

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:**

10 Наставно научно веће Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду,  
11 193. седница одржана 20.03.2019. године

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

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

20  
21 1. Др Соња Радојичић, редовни професор, Епизоотиологија, заразне болести животиња  
22 и болести пчела и свилопреља, 2011. година, Факултет ветеринарске медицине,  
23 Универзитет у Београду, **ментор 1**

24 2. Др Весна Милићевић, научни сарадник, Биотехничке науке-ветеринарство, 2017.  
25 година, Научни институт за ветеринарство Србије, Београд, **ментор 2**

26 3. Др Мирослав Валчић, редовни професор, Епизоотиологија, заразне болести  
27 животиња и болести пчела и свилопреља, 2010. година, Факултет ветеринарске  
28 медицине, Универзитет у Београду

29 4. Др Јаков Нишавић, ванредни професор, Микробиологија са имунологијом, 2014.  
30 година, Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду

31  
32  
33 **II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:**

34  
35 **1. Име, име једног родитеља, презиме:**

36 Милован, Милета, Миловановић

37  
38 **2. Датум рођења, општина, Република:**

39 14.7.1989. година, Краљево, Република Србија

40  
41 **3. Датум одбране, место и назив магистарске тезе\*:**

42  
43 **4. Научна област из које је стечено академско звање магистра наука\*:**

44  
45 **III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

46 Испитивање имунског одговора и присуства вакциналног и теренског соја вируса  
47 нодуларног дерматитиса код говеда и новорођене телади након вакцинације  
48 атенуираном вакцином

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

51 Докторска дисертација је написана на 91 страни компјутерски обрађеног текста и  
52 садржи следећа поглавља: Увод (3 стране), Преглед литературе (18 страна), Циљеви и  
53 задаци (1 страна), Материјал и методе (15 страна), Резултати (18 страна), Дискусија (8  
54 страна), Закључци (2 стране), Литература (12 страна).

55 На почетку дисертације је дат кратак садржај на српском и енглеском језику као и  
56 садржај дисертације. На крају дисертације се налазе листе скраћеница, слика и  
57 графикана као и Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске  
58 верзије рада, Изјава о коришћењу и Биографија кандидата.

59 Рад је документован са 23 табеле, 2 графикана и 13 слика.

60 Списак литературе чини 118 библиографских јединица од којих је најновија из 2018.  
61 године.

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 нодуларни дерматитис као болест од великог економског  
9 значаја која се налази на листи болести обавезних за пријављивање Светске  
10 организације за здравље животиња (OIE) указујући да након епизоотије 2015. и 2016.  
11 године, вирус нодуларног дерматитиса данас представља највећу претњу говедарској  
12 производњи у Европи. Нодуларни дерматитис описује као акутно, субакутно или  
13 хронично вирусно обољење говеда и бивола. Кандидат у уводном делу даје основне  
14 податке о таксономији и отпорности вируса. Укратко су описани епизоотиологија,  
15 раширеност обољења, преношење вируса, патогенеза и клиничка слика болести.  
16 Кандидат наводи да се дијагностика врши на основу карактеристичних клиничких  
17 знакова и потврђује изолацијом вируса на култури ткива и/или идентификацијом вируса  
18 применом различитих молекуларних метода. Детекција специфичних антитела као  
19 индиректних показатеља инфекције, врши се употребом серолошких метода. У овом  
20 поглављу су наведени основни принципи контроле и сузбијања болести, који  
21 подразумевају хумано убијање заражених и животиња у контакту као и евентуалну  
22 вакцинацију свих пријемчивих животиња. Кандидат наводи да на ефикасност  
23 вакцинације утичу многи фактори и посебно имунизација животиња које су у инкубацији,  
24 непоштовање хладног ланца чувања вакцине и њено излагање директном сунчевом  
25 светлу, неправилно дозирање и неправилна апликација вакцине, вакцинација младих  
26 животиња испод шест месеци старости због могућег постојања матералних антитела.  
27 Кандидат указује да је први случај нодуларног дерматитиса у Србији дијагностикован у  
28 јуну 2016. године а највећи број жаришта регистрован у Пчињском округу. Тада је за  
29 сузбијање болести примењена еутаназија и нешкодљиво уклањање оболелих и  
30 животиња у контакту, подизање биосигурносних мера, дезинфекција и дезинсекција,  
31 контрола кретања животиња и вакцинација целокупне популације говеда.  
32

