

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 у Београду, на 161. седници
11 од 25.11.2015. године.

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

17
18 1. Др Мирослав Валчић, редовни професор, Епизоотиологија, заразне болести животиња и
19 болести пчела, 2010., Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду.

20 2. Др Тамаш Петровић, виши научни сарадник, Микробиологија и инфективне болести,
21 2011., Научни институт за ветеринарство Нови Сад, Нови Сад.

22 3. Др Олга Дуловић, редовни професор, 2011., Инфективне болести, Медицински
23 факултет Универзитета у Београду.

24 4. Др Зоран Кулишић, редовни професор, Паразитологија, 2002., Факултет
25 ветеринарске медицине Универзитета у Београду.

26 5. Др Душан Мишић, ванредни професор, 2014., Микробиологија са имунологијом,
27 Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду.

28
29 **II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:**

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

32 Ана (Марко) Васић

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

35 03.06.1982., Савски венац, Београд, Република Србија

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 **III НАСЛОВ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

42
43 **УПОРЕДНА АНАЛИЗА СЕРОЛОШКИХ МЕТОДА У ДИЈАГНОСТИЦИ**
44 **ИНФЕКЦИЈЕ ВИРУСОМ ЗАПАДНОГ НИЛА**

1
2 **IV ПРЕГЛЕД ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (навести броја страна поглавља, слика,**
3 **шема, графикона и сл.):**

4 Докторска дисертација Ане Васић написана је на 192 стране текста и садржи следећа
5 поглавља: Увод (4 стране), Преглед литературе (40 страна), Циљеви и задаци
6 истраживања (1 страна), Материјал и методе истраживања (18 страна), Резултати
7 истраживања (45 страна), Дискусија (8 страна), Закључци (1 страна), Списак литературе
8 (20 страна) и Прилози (49 страна). На почетку дисертације дат је кратак садржај на
9 српском и енглеском језику. Дисертација је документована са 37 табела, 15 графикона,
10 19 слика и једном мапом.

11
12 **V ВРЕДНОВАЊЕ ПОЈЕДИНИХ ДЕЛОВА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ (дати кратак**
13 **опис сваког поглавља дисертације: увода, прегледа литературе, циља и задатака**
14 **истраживања, материјал и метода, резултата, дискусије, списка референци):**

15 У **Уводу** кандидат истиче да је грозница Западног Нила (*West Nile Fever*) вирусом
16 изазвана зооноза коју преносе инсекти-артропode. Вирус Западног Нила (*West Nile*
17 *virus-WNV*) је класификован у род *Flavivirus* фамилије *Flaviviridae*. Припада групи
18 Арбовируса (ARBO-Arthropode-borne virus). Вирус Западног Нила је први пут изолован
19 1937. године из крви човека са симптомима грознице у West Nile дистрикту у северном
20 делу Уганде. Током последње деценије се брзо проширио Европом изазивајући
21 епизоотије и епидемије са смртним исходима. Поред опасности по здравље животиња
22 и људи, *WNV* изазива и значајне директне и индиректне материјалне штете. У природи
23 вирус циркулише између вектора-артропода, птица које су прави домаћини и
24 резервоари у природи, и сисара и рептила који су случајни домаћини. До сада је
25 идентификован велики број врста комараца који преносе *WNV*, а припадају родовима
26 *Aedes*, *Anopheles*, *Coquillettidia*, *Culex*, *Culiseta*, *Deinocerites*, *Mansonia*, *Orthopodomyia*,
27 *Psorophora*, *Uranotaenia* и др. Постоје подаци о изолацији *WNV* из неколико различитих
28 врста крпеља, па се сматра да и они представљају резервоаре вируса у природи и
29 потенцијалну опасност за преношење вируса. Од грознице Западног Нила најчешће и
30 са најтежим последицама обољевају људи и еквида, мада је пријемчив и велики број
31 других врста животињских врста. Серолошке дијагностичке методе су у широкој
32 употреби првенствено због могућности индиректног доказивања присуства патогена код
33 живих јединки утврђивањем специфичних антитела. Од великог броја серолошких
34 метода препоручени су имуноензимска метода (*ELISA*) за детекцију IgM и IgG, метода
35 хемаглутинације-инхибиције хемаглутинације, метода редукције и неутрализације
36 плакова (*PRNT*), и неутрализација вируса (*VNT*). Сматра се да је метода редукције и
37 неутрализације плакова најспецифичнија од свих серолошких метода за откривање
38 присуства специфичних антитела за *WNV*, али се ова метода може да изводи само у
39 добро опремљеним специјализованим лабораторијама. Свака серолошка метода има
40 своју употребну вредност, али најчешће извођење само једне методе није довољно за
41 сигурно постављање дијагнозе те се најчешће примењује више тестова истовремено. У
42 доступним литературним подацима није утврђена значајна разлика између резултата

