су подударност текста од 6% са доступним изворима на интернету. На основу детаљног увида у извештај, утврђено је да постоји само једно подударање на нивоу од 2%, док су сва остала мања од 1%. Констатујемо да су све наведене подударности (углавном са публикованим докторским дисертацијама), у потпуности прихватљиве, а односе се на: поклапања у звањима и афилијацијама ментора и чланова комисије, терминима или деловима текста уобичајеним за докторске дисертације (нпр. делови садржаја и наслови поглавља, изјава о ауторству), као и у литературним наводима у тексту, и изразима или синтагмама уобичајеним за научне публикације или за српски језик уопште.

Када се све изнето узме у обзир, извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата Владимира С. Ћирковића, под насловом „Присуство и генетички диверзитет *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. и *Toxoplasma gondii* у површинским водама Србије“, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

На основу анализе докторске дисертације кандидата **Владимира С. Ћирковића**, комисија сматра да дисертација представља оригиналан научни рад, који је у сагласности са циљевима истраживања и који испуњава све критеријуме прописане стандардима Универзитета у Београду.

Дисертација представља пионирско и савремено систематско истраживање у области хидрокологије и паразитологије, и има оригиналан научни допринос познавању стања контаминације акватичних екосистема наведеним паразитским протозоама. Посебно је значајна зато што је у сврху њене израде по први пут у Србији стандардизована, оптимизована, а затим и примењена методологија за детекцију циста и ооциста паразитских протозоа у води, која уједно представља и „златни стандард“ у светским оквирима. Резултати дисертације представљају прве податке о присуству и генетичкој структури испитиваних протозоа у површинским водама Србије, који имају изузетну важности за процену патогености ових врста, као и за процену ризика по здравље људи и животиња. Такође, мапирањем помоћу географског информационог система подаци су интегрисани и ускладиштени у интерактивну мапу Републике Србије и могу послужити као основа за планирање будућих истраживања. Сем научног доприноса, резултати ове дисертације могу имати и практичан значај за јавно здравље, између осталог тако што би допринели увођењу плана мера превенције у Србији.

Током израде дисертације кандидат је показао способност да прецизно дефинише циљеве и задатке истраживања, да успешно уведе и стандардизује методе концентрације и детекције паразита које се по први пут примењују у нашој средини, као и да примени друге адекватне методе у анализи, обради и представљању резултата, да резултате јасно прикаже и о њима дискутује на критички и квалитетан начин, користећи најновије релевантне изворе научне литературе и адекватно их цитирајући, и да на крају изведе логичне закључке који имају велики значај за познавање статуса контаминације површинских вода паразитским протозоама и њихове трансмисије.

На основу свега наведеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај Извештај и одобри кандидату Владимиру С. Ћирковићу јавну одбрану докторске дисертације под насловом „Присуство и генетички диверзитет *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium* spp. и *Toxoplasma gondii* у површинским водама Србије”.

У Београду, 13.05.2022. године.

КОМИСИЈА:

др Вера Николић, редовни професор,
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Наташа Миладиновић-Тасић, ванредни
професор, Универзитет у Нишу – Медицински
факултет

др Јасмина Крпо-Ћетковић, редовни професор,
Универзитет у Београду – Биолошки факултет