33 Поглавље **Преглед литературе** кандидат започиње историјским подацима о првој  
34 појави и опису нодуларног дерматитиса 1929. године у северној Родезији (садашњој  
35 Замбији). Након морфолошког описа овог комплексног ДНК вируса, наводе се детаљни  
36 подаци о раширености нодуларног дерматитиса, као и првој појави болести у  
37 Републици Србији 07.06.2016. године у селу Љиљанце, општина Бујановац. Током  
38 епизоотије нодуларног дерматитиса у 2016. години, у Србији је пријављено 225  
39 жаришта у којима је према званичним подацима оболело 267 животиња. У наредним  
40 потпоглављима описује се епизоотијски процес, начини преношења вируса као и  
41 дијагностика и контрола нодуларног дерматитиса. Кандидат посебан нагласак ставља  
42 на улогу хематофагних инсеката у преношењу вируса нодуларног дерматитиса где  
43 наводи да комарци врсте *Aedes aegypti* успешно могу да пренесу вирус нодуларног  
44 дерматитиса од 2 до 6 дана након храњења на инфицираним животињама. Такође  
45 наводи да је доказано да мужјаци крпеља *Rhipicephalus appendiculatus* механички могу  
46 да преносе вирус нодуларног дерматитиса са инфициране на здраву животињу, те да  
47 се вирус код крпеља врсте *Amblyomma hebraeum* у експерименталним условима  
48 преноси трансстадијално, као и да ова врста крпеља вирус нодуларног дерматитиса  
49 механичким путем може пренети на пријемчиве животиње. Будући да се сама докторска  
50 дисертација методолошки умногоме ослања на лабораторијске дијагностичке методе, у  
51 потпоглављу Дијагностика кандидат описује карактеристике и могућности примене  
52 сваке од данас доступних лабораторијских техника. Посебан значај је дат мерама  
53 контроле и сузбијања с обзиром на то да нодуларни дерматитис доводи до значајних  
54 економских губитака. Из тих тог разлога, описана је вакцинација, stamping out, забрана  
55 кретања животиња, контрола вектора и активна и пасивна присмотра. Наводи се да је  
56 вакцинација у Републици Србији започета након лабораторијског дијагностиковања  
57 нодуларног дерматитиса и званичне пријаве првог жаришта у земљи, те да је до  
58 30.8.2016. године вакцинисано скоро 100% говеда. Кандидат указује да је током  
59 вакциналне кампање забележена и појава нежељених ефеката. Најчешћа  
60 поствакцинална реакција је била појава дифузног тестастог отока различитих димензија

1 на месту апликације вакцине, оток ђердана и поткожног ткива предњих екстремитета,  
2 што је доводило до пролазне хромости. Поред локалног отока, забележена је и појава  
3 карактеристичних кожных нодула величине зрна грашка до величине лешника најчешће  
4 локализованих у пределу врата, леђа, грудног коша и екстремитета. Пролазни пад  
5 производње млека износио је најчешће око 20% и трајао је 2 до 3 дана, а ретко и дуже.  
6 Коњунктивитис са последичним слепилом се ретко јављао. Ревакцинација и  
7 вакцинација свих пријемчивих животиња је настављена у 2017. и 2018. години.

8  
9 **Циљеви и задаци** су обухватили испитивање активно и пасивно стеченог хуморалног  
10 имунитета након вакцинације атенуираном вакцином против нодуларног дерматитиса  
11 сетом различитих серолошких тестова (вирус неутрализационом тестом (VNT), тестом  
12 индиректне имунофлуоресценције (IFAT) и комерцијалним ELISA тестом) у крвном  
13 серуму, млеку и колоструму. Поред тога, циљ је био и утврђивање евентуалног  
14 присуства вакциналног и/или теренског соја вируса нодуларног дерматитиса  
15 молекуларним тестовима у различитим узорцима пореклом од испитујућих животиња  
16 као и хематофагних инсеката, потенцијалних механичких вектора вируса из окружења.  
17 Ради остваривања постављених циљева ове докторске дисертације дефинисани су  
18 следећи задаци:

19 1. Прикупљање података о вакцинацији животиња, претходним жариштима и  
20 одабир фарми са подручја на којима нодуларни дерматитис није дијагностикован, а на  
21 којима ће се вршити узорковање.

22 2. Узорковање крви, млека и брисева носа и уста од вакцинисаних говеда  
23 трократно, током једне године (прво узорковање пре ревакцинације, друго месец дана  
24 након ревакцинације и треће пет месеци након ревакцинације); узорковање крви и  
25 колострума од крава, једнократно, на дан телења и крви новорођене телади, двократно,  
26 пре узимања колострума и са 14 дана старости. Такође су узорковани хематофагни  
27 инсекти и крпељи са фарми на којима су боравиле животиње.

28 3. Припрема и складиштење узорака: крвни серум, крв са EDTA, узорци млека и  
29 колострума су конзервирани употребом 1% натријум азида. Узорци су складиштени на -  
30 20 °Ц до испитивања.

31 4. Испитивање крвних серума на присуство специфичних антитела методом вирус  
32 неутрализационог теста, индиректне имунофлуоресценције и комерцијалним ELISA  
33 тестом (ID Screen Capripox double antigen Multi-species, Француска).