1 добијених употребом „*in house*” тестова и комерцијалих дијагностичких китова. Избор
2 најадекватнијих дијагностичких метода и дефинисање карактеристика доступних
3 тестова за примену у лабораторијама различитог степена опремљености има велики
4 значај за брзу и правовремену примену мера у циљу контроле болести и заштите
5 здравља животиња и људи. При тумачењу резултата серолошких тестова за *WNV*
6 треба обратити пажњу на могућност унакрсне реактивности са другим вирусима као
7 што су вирус Јапанског енцефалитиса, вирус крпељског енцефалитиса, Усуту вирус и
8 др. Одређивање серопреваленције омогућава константно праћење кретања-
9 циркулације *WNV* на одређеној територији и израду мапа распрострањености. Због
10 неповољне епизоотиолошко-епидемиолошке ситуације у Републици Србији ово је од
11 посебног значаја ради правовременог деловања на сузбијању вектора-комараца и
12 спречавању појаве болести у епидемијским и епизоотијским размерама.

13 У поглављу **Преглед литературе** говори се о открићу *WNV* где се наводи да је пацијент
14 из чије крви је изолован вирус имао симптоме грознице, а да је изоловани вирус
15 неуротропан. Вирус је сврстан у фамилију *Flaviviridae* и род *Flavivirus*. Припада
16 серокомплексу Јапанског енцефалитиса на основу параметара унакрсне реактивности
17 поликлонских серума . У прегледу литературе говори се о особинама вируса, структури
18 и филогенетској анализи изолата *WNV* где се наводи да је утврђено постојање осам, а
19 потенцијално девет генетских линија вируса. У делу који се односи на циклус кружења
20 у природи наводи се да су птице прави домаћини вируса, а да у споредним токовима
21 инфекције обољева велики број сисара и човек. Способност преношења вируса има
22 велики број врста комараца, а у Европи главне врсте комараца које преносе *WNV*
23 припадају родовима *Culex* и *Coquillettidia*. Значајна је појава нових-инвазивних врста
24 комараца која се дешава заједно са померањем климатских зона. Ови инсекти
25 потенцијално доносе нове патогене и шире већ постојеће у екосистемима. Даље се
26 говори о утицају *WNV* на имуни систем домаћина и одговору на деловање вируса,
27 клиничкој слици, патоморфолошком налазу и диференцијалној дијагностици грознице
28 Западног Нила код коња, људи и паса. У делу који се односи на епидемиолошку
29 ситуацију у свету и Европи приказује се ситуација до 2010. године и после 2010.године.
30 Описују се: прве епидемије *WNV* у Израелу (када су добијени први подаци о клиничкој
31 слици неуроинвазивног обољења и када је примећена веза између старости оболелих и
32 тежине клиничке слике), прва истраживања у Египту (када су утврђене прве
33 епидемиолошке карактеристике *WNV*), највећа забележена епидемија 1974. године у
34 Јужноафричкој Републици, прве појаве *WNV* у Европи, први изолати вируса који потичу
35 из 1963. године из делте реке Роне и реке Волге, као и резултати првих серолошких
36 испитивања на територији Републике Србије. Даље се наводе подаци о забележеним
37 епидемијама и епизоотијама у Европи, као и ширење *WNV* на североамерички
38 континент током 1999. године. Детаљно је описана епидемиолошка ситуација у
39 европским земљама после 2000. године са табеларним и графичким приказима броја
40 оболелих по земљама од 2010. године до 2014. године. Приказани су епизоотиолошки и

1 епидемиолошки подаци за Републику Србију после 2000. године где су
2 систематизовани доступни литературни подаци. На крају прегледа литературе дат је
3 осврт на серолошке методе у дијагностици присуства специфичних антитела за *WNV*.

4 Основни **Циљ истраживања** у оквиру ове докторске дисертације је био да се направе
5 „*in house*“ тестови (*AGID*, *IFA* и *ELISA*) за серолошку дијагностику *WNV* и да се упореде
6 добијени резултати „*in house*“ тестова са резултатима комерцијално доступних тестова.
7 Одређивана је осетљивост и специфичност тестова ради утврђивања најпогоднијих за
8 откривање инфекције *WNV*. Применом поменутих тестова утврђена је
9 серопреваленција у популацијама испитиваних врста (коњи, људи и пси) на одабраним
10 локалитетима, што је омогућило мапирање угрожених подручја и дефинисање мера
11 контрола и сузбијања болести.

12 За остварење циљева истраживања постављени су следећи **Задаци**:

- 13 1. Припрема „*in house*“ тестова (*AGID*, *IFA*, *ELISA*) за серолошку дијагностику *WNV* који
14 ће бити специфични и осетљиви, а истовремено економски прихватљиви.
- 15 2. Поређење резултата добијених применом „*in house*“ серолошких тестова (*ELISA*, *IFA*)
16 и комерцијално доступних тестова у циљу одређивања осетљивости и
17 специфичности употребљених тестова, што је од великог значаја за поуздану
18 дијагностику ове вирусне инфекције.
- 19 3. Утврђивање серопреваленције у популацијама испитиваних врста (коња, паса и
20 људи) на одабраним локалитетима на територији Републике Србије.
- 21 4. Прелиминарно обележавање и мапирање угрожених подручја на територији
22 Републике Србије.
- 23 5. Дефинисање мера контроле и сузбијања инфекције *WNV* код наведених врста.

24 У поглављу **Материјал и методе истраживања** дати су детаљи експерименталног
25 рада. У циљу испитивања серопреваленције антитела за *WNV* извршено је узорковање
26 укупно 303 крвна серума одраслих коња са 10 одабраних локалитета на територији
27 Републике Србије у периоду од краја 2011. до почетка 2014. године, 184 крвна серума
28 паса са десет изабраних локалитета у периоду од 2011.-2014. године и 153 крвна
29 серума људи у периоду од 2012. до 2013. године. Наводи се материјал потребан за
30 умножавање вируса, као и материјал потребан за добијање специфичног имуног
31 серума. Описују се: одређивање концентрације протеина по *Lowry*-у (*Folin-Ciocalteu*
32 *metod*), агар гел имунодифузиона метода (у оквиру које се описује основни принцип
33 методе и процедура коришћена у раду, те процедура и материјал потребан за припрему
34 антигена и агар гела, као и само извођење реакције), метода индиректне
35 имунофлуоресценције (наведен опис потребног материјала, опреме, процедура
36 припреме антигена, испитиваних узорака, извођење реакције и тумачење резултата за
37 „*in house*“ тест, потребна флуоресцеин обележена антитела против људих, коњских,
38 псећих и мишијих антитела, антигена, контролних серума и процедура извођења
39 реакције и евалуација резултата за комерцијално доступан тест), имуноензимски метод
40 (дата је процедура припреме „*in house*“ теста кроз опис припреме антигена, анализе

1 концентрације протеина, одређивања радног разређења, употребљених пероксидаза
2 коњугованих антитела класе IgG против људих, коњских, псећих и мишјих антитела,
3 валидација и одређивање границе позитивних и негативних вредности, као и процедура
4 извођења и валидација резултата комерцијално доступног теста). Наводи се програм
5 коришћен за географско мапирање. У поглављу статистичка обрада добијених
6 резултата описан је *McNemar*-ов тест којим је проверавана полазна хипотеза о
7 непостојању разлика између примењених „*in house*“ и комерцијално доступних тестова и
8 анализа осетљивости и специфичности „*in house*“ тестова.

9 У поглављу **Резултати** приказани су резултати испитивања концентрације протеина
10 методом по Lowry-у где је добијена вредност укупних протеина за направљени антиген
11 за „*in house*“ ЕЛИСА тест од 2.529 mg/ml. Даље су приказани добијени резултати
12 примене серолошких „*in house*“ и комерцијално доступних тестова на узорцима крвних
13 серума коња, паса и људи.

14 **Приказ резултата истраживања крвних серума коња-1.** Методом агар гел
15 имунодифузије прегледано је 303 серума коња и установљено је да је 17 узорка (5.61%)
16 позитивно, 0 (0%) сумњиво, а 286 (94.39%) негативно. По годинама забележено је да је
17 током 2011. године од 21 прегледаног узорка 0 позитивно, 0 сумњиво и 21 (100%)
18 негативно, током 2012. године од 197 прегледаних узорака проценат позитивних
19 износио 17 (8.63%), сумњиво је било 0% а негативно 180 (91.37%), док је 2013. године
20 од 85 узорака 0 (0%) било позитивно, а 85 (100%) негативно, док сумњивих реакција
21 није било. Дат је приказ резултата у односу на локалитет узорковања где је највећи број
22 позитивних узорака забележен на широј територији града Београда током 2012. године.

23 2. Методом индиректне имунофлуоресценције узорци су испитани применом „*in house*“
24 и комерцијалног теста. Применом „*in house*“ теста индиректне имунофлуоресценције
25 прегледано је 303 серума коња и установљено је да је 108 узорка (35.64%) позитивно, 0
26 (0%) сумњиво, а 195 (64.36%) негативно. По годинама забележено је да је током 2011.
27 године од 21 прегледаног узорка 4 (19.05%) било позитивно, 0 сумњиво и 17 (80.95%)
28 негативно. Током 2012. године од 197 прегледаних узорака проценат позитивних
29 износио 31.98%, сумњиво је било 0% а негативно 68.02%, док је 2013. године од 85
30 узорака 41 (48.24%) било позитивно, 0 (0%) сумњиво, а 44 (51.76%) негативно.
31 Приказани су уочени титри специфичних антитела за *WNV* по годинама узорковања, где
32 је током 2011. године од 4 позитивна узорка 2 имало титар 1:16, 2 титар 1:64, 2012.
33 године од 63 позитивних узорака 23 имало титар 1:16, 6 титар 1:32, 14 титар 1:64, 7
34 титар 1:128, 5 титар 1:256, 4 титар 1:512, 3 титар 1:1024 и 1 титар 1:2048. Током 2013.
35 године од 41 позитивног узорка 21 је имало титар 1:16, 7 титар 1:32, 6 титар 1:64, 1
36 титар 1:128, 3 титар 1:256, 2 титар 1:512, 1 титар 1:1024 и 0 титар 1:2048. Приказан је
37 резултат прегледа серума коња по локалитетима где су регистроване серопозитивне
38 животиње на 9 од 10 испитиваних локалитета. Применом комерцијално доступног теста
39 индиректне имунофлуоресценције прегледано је 234 серума коња и установљено је да
40 је 75 узорака (32.05%) позитивно, 8(3.42%) сумњиво, а 151 (64.53%) негативно. По