34 5. Испитивање узорака млека на присуство специфичних антитела комерцијалним  
35 ELISA тестом (ID Screen Capripox double antigen Multi-species, Француска).

36 6. Утврђивање карактеристика ELISA теста (ID Screen Capripox double antigen  
37 Multi-species, Француска) испитивањем узорака млека крава са територије Савезне  
38 Републике Немачке и испитивањем узорака свиња серопозитивних на *Suipoxvirus*.

39 7. Утврђивање присуства генома вируса нодуларног дерматитиса методом Real-  
40 Time PCR у испитиваним узорцима (квр, брисеви) као и прикупљеним хематофагним  
41 инсектима.

42 8. Анализа и статистичка обрада резултата

43  
44 У поглављу **Материјал и методе** наводи се да су за потребе овог испитивања узорци  
45 за испитивање узети у селу Врдила, територија општине Краљево, где није било  
46 случајева нодуларног дерматитиса. За испитивање активног имунског одговора  
47 одабрано је 79 говеда различитих старосних категорија (од 9 месеци до 10 година), са  
48 20 газдинстава ради утврђивања присуства специфичних антитела против вируса  
49 нодуларног дерматитиса након вакцинације и ревакцинације. Узорковање је спроведено  
50 трократно у току 2017. године и то пре ревакцинације, месец дана након ревакцинације  
51 и пет месеци након ревакцинације.

52 За испитивање карактеристика, односно специфичности комерцијалног ELISA теста (ID  
53 Screen® Capripox double antigen Multi-species-ELISA, произвођач IDvet, Француска)  
54 коришћени су крвни серуми од 20 свиња серопозитивних на *Suipoxvirus* пореклом из  
55 Савезне Републике Немачке. За испитивање пасивног имунског одговора, одабрано је  
56 17 стеоних крава са термином телења три и пет месеци након ревакцинације у 2017.  
57 години и њихових 20 тек рођених телади. Крвни серум телади је узоркован двократно:  
58 прво узорковање је спроведено на дан телења (пре узимања колострума), а друго 14.  
59 дана старости. Поред узорака прикупљених од телади, узорковање од мајки (крвни  
60 серум и колострум) је вршено једнократно на дан телења.

1 У циљу утврђивања могућности примене и валидације комерцијалног ELISA теста за  
2 испитивање млека, коришћено је млеко крава одабраних за испитивање активног  
3 имунског одговора које су биле у лактацији. У односу на временски период узорковања,  
4 млеко је узорковано од 52 краве са 12 газдинстава пре ревакцинације, од 49 крава са 11  
5 газдинстава месец дана након ревакцинације и 53 краве са 15 газдинстава пет месеци  
6 након ревакцинације. Поред индивидуалног, узорковано је збирно млеко (од 2 до 10  
7 крава) из лактофриза на газдинствима. Ради утврђивања специфичности ELISA теста  
8 за испитивање млека, као негативни контролни узорци су коришћени појединачни  
9 узорци млека од 352 краве са територије Савезне Републике Немачке.

10 За испитивање присуства вакциналног и теренског соја вируса нодуларног дерматитиса  
11 узоркована је крв са EDTA, брис носа и брис уста од говеда одабраних за испитивање  
12 активног имунског одговора, као и крв са EDTA од крава и телади одабраних за  
13 испитивање пасивног имунског одговора. Узорке хематофагних инсеката представљале  
14 су шталске муве (*Stomoxys calcitrans*) које су сакупљене из окружења (штала) помоћу  
15 мрежица 10x10 cm. Хематофагни инсекти су сакупљани четири пута: месец дана након  
16 ревакцинације, пет месеци након ревакцинације и додатно два пута између ова два  
17 периода у време највеће активности инсеката (август и септембар).

18 За утврђивање присуства специфичних антитела против вируса нодуларног  
19 дерматитиса коришћени су вирус неутрализациони тест, тест индиректне  
20 имунофлуоресценције и комерцијални ELISA тест (ID Screen Capripox double antigen  
21 Multi-species, Француска).

22 За извођење вирус неутрализационог теста и теста индиректне имунофлуоресценције  
23 коришћена је MDBK ћелијска линија (сер. бр. 0261, Био банка ФЛИ, Римс, Немачка) са  
24 ћелијама старим од 3 до 4 дана, инкубирана на 37 °C у атмосфери са 5% CO<sub>2</sub> и  
25 Neethling соја вируса (Пирбрајт Институт, Пирбрајт, УК). Комплемент је у свим узорцима  
26 крвних серума који су испитивани методом вирус неутрализационог теста инктивисан на  
27 56 °C у трајању од 30 минута. Оба теста су изведена у 96 бунарским микротитар  
28 плочама са равним дном (Costar®, Corning, New York, SAD). Вирус неутрализациони  
29 тест се користи за утврђивање присуства и титра неутрализационих антитела у  
30 испитујућем серуму. У овој докторској дисертацији је коришћен за испитивање активног  
31 и пасивног имунског одговора. Принцип овог теста се заснива на директној реакцији  
32 антитела, у опадајућем разређењу серума и вируса константног титра (100TCID<sub>50</sub>/50 µl)  
33 као антигена. Испитујући и контролни серуми су испитивани у серијским разређењима  
34 од 1:10 до 1:1280, у трипликату. При сваком извођењу теста, постављене су контрола  
35 титра радног разређења вируса, позитивни и негативни контролни серуми.