1 годинама уочено је да је током 2011. године од 15 прегледаних узорака 6 (40.0%)
2 позитивно, 0 сумњиво и 9 (60.0%) негативно. Током 2012. године од 135 прегледаних
3 узорака проценат позитивних износио је 25.93%, сумњиво је било 4.44% а негативно
4 69.63%, док је 2013. године од 84 узорака 34 (40.48%) било позитивно, 2 (2.38%)
5 сумњиво, а 48 (57.14%) негативно. Дат је преглед серопозитивних животиња по
6 испитиваним локалитетима при чему је забележена серопозитивност у 9 од 10
7 испитиваних локалитета.

8 3. Имуноензимском методом узорци су испитани применом „*in house*“ и комерцијалним
9 тестом. Применом „*in house*“ имуноензимског теста прегледан је 301 крвни серум коња
10 и установљено је да је 81 узорак (26.91%) позитиван, 12 (3.99%) сумњиво, а 208
11 (69.10%) негативно. По годинама забележено је да је током 2011. године од
12 прегледаних 21 узорака 3 (14.29%) позитивно, 1 (4.76%) сумњив, а 17 (80.95%)
13 негативно. Током 2012. године од 195 прегледаних узорака проценат позитивних
14 износио је 32.2%, сумњиво је било 9 (4.62%), а негативно 123 (63.08%), док је 2013.
15 године од 85 узорака 15 (17.65%) било позитивно, 2 (2.35%) сумњиво, а 68 (80.0%)
16 негативно. Дат је преглед броја серопозитивних животиња по испитиваним
17 локалитетима при чему је забележена серопозитивност у 6 од 10 испитиваних
18 локалитета. Применом комерцијално доступног имуноензимског анти- PrE теста
19 прегледан је 301 серум коња и установљено је да је 57 узорка (19.94%) позитивно, 1
20 (0.33%) сумњив, а 243 (80.73%) негативно. По годинама уочено је да је током 2011.
21 године од 21 узорка 2 (9.52%) позитивно, 0 сумњиво и 19 (90.48%) негативно. 2012.
22 године од 197 прегледаних узорака проценат позитивних износио је 10.66%, сумњиво је
23 било 1 (0.51%) а негативно 175 (88.83%), док је 2013. године од 83 узорака 34 (40.96%)
24 тестирано позитивно, 0 сумњиво, а 49 (59.04%) негативно. Дат је серопозитивних
25 животиња по испитиваним локалитетима при чему је забележена серопозитивност 9 од
26 10 испитиваних локалитета. Применом *McNemar*-овог теста утврђено је да између „*in*
27 *house*“ и комерцијално доступног теста индиректне имунофлуоресценције, као и „*in*
28 *house*“ и комерцијално доступног имуноензимског IgG теста нема статистички значајне
29 разлике. Поређењем дијагностичке вредности агар гел имунодифузионог теста са
30 имуноензимским тестом и тестом индиректне имунофлуоресценције показано је да
31 постоје статистички значајне разлике између агар гел имунодифузионог теста и „*in*
32 *house*“ и комерцијалног ИФА и ЕЛИСА теста. Одређивањем осетљивости и
33 специфичности добијени су следећи резултати: „*In house*“ ИФА тест у поређењу са
34 комерцијално доступним тестом на узорцима серума коња имао је осетљивост од 94%
35 и специфичност 90%, „*In house*“ ELISA тест у поређењу са комерцијално доступним
36 тестом код коња је показао осетљивост од 26% и специфичност 70%. AGID тест у
37 поређењу са „*in house*“ IFA тестом код коња је показао осетљивост од 0% и
38 специфичност 100%. У поређењу са „*in house*“ ELISA осетљивост је била 48% и
39 специфичност 100%. Упоредни резултати дијагностичких тестова на крвним серумима
40 коња дати су у Прилогу 2.

1 **Приказ резултата истраживања крвних серума паса-1.** Методом агар гел
2 имунодифузије прегледано је 184 серума паса и нису установљени позитивни узорци.
3 2. Примена „*in house*“ и комерцијално доступног теста није била могућа, јер у оба
4 случаја уз добре резултате контролних серума није било могуће да се установи
5 присуство сигурно позитивне имунофлуоресцентне реакције.
6 3. ЕЛИСА тестом узорци су испитани применом „*in house*“ и комерцијално доступног
7 теста. Применом „*in house*“ имуноензимског IgG теста прегледано је 184 крвних серума
8 паса и установљено је да је 34 узорка (18.48%) позитивно, 7 (3.8%) сумњиво, а 143
9 (77.72%) негативно. По годинама забележено је да је током 2011. године од
10 прегледаних 30 узорака 10 (33.33%) позитивно, 2 (6.67%) сумњиво, 18 (60.0%)
11 негативно. Током 2012. године од 74 прегледаних узорака проценат позитивних износио
12 је 9.46%, сумњив је био 1 (1.35%), а негативно 66 (89.19%), док је 2013. године од 80
13 узорака 17 (21.25%) тестирано позитивно, 4 (5.0%) сумњиво, а 59 (73.75%) негативно.
14 Дат је преглед серопозитивних животиња по испитиваним локалитетима при чему је
15 забележена серопозитивност у 9 од 10 испитиваних локалитета. Применом
16 комерцијално доступног имуноензимског теста прегледано је 184 серума паса и
17 установљено је да је 59 узорка (32.07%) позитивно, 1 (0.54%) сумњиво, а 124 (67.39%)
18 негативно. По годинама забележено је да је током 2011. године од 30 узорка 9 (30.0%)
19 позитивно, 0 сумњиво и 21 (70.0%) негативно. Током 2012. године од 74 прегледаних
20 узорака проценат позитивних износио 16.22%, сумњиво је било 0, а негативно 62
21 (83.78%), док је 2013. године од 80 узорака 38 (47.5%) било позитивно, 1 (1.25%)
22 сумњиво, а 41 (48.25%) негативно. Дат је преглед серопозитивних животиња по
23 испитиваним локалитетима при чему је забележена серопозитивност у 10 од 10
24 испитиваних локалитета. Применом *McNemar*-овог теста утврђено је да између „*in*
25 *house*“ и комерцијално доступног имуноензимског теста постоји статистички значајна
26 разлика. Поређењем дијагностичке вредности агар гел имунодифузионог теста са
27 имуноензимским тестом показано је да постоје статистички значајне разлике између
28 агар гел имунодифузионог теста и „*in house*“ и комерцијално доступног ЕЛИСА теста.
29 Одређивањем осетљивости и специфичности добијени су следећи резултати: „*In house*“
30 ELISA тест у поређењу са комерцијално доступним тестом код паса је показао
31 осетљивост од 0% и специфичност 87,5%. Упоредни резултати дијагностичких тестова
32 на крвним серумима паса дати су у Прилогу 3.

33 **Приказ резултата истраживања крвних серума људи-1.** Методом агар гел
34 имунодифузије прегледано је 152 серума људи и установљено је да је 22 узорка
35 (14.47%) позитивно, 8 (5.27%) сумњиво, а 122 (80.26%) негативно. По годинама
36 забележено је да је током 2012. године од 41 прегледаног узорка проценат позитивних
37 износио 9.76%, сумњиво је било 19.51% на основу критеријума присуства
38 преципитинске линије слабијег интензитета од позитивне контроле, а негативно 70.73%,
39 док је 2013. године од 111 тестираних узорака 18 (16.22%) било позитивно, а 93
40 (83.78%) негативно, док сумњивих реакција није било. Приказане су случајне

1 забележене реакције испитиваних серума са негативним и позитивним контролним
2 серумима миша добијених имунизацијом, те појава зоне инхибиције реакције у два
3 случаја што све указује на могуће присуство и других патогена.

4 2. Методом индиректне имунофлуоресценције узорци су испитани применом „*in house*“
5 и комерцијално доступног теста. Применом „*in house*“ теста индиректне
6 имунофлуоресценције прегледано је 152 серума људи и установљено је да је 114
7 узорка (75.0%) позитивно, 1 (0.66%) узорка сумњив, а 37 (24.34%) негативно. По
8 годинама забележено је да је током 2012. године од 41 прегледаног узорка проценат
9 позитивних износио 60.98%, сумњиво је било 0% а негативно 39.02%, док је 2013.
10 године од 111 узорка 89 (80.18%) било позитивно, 1 (0.9%) сумњиво, а 21 (18.92%)
11 негативно. Приказани су уочени титри специфичних антитела за *WNV* по годинама
12 узорковања, где је током 2012. године од 25 позитивних узорка 1 имао титар 1:16, 0
13 титар 1:64, 1 титар 1:128, 2 титар 1:256, 3 титар 1:512, 11 титар 1:1024 и 7 титар 1:2048.
14 Током 2013. године од 89 позитивних узорка 14 је имало титар 1:16, 3 титар 1:64, 6
15 титар 1:128, 6 титар 1:256, 3 титар 1:512, 18 титар 1:1024 и 39 титар 1:2048. Применом
16 комерцијално доступног теста индиректне имунофлуоресценције прегледано је 153
17 серума људи и установљено је да је 113 узорка (73.86%) позитивно, 0 (0%) сумњиво, а
18 40 (26.14%) негативно. По годинама, забележено је да је током 2012. године од 41
19 прегледаног узорка проценат позитивних износио 65.85%, сумњиво је било 0% а
20 негативно 34.15%, док је 2013. године од 112 узорка 86 (76.79%) је било позитивно, 0
21 (0%) сумњиво, а 26 (23.21%) негативно.