36 Тест индиректне имунофлуоресценције је коришћен за испитивање активног и пасивног  
37 имунског одговора. Овај тест који се користи за утврђивање присуства и титра  
38 специфичних антитела против вируса нодуларног дерматитиса је заснован на  
39 визуализацији комплекса антиген–антитело насталих у реакцији испитујућег серума  
40 опадајућег разређења и константне количине вируса. Комплекси антиген–антитело  
41 постају видљиви након контакта са антиглобулинима-антителима против говеђих  
42 имуноглобулина класе Г (ИгГ) која су коњугована флуоресцентном бојом-флуоресцеин  
43 изотиоцијанатом. Тест се изводи у два корака. Први корак је инокулација ћелија, а други  
44 фиксирање ћелија и испитивање серума тестом индиректне имунофлуоресценције.

45 За утврђивање присуства специфичних антитела против вируса нодуларног  
46 дерматитиса у узорцима крвних серума, млека и колострума коришћен је комерцијални  
47 ID Screen® Capripox double antigen Multi-species-ELISA тест (Монпеље, Француска). Овај  
48 тест је заснован на откривању комплекса антиген–антитело ензимском реакцијом  
49 између ензима везаног за антиген и супстрата. Специфичност овог теста је према  
50 подацима произвођача ≥99,7%. Наменен је испитивању крвних серума и крвне плазме  
51 говеда, оваца и коза. Међутим, у овој студији је прилагођен и додатно коришћен за  
52 испитивање узорка млека и колострума. Испитивање узорака млека је вршено према  
53 упутству произвођача за крвни серум и плазму и уз модификацију времена инкубације  
54 узорка од 24 сата на 4 °C, као и граничне S/P% вредности која је била ≥10%. Узорци  
55 колострума су испитани само применом модификованог протокола, али према  
56 граничној вредности произвођача за крвне серуме и плазму односно S/P% ≥30.

57 Ланчана реакција полимеразе (PCR) је коришћена за откривање фрагмената генома  
58 вируса нодуларног дерматитиса у хематофагним инсектима и узорцима пореклом од  
59 пријемчивих животиња. Изолација вирусне ДНК из узорака брисева носа, брисева уста,  
60 крви са EDTA и мацерираних мува у PBS-у је вршена употребом комерцијалног кита

1 NucleoMag vet (Machey-Nagel GmbH, Немачка) и апарата (Thermo Scientific, Finska) за  
2 аутоматску изолацију. Сви узорци изоловане ДНК су испитани на присуство генома  
3 вируса нодуларног дерматитиса по методи описаној од стране Bowdena и сар. (2008) са  
4 модификацијом прајмера према Dietze и сар. (2018) за детекцију P32 гена. За интерну  
5 контролу изолације и амплификације је коришћен протокол описан од стране Hoffmanna  
6 и сар. (2006). Сви прајмери и пробе су синтетисани у компанији Метабион (Mantienried,  
7 Немачка). Real-Time PCR је изведен употребом комерцијалног кита PerfeCTa qPCR  
8 Tough Mix (Quanta BioSciences) у запремини од 25  $\mu$ l. За извођење Real-Time PCR  
9 реакције коришћен је уређај Bio Rad (Bio Rad CFX384 Touch™, Француска).  
10 За статистичку обраду резултата добијених испитивањем узорака крвних серума говеда  
11 коришћен је програм GraphPad Prisma верзија 7 (San Diego, CA, USA) и Фишиеров  
12 егзактни тест. Статистичка анализа резултата добијених испитивањем појединачних  
13 узорака млека крава из Србије ELISA тестом је рађена у RStudio Team програму (2015)  
14 (RStudio: Integrated Development for R. RStudios, Inc., Boston, MA) користећи пакет  
15 „Optimal Cutpoints“ за ROC анализу (Receiver operating characteristic). За утврђивање  
16 оптималне граничне вредности (*cut off*) постављен је услов максималне специфичности  
17 и израчунавање Youden индекса као мере ефикасности теста. За референтне  
18 вредности су узети резултати добијени испитивањем серума истих крава ELISA тестом.  
19 McNemar тест је коришћен за утврђивање статистичке значајности ( $p$ ) и вредности  $H^2$   
20 квадрата ( $\chi^2$ ) за резултате добијене испитивањем узорака млека из Србије ELISA  
21 тестом.  
22

23 У поглављу **Резултати** кандидат је систематизовано, у односу на постављене задатке,  
24 представио резултате истраживања.