22 3. ЕЛИСА методом узорци су испитани применом „*in house*“ и комерцијално доступним
23 тестом. Применом „*in house*“ ЕЛИСА теста прегледано је 153 серума људи и
24 установљено је да је 20 узорка (13.07%) позитивно, 13 (8.5%) сумњиво, а 120 (78.43%)
25 негативно. По годинама забележено је да је током 2012. године од 41 прегледаног
26 узорка проценат позитивних износио 19.51%, сумњиво је било 3 (7.32%) на основу
27 присуства преципитинске линије мањег интензитета од позитивне контроле, а
28 негативно 30 (73.17%), док је 2013. године од 112 узорка 12 (10.71%) било позитивно,
29 10 (8.93%) сумњиво, а 90 (80.36%) негативно. Применом комерцијално доступног
30 имуноензимског IgM теста прегледано је 76 серума људи и установљено је да је 57
31 узорка (75.0%) позитивно, 0 (0%) сумњиво, а 19 (25.0%) негативно. По годинама
32 забележено је да је током 2012. године од 39 прегледаних узорка проценат позитивних
33 износио 53.85%, сумњиво је било 0% а негативно 46.15%, док је 2013. године од 37
34 узорка 36 (97.3%) било позитивно, 0 (0%) сумњиво, а 1 (2.7%) негативно. Применом
35 комерцијално доступног имуноензимског IgM теста прегледано је 73 узорка ликвора
36 људи и установљено је да је 48 узорка (65.75%) позитивно, 3 (4.11%) сумњива, а 22
37 (30.14%) негативна. По годинама забележено је да је током 2012. године од 36
38 прегледаних узорка проценат позитивних износио 36.11%, сумњиво је било 8.33 % а
39 негативно 55.56%, док је 2013. године од 37 узорка 35 (94.59%) било позитивно, 0 (0%)
40 сумњиво, а 2 (5.41%) негативно. Применом комерцијално доступног имуноензимског IgG

1 теста прегледано је 75 серума људи и установљено је да је 19 узорака (25.33%)
2 позитивно, 9 (12.0%) сумњиво, а 47 (62.67%) негативно. По годинама забележено је да
3 је током 2012. године од 39 прегледаних узорака проценат позитивних износио 30.77%,
4 сумњиво је било 5 (12.82)%, а негативно 22 (56.41%), док је 2013. године од 36 узорака
5 7 (19.44%) било позитивно, 4 (11.11%) сумњиво, а 25 (69.45%) негативно. Применом
6 McNemar-овог теста утврђено је да између „in house“ и комерцијално доступног теста
7 индиректне имунофлуоресценције, као и „in house“ и комерцијално доступног
8 имуноензимског IgG теста нема статистички значајне разлике. Статистички значајна
9 разлика је утврђена између „in house“ и комерцијалног имуноензимског IgM теста.
10 Поређењем резултата добијених агар гел имунодифузионим тестом са тестом
11 индиректне имунофлуоресценције утврђено је да постоје статистички значајне разлике
12 између АГИД и „in house“ ИФА теста и између АГИД и комерцијалног ИФА теста.
13 Статистички значајне разлике нису утврђене између агар гел имунодифузионог теста и
14 „in house“ ЕЛИСА теста, као и између агар гел имунодифузионог теста и комерцијалног
15 ЕЛИСА IgG теста. Статистички значајна разлика је постојала између АГИД и
16 комерцијалног ЕЛИСА IgM теста. Одређивањем осетљивости и специфичности
17 добијени су следећи резултати: „in house“ ИФА тест у поређењу са комерцијално
18 доступним тестом на узорцима људи имао је осетљивост од 89% и специфичност 62%,
19 „in house“ ELISA тест у поређењу са комерцијално доступним IgG тестом код људи је
20 показао осетљивост од 20% и специфичност 84%. AGID тест у поређењу са „in house“
21 IFA тестом код људи је показао остљивост од 17% и специфичност 94.5%. У поређењу
22 са „in house“ ELISA осетљивост је била 13.2% и специфичност 86.8%. Упоредни
23 резултати дијагностичких тестова на крвним серумима људи дати су у Прилогу 1.
24 Приказана је мапа установљене серопозитивности по животињским врстама и људима.
25 У **дискусији** истиче се да је WNV само један у групи од 550 вируса које преносе
26 инсекти. Човек долази у контакт са природним жариштем, нарушава еколошку
27 равнотежу и активира га при чему је он случајни домаћин. Изолацијом и
28 категоризацијом WNV стекле су се могућности за свеобухватнија сероепидемиолошка
29 и сероепизоотиолошка истраживања. Први подаци о сероепидемиологији за Републику
30 Србију потичу из 1972. године када је забележена серопозитивност била од 0% у
31 региону Санџака и Новог Пазара до 19.4% у региону Западне Србије. Због неповољне
32 епидемиолошке ситуације у Републици Србији од 2010. године, а пре забележене
33 епидемије спроводе се обимна циљана истраживања одабиром локалитета, врста
34 пријемчивих животиња и људи и серолошких метода. Резултати истраживања показују
35 да постоји повећање серопреваленције за WNV у популацији људи и животиња, што је у
36 сагласности са резултатима приказаним у овој дисертацији. Када се разматра
37 употребна вредност дијагностичких тестова велики број лабораторија је увео „in house“
38 дијагностичке тестове заједно са применом комерцијално доступних тестова, при чему
39 нису уочене значајне разлике у вредности резултата између ових тестова, што се
40 показало и кроз резултате ове дисертације. WNV као флавиовирус показује висок степен