25 Испитивањем активног имунског одговора вирус неутрализационом тестом позитивно је  
26 реаговало 27 животиња (35,06%) (титар антитела се кретао од 1:13 до 1:512). Након  
27 ревакцинације, број позитивних животиња је порастао на 60 (75,95%), као и титар  
28 антитела који се кретао од 1:16 до 1:640. Испитивањем узорака крвних серума  
29 прикупљених пет месеци након ревакцинације, број серопозитивних животиња је опао  
30 на 42 (56,76%), али је титар антитела остао стабилан (1:13 до 1:800). Упоредјујући  
31 резултате добијене испитивањем узорка крвних серума пре и после ревакцинације,  
32 утврђено је да је 5 животиња имало виши титар антитела пре ревакцинације, него  
33 после (320-256; 512-320; 256-200; 128-64 и 100-80). Такође, поређењем резултата  
34 добијених испитивањем узорка крвних серума пет месеци након ревакцинације са  
35 резултатима добијеним испитивањем узорка крвних серума месец дана након  
36 ревакцинације, 7 животиња је имало виши титар антитела пет месеци након  
37 ревакцинације (320-640; 256-512; 100-128; 50-800; 256-320; 80-128 и 25-40).

38 Слични резултати су добијени испитивањем тестом индиректне имунофлуоресценције  
39 (IFAT). Специфична антитела против вируса нодуларног дерматитиса тестом  
40 индиректне имунофлуоресценције су доказана код 26 (33,77%) животиња пре  
41 ревакцинације; титар антитела се кретао од 1:40 до преко 1:160. Број серопозитивних  
42 животиња као и титар антитела значајно су порасли након ревакцинације. Број  
43 позитивних животиња је износио 68 (86,08%), а титар антитела је био преко 1:160 код  
44 37 животиња. Међутим, пет месеци након ревакцинације, број серопозитивних  
45 животиња као и титар антитела су опали на 43 (58,11%) серопозитивне животиње а  
46 титар антитела од преко 1:160 установљен је код 19 животиња.

47 Присуство специфичних антитела ELISA тестом је утврђено код 26 (33,77%) животиња  
48 пре ревакцинације са S/P% вредношћу преко 200 код 6 животиња. Пораст броја  
49 серопозитивних животиња на 58 (73,42%) као и пораст S/P% вредности на преко 300  
50 код 3 животиње уочен је месец дана након ревакцинације. Број серопозитивних  
51 животиња је опао на 43 (58,11%) серопозитивне животиње 5 месеци након  
52 ревакцинације. Упркос истовременом тренду опадања S/P% вредности, 7 животиња је  
53 имало вишу S/P% вредност пет месеци након ревакцинације у поређењу са  
54 резултатима добијеним испитивањем крвних серума месец дана након ревакцинације  
55 (234-268; 116-306; 165-233; 178-318; 258-270; 306-323 и 20-117).

56 Према резултатима испитивања активног имунског одговора добијеним испитивањем  
57 крвних серума употребом сва три серолошка теста, детекција специфичних антитела  
58 против вируса нодуларног дерматитиса била је могућа у узорцима прикупљеним у сва  
59 три временска периода. Позитиван ефекат ревакцинације уочен је месец дана након  
60 ревакцинације повећањем броја серопозитивних животиња у односу на резултате

1 добијене пре ревакцинације. Код једног броја животиња није дошло до сероконверзије  
2 месец дана након ревакцинације (вирус неурализационим тестом 19; тестом  
3 индиректне имунофлуоресценције 10 и ELISA тестом 21).

4 За израчунавање осетљивости и специфичности теста индиректне  
5 имунофлуоресценције и ELISA теста, коришћени су резултати добијени испитивањем  
6 узорака крвних серума VNT. Осетљивост ELISA теста износила је 91%, а специфичност  
7 87%, док је осетљивост теста индиректне имунофлуоресценције износила 85%, а  
8 специфичност 86%. Узимајући резултате теста индиректне имунофлуоресценције као  
9 референтне, осетљивост ELISA теста износила је 88%, а специфичност 76%.

10 Статистички значајна разлика уочена је између резултата добијених испитивањем  
11 узорака крвних серума месец дана и пет месеци након ревакцинације у односу на  
12 резултате добијене испитивањем узорака крвних серума пре ревакцинације за сва три  
13 теста.

14 Испитивањем крвних серума свиња серопозитивних на суипоксвирус утврђено је да не  
15 постоји унакрсна серолошка реактивност употребом ELISA теста (S/P% вредности 0 и 1)  
16 што указује на добре перформансе овог теста за серолошку дијагностику нодуларног  
17 дерматитиса.

18 Узорци за испитивање пасивног имунског одговора, односно колострално пренетих  
19 антитела прикупљени су од 17 крава вакцинисаних у 2016. години и ревакцинисаних у  
20 2017. години. Утврђивање присуства колостралних антитела у крвном серуму телади  
21 било је могуће 14. дана старости код 9 телади вирус неурализационим и ELISA тестом,  
22 односно код 15 телади тестом индиректне имунофлуоресценције. Колострална  
23 антитела у крвном серуму телади старе 14 дана нису доказана код 1 телета вирус  
24 неурализационим тестом и код 3 телета тестом индиректне имунофлуоресценције  
25 иако су резултати испитиваних крвних серума мајки били позитивни. Упркос чињеници  
26 да су специфична антитела доказана у колоструму, код једног телета специфична  
27 антитела нису установљена у крвном серуму употребом вирус неурализационог и  
28 ELISA теста 14. дана старости. Са друге стране, једно теле је било позитивно  
29 применом теста индиректне имунофлуоресценције док је крвни серум његове мајке био  
30 негативан у свим употребљеним тестовима.

31 Резултати испитивања индивидуалних и збирних узорака млека пореклом од  
32 вакцинисаних крава из Републике Србије и невакцинисаних крава из Савезне  
33 Републике Немачке комерцијалним ELISA тестом, коришћени су за ROC анализу где су  
34 као референтне вредности послужили резултати добијени испитивањем крвних серума  
35 ELISA тестом крава од којих је узорковано млеко. Утврђено је да је оптимална гранична  
36 вредност за испитивање узорака млека комерцијалним ELISA тестом S/P%  $\geq 10$ , уколико  
37 се ROC анализом као услов постави максимална специфичност (100%). Коришћењем  
38 ове граничне вредности, остале карактеристике теста (осетљивост и предиктивне  
39 вредности) су боље када се узорци млека испитују модификованим протоколом (време  
40 инкубације узорка 24 сата на температури фрижидера). За израчунавање оптималне  
41 граничне вредности којом се обезбеђује максимална ефикасност теста, одређиван је  
42 Youden индекс. Боља вредност Youden индекса добијена је испитивањем појединачних  
43 узорака млека модификацијом времена инкубације узорка и износила је 0,7953318, у  
44 односу на резултате добијене испитивањем узорака млека према протоколу  
45 произвођача који су имали вредност Youden индекса 0,7854345. Број позитивних  
46 појединачних узорака млека према протоколу произвођача и граничној вредности S/P%  
47  $\geq 10$  пре ревакцинације износио је 3, месец дана након ревакцинације 18, а пет месеци  
48 након ревакцинације 17. Модификацијом времена инкубације и према граничној  
49 вредности S/P%  $\geq 10$ , број позитивних појединачних узорака млека пре ревакцинације је  
50 износио 5, месец дана након ревакцинације 21, а пет месеци након ревакцинације 22.  
51 Применом протокола произвођача, највећи проценат позитивних појединачних узорака  
52 млека установљен је код крава које су биле у лактацији дуже од 6 месеци. Међутим,  
53 модификацијом протокола, највећи проценат позитивних појединачних узорака млека  
54 детектован је код крава које су биле у лактацији до 3 месеца. Поређењем резултата  
55 добијених испитивањем појединачних узорака млека са резултатима испитивања  
56 крвних серума ELISA тестом, најусаглашеније резултате имале су краве које су имале  
57 високе S/P% вредности и дневно производиле до 15 литара млека. Утврђено је да је  
58 ELISA тест намењен испитивању збирних узорака ниже осетљивости у односу на  
59 испитивање појединачних узорака млека.

1 Испитивањем узорака млека са територије Савезне Републике Немачке ELISA тестом у  
2 циљу утврђивања специфичности комерцијалног ELISA теста, код две краве утврђена је  
3 гранична S/P% вредност од 10%.

4  
5 Методом Real-Time PCR ни у једном узорку није утврђено присуство генома вируса  
6 нодуларног дерматитиса. Успешном амплификацијом интерне контроле са распоном Ct  
7 вредности од 28,15 до 31,14 у свим узорцима потврђена је валидност теста, те  
8 искључена могућност инхибиције реакције и добијање лажно негативних резултата. На  
9 овај начин укупно је испитано 294 збирна (сачињена од 833 поједначна) узорка пуне  
10 крви са EDTA, брисева носа, уста и хематофагних инсеката.