1 унакрсне реактивности са другим присутним флавиовирусима када се користе ИФА и
2 ЕЛИСА тестови, што умногоме компликује добијање тачног резултата применом само
3 једног дијагностичког теста. Приликом избора дијагностичког теста треба водити рачуна
4 да је могућност детекције *WNV* линије 1 била већа у односу на скорије присутну линију
5 2, те да линија вируса који је проузроковао инфекцију има утицаја на прецизност
6 лабораторијске дијагностике. Такође, динамика развоја специфичних антитела за *WNV*
7 има утицаја на тумачење резултата серолошких тестова. Резултати испитивања крвних
8 серума људи показују велики број позитивних серума пошто се ради о серумима
9 оболелих из епидемије 2012. и 2013. године. Одсуство великог процента позитивних
10 налаза АГИД тестом се може приписати времену узорковања серума у односу на
11 настанак инфекције, пошто се преципитинска антитела најраније могу наћи после 3
12 недеље од почетка инфекције, а одржавају се до 4 месеца. Статистички, поређењем
13 АГИД теста са ЕЛИСА и ИФА тестом показано је да не постоје статистички значајне
14 разлике само између АГИД и ЕЛИСА тестова, што је у сагласности са податком из
15 литературе по коме је ИФА метод више осетљивости и специфичности у односу на
16 ЕЛИСА метод. Резултати прегледа серума ИФА методом су показали високу
17 подударност резултата, а томе у прилог говори и одсуство статистички значајне
18 разлике између „*in house*“ и комерцијално доступног теста што је у сагласности са
19 литературним подацима. Ово говори у прилог да је ИФА и у нашем истраживању
20 адекватнији метод за серолошку дијагностику *WNV* од ЕЛИСА метода. Применом „*in*
21 *house*“ ЕЛИСА теста добијени су резултати чије су вредности OD ниже у односу на оне
22 добијене употребом комерцијално доступног теста због високе граничне вредности „*in*
23 *house*“ ЕЛИСА теста, броја узорака и критеријума одабира узорака. Збирни резултати
24 су показали да је у другој години епидемије грознице Западног Нила (2013.год.)
25 проценат позитивности много виши. Уочава се чињеница да постоје узорци у којима
26 није установљено присуство антитела за *WNV* ни једним од 6 примењених тестова те
27 се сматра да треба обратити пажњу на друге вирусе који су неуротропни а постоје
28 публикације о њиховом кружењу у Републици Србији. У испитаним узорцима крвних
29 серума коња установљена серопозитивност говори у прилогу како широке
30 распрострањености вируса у Републици Србији тако и повећања броја серопозитивних
31 током година испитивања, што је у сагласности са испитивањима других аутора. Када
32 се посматрају укупни резултати ИФА метода се показала најадекватнијом за
33 дијагностику присуства специфичних антитела за *WNV* код коња, а потпуно
34 неадекватном за серолошку дијагностику код паса. Резултати испитивања паса у
35 односу на локалитете узорковања, показују да највећи проценат серопозитивних паса
36 потиче из локалитета са којих потиче и велики број хоспитализованих људи.
37 Списак литературе обухвата 156 референци класификованих по редоследу
38 појављивања у тексту.
39

1 VI **ЗАКЉУЧЦИ ИСТРАЖИВАЊА** (навести закључке који су приказани у докторској
2 дисертацији):

- 3 1. Испитивање серопреваленције код коња, паса и људи на 15 различитих локалитета
4 Републике Србије показало је да је *WNV* широко распрострањен а посебно у
5 сливовима великих река, првенствено Саве и Дунава.
- 6 2. Број серопозитивних животиња и људи на *WNV* расте током година код свих
7 испитиваних врста животиња и људи.
- 8 3. Најпогоднији метод за серолошку дијагностику инфекције *WNV* код коња и људи је
9 ИФА, док је то код паса ЕЛИСА метод. АГИД је показао ниску осетљивост код све три
10 врсте што представља значајно ограничење за његову употребу.
- 11 4. Примена ИФА тестова није могућа на узорцима пореклом од паса услед
12 неспецифичне реакције.
- 13 5. Нису утврђене статистички значајне разлике између „*in house*“ и комерцијалних ИФА
14 и ЕЛИСА тестова на узорцима серума коња и људи, док су установљене
15 статистички значајне разлике између ЕЛИСА тестова код паса.
- 16 6. Утврђено је да не постоје статистички значајне разлике само између АГИД и „*in*
17 *house*“ ЕЛИСА теста и АГИД и комерцијално доступног ЕЛИСА IgG теста на
18 узорцима пореклом од људи, док су постојале значајне разлике између тестова на
19 узорцима коња и паса.
- 20 7. Осетљивост и специфичност тестова је варијала у односу на испитивану врсту. „*In*
21 *house*“ ИФА тест у поређењу са комерцијално доступним тестом на узорцима људи
22 имао је осетљивост од 89% и специфичност 62%, док је на узорцима коња
23 утврђена осетљивост од 94% и специфичност 90%. „*In house*“ ELISA тест у
24 поређењу са комерцијално доступним тестом код људи је показао осетљивост од
25 20% и специфичност 84%, док су код коња оне износиле 26% и 70%, а код паса 0%
26 и 87.5%. АГИД тест у поређењу са „*in house*“ ИФА тестом код људи је показао
27 осетљивост од 17% и специфичност 94.5%, односно 0% и 100% код коња. У
28 поређењу са „*in house*“ ELISA осетљивост је била 13.2% и специфичност 86.8% код
29 људи, односно 48% и 100% код коња.
- 30 8. У циљу контроле појаве болести код пријемчивих врста потребно је спроводити
31 мере за контролу бројности популације вектора, али и стални мониторинг
32 здравственог стања пријемчивих врста.

33 VII **ОЦЕНА НАЧИНА ПРИКАЗА И ТУМАЧЕЊА РЕЗУЛТАТА ИСТРАЖИВАЊА**
34 (навести да ли су добијени резултати у складу са постављеним циљем и
35 задацима истраживања, као и да ли закључци произилазе из добијених
36 резултата):
37

38
39 Добијени резултати јесу у складу са постављеним циљем и задацима истраживања, а
40 закључци произилазе из добијених резултата.

41
42
43

1 **VIII КОНАЧНА ОЦЕНА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ:**

2
3 1. Да ли је дисертација написана у складу са образложењем наведеним у пријави
4 теме? ДА

5
6 2. Да ли дисертација садржи све елементе прописане за завршену докторску
7 дисертацију? ДА

8
9 3. По чему је дисертација оригиналан допринос науци?

10 Успостављени су „in house“ тестови (АГИД, ИФА и ЕЛИСА) за серолошку дијагностику
11 присуства инфекције са *WNV*. Ови серолошки тестови, у поређењу са комерцијално
12 доступним тестовима и дали су задовољавајуће резултате како у погледу употребне
13 вредности појединих метода код коња, паса и људи, тако и у погледу спремности за
14 правовремену дијагностику присуства антитела специфичних за *WNV*. Испитана је
15 серопреваленција за *WNV* код коња, паса као и код узорак пореклом од људи из прве
16 епидемије *WNV* у Републици Србији. Направљена је мапа распрострањености вируса
17 што указује на посебно угрожене регионе у циљу правовременог спровођења мера
18 контроле вектора и мониторинга стања пријемчивих врста животиња и људи.

19
20 **IX ПРЕДЛОГ:**

21
22 На основу укупне оцене дисертације, комисија предлаже (одабрати једну од
23 три понуђених могућности):

24 - да се докторска дисертација прихвати а кандидату одобри одбрана
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

1 ДАТУМ
2 23.01.2016.г.

ПОТПИСИ ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

3 1. Др Мирослав Валчић, редовни професор,
4 Факултет ветеринарске медицине, Београд

5
6
7 2. Др Тамаш Петровић, виши научни сарадник,
8 НИВ Нови Сад, Нови Сад

9
10
11 3. Др Олга Дуловић, редовни професор,
12 Медицински факултет, Београд

13
14
15 4. Др Зоран Кулишић, редовни професор,
16 Факултет ветеринарске медицине, Београд

17
18
19 5. Др Душан Мишић, ванредни професор,
20 Факултет ветеринарске медицине, Београд
21