11  
12 У поглављу **Дискусија**, сумирајући целокупне резултате истраживања, кандидат указује  
13 на предности и мане различитих серолошких тестова, као и на могућност употребе  
14 комерцијалног ELISA теста за испитивање млека применом протокола који је у овој  
15 докторској дисертацији валидован. Кандидат описује ефикасан трансфер колостралних  
16 антитела са мајки на телад где су ELISA тестом у серуму 81,82% телади чије су мајке  
17 имале антитела у колоструму, 14. дана старости детектована антитела. Будући да је  
18 код атенуираних вакцина познат ризик од излучивања вакциналног вируса у спољашњу  
19 средину и потенцијална реверзија вируленције, кандидат одсуство вируса у  
20 хематофагним инсектима, као и пријемчивим животињама, објашњава  
21 претпостављеном безбедношћу примењене вакцине, док висок проценат  
22 сероконверзије повезује са њеном ефикасношћу.

23  
24 У списку литературе, кандидат наводи 118 релевантних библиографских јединица од  
25 којих је 74% објављено у последњих 20 година, односно 48% у последњих 10 година.

## 26 27 **VI ЗАКЉУЧЦИ ИСТРАЖИВАЊА (навести закључке који су приказани у докторској** 28 **дисертацији):**

29  
30 На основу добијених резултата истраживања изведени су следећи закључци:

31 1. Антитела против вируса нодуларног дерматитиса су детектована од 46 до 47  
32 недеља након вакцинације код 35,06% животиња VNT и код 33,77% животиња IFAT и  
33 комерцијалним ELISA тестом.

34 2. Очекивано, резултати свих коришћених серолошких тестова су показали да је  
35 месец дана након ревакцинације дошло до статистички значајног повишења титра  
36 антитела у крвном серуму испитиваних животиња.

37 3. Поређењем резултата серолошких тестова (VNT, IFAT и комерцијални ELISA  
38 тест) добијених за сва три термина испитивања (пре ревакцинације, месец и пет месеци  
39 након ревакцинације) није установљена статистичка значајна разлика између тестова.  
40 С обзиром на то, може се закључити да предност у серолошким испитивањима има  
41 комерцијални ELISA тест, будући да је лакши за извођење, интерпретација добијених  
42 резултата је објективнија и нису потребни посебни лабораторијски капацитети  
43 укључујући и биосигурност, као што је случај са VNT и IFAT, због рада са живим  
44 вирусом нодуларног дерматитиса.

45 4. У односу на стандардни VNT, израчуната осетљивост IFAT за испитивање  
46 крвних серума говеда износила је 85%, а специфичност 86%, док је осетљивост  
47 комерцијалног ELISA теста била 91%, а специфичност 87%.

48 5. Поређењем резултата комерцијалног ELISA теста са резултатима IFAT као  
49 алтернативног теста, установљена је дијагностичка осетљивост од 88%, а  
50 специфичност од 76%.

51 6. Комерцијални ELISA тест је са успехом прилагођен и валидован за испитивање  
52 појединачних и збирних узорака млека, а израчуната идеална гранична вредност за  
53 услов максималне специфичности је била  $\geq 10$  S/P%.

54 7. Модификацијом протокола за испитивање узорака млека у односу на  
55 препоручено време инкубирања узорака крвног серума и плазме, добијене су више  
56 вредности дијагностичке осетљивости. Из тог разлога, у случајевима испитивања млека  
57 комерцијалним ELISA тестом, препоручује се инкубирање узорака 24 сата на  
58 температури фрижидера.

59 8. Установљен је ефикасан пасивни пренос колостралних антитела са мајки на  
60 телад који је био у директној вези са S/P% вредношћу која је добијена испитивањем

1 колострума комерцијалним ELISA тестом. Од укупног броја испитаних колострума,  
2 антитела против висруса нодуларног дерматитиса установљена су код 52,94% узорака.  
3 У односу на број позитивних узорака колострума, ефикасан пренос установљен је код  
4 81,82% телади употребом комерцијалног ELISA теста.

5 9. Испитивањем пуне крви с EDTA, брисева носа и уста није установљено  
6 присуство нуклеинске киселине вакциналног ни теренског соја вируса нодуларног  
7 дерматитиса код вакцинисаних животиња. Вирус није доказан ни у хематофагним  
8 инсектима који су сакупљани из окружења вакцинисаних животиња. Иако се ради о  
9 подручју где нодуларни дерматитис није дијагностикован, може се претпоставити да  
10 негативни резултати Real-Time PCR добијени на великом броју испитаних узорака  
11 указују да вакцинални вирус не перзистира у окружењу и не излучује се месец дана  
12 након ревакцинације.

### 13 14 **VII ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА** 15 **(навести да ли су добијени резултати у складу са постављеним циљем и** 16 **задацима истраживања, као и да ли закључци произилазе из добијених** 17 **резултата):**

18 Приказ и тумачење резултата истраживања су у складу са постављеним циљевима  
19 докторске дисертације. Добијене резултате кандидат је приказао табеларно,  
20 графиконима, картограмима, а у прегледу литературе су и две оригиналне фотографије  
21 оболелих животиња; описи и тумачења резултата су јасни, детаљни и свеобухватни, у  
22 складу са најновијим научним информацијама. Изведени закључци произилазе из  
23 добијених резултата, логични су и јасно формулисани.

### 24 25 26 **VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

#### 27 28 29 **1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави** 30 **теме?**

31 Докторска дисертација кандидата Милована Миловановића под насловом „Испитивање  
32 имунског одговора и присуства вакциналног и теренског соја вируса нодуларног  
33 дерматитиса код говеда и новорођене телади након вакцинације атенуираном  
34 вакцином“ је написана у складу са образложењем наведеним у пријави теме.

#### 35 36 **2. Да ли дисертација садржи све елементе прописане за завршену докторску** 37 **дисертацију?**

38 Докторска дисертација кандидата Милована Миловановића садржи све елементе и у  
39 складу је са захтевима који су прописани за завршену докторску дисертацију

#### 40 41 **3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?**

42 У докторској дисертацији Милована Миловановића, оригинални допринос науци огледа  
43 се у систематском и свеобухватном испитивању активног и пасивног имунског одговора  
44 различитим серолошким методама након вакцинације говеда атенуираном вакцином  
45 против нодуларног дерматитиса. Валидација и прилагођавање протокола  
46 комерцијалног ELISA теста, који је намењен испитивању крвних серума, за испитивање  
47 млека, следећи императив неинвазивног узорковања, додатно доприноси  
48 оригиналности овог истраживања. Истраживање овог типа за нодуларни дерматитис  
49 говеда је први пут спроведено у нашој земљи и има не само национални већ и  
50 интернационални значај, с обзиром на веома ограничена искуства у вези са избијањем,  
51 контролом и ерадикацијом ове болести у европским земљама. Добијени резултати ће  
52 бити од великог значаја у завршним фазама ерадикације болести, пред престанак  
53 вакцинације.

54 Имајући у виду да су у овој дисертацији вршена испитивања присуства теренског и/или  
55 вакциналног соја вируса нодуларног дерматитиса у хематофагним инсектима и  
56 пријемчивим животињама, добијени резултати представљају прве показатеље  
57 ефикасности примењених мера за сузбијање и искорењивање нодуларног дерматитиса  
58 будући да вирус није доказан ни у једном од испитиваних узорака.



1 Истраживања спроведена у оквиру ове докторске дисертације су део пројекта ев. бр. TP  
2 31088 и ев. бр. TP 31075 које финансира Министарство просвете, науке и технолошког  
3 развоја Републике Србије.

4  
5 **4. Да ли је ментор током провере оригиналности дисертације утврдио**  
6 **неоправдано преклапање текста са другим публикацијама (одговорити са да или**  
7 **не):**  
8 **НЕ**

9  
10 **IX СПИСАК НАУЧНИХ РАДОВА САДРЖИНСКИ ПОВЕЗАНИХ СА ДОКТОРСКОМ**  
11 **ДИСЕРТАЦИЈОМ У КОЈИМА ЈЕ ДОКТОРАНД ПРВИ АУТОР ОДНОСНО АУТОР СА**  
12 **НЕЈВЕЋИМ ДОПРИНОСОМ (написати имена свих аутора, годину објављивања,**  
13 **наслов рада, назив часописа, импакт фактор и класификацију према Правилнику**  
14 **о поступку, начину вредновања и квантитативном исказивању**  
15 **научноистраживачких резултата истраживача):**

16  
17 **Milovan Milovanović**, Klaas Dietze, Vesna Milićević, Sonja Radojčić, Miroslav Valčić,  
18 Tom Moritz and Bernd Hoffmann; 2019 Humoral immune response to repeated lumpy skin  
19 disease virus vaccination and performance of serological tests, BMC Veterinary Research,  
20 2019; **15**:80, ИФ-1,958 (2017) петогодишњи ИФ-2,221, M21-врхунски међународни  
21 часопис

22  
23  
24 **X ПРЕДЛОГ:**

25  
26 **На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже (одабрати једну од**  
27 **три понуђених могућности):**

28 - да се докторска дисертација прихвати а кандидату одобри одбрана

29  
30  
31  
32 **ДАТУМ**  
33 6.5. 2019. године

**ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ**

34  
35  
36  
37 \_\_\_\_\_  
38 Др Соња Радојичић, редовни професор,  
39 Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

40  
41  
42 \_\_\_\_\_  
43 Др Весна Милићевић, научни сарадник,  
44 Научни институт за ветринарство Србије Београд

45  
46  
47 \_\_\_\_\_  
48 Др Мирослав Валчић редовни професор  
49 Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

50  
51  
52 \_\_\_\_\_  
53 Др Јаков Нишавић, ванредни професор  
54 Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду  
55  